



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JOSÉ CLEBERSON SANTOS SOARES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS LIVRES E  
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Recife  
2023

JOSÉ CLEBERSON SANTOS SOARES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS LIVRES E  
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador (a): Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador (a): Iranildo José da Cruz Filho

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Soares, José Cleberson Santos.

Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antiproliferativa de novos derivados indol-tiazólicos livres e encapsulados em nanopartículas poliméricas. / Recife. – 2023.

186f. : il., fig. tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.

Coorientador: Iranildo José da Cruz Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2023.

Inclui referências.

1. Indol - tiazol. 2 .Câncer - nanotecnologia. I. Lima, Maria do Carmo Alves de. (Orient.). II. Cruz Filho, Iranildo José da. (Coorient.). III. Título.

JOSÉ CLEBERSON SANTOS SOARES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO  
ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS LIVRES E  
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 14/11/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Dijanah Cota Machado (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Dedico esse trabalho à força que me sustenta, me move e me faz seguir em frente, Deus, que sempre esteve comigo em todo esse processo, nos momentos bons e nos que não foram tão bons assim, mas foram necessários.

## AGRADECIMENTOS

Sou infinitamente grato a Deus por tudo que Ele é para mim, por tudo que fez, faz e ainda fará por mim, por me mostrar que NEle posso ir sempre além, e por me fazer acreditar até quando as circunstâncias eram as mais adversas possíveis;

Agradeço a minha família, meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos, sem vocês eu não teria chegado onde cheguei, vocês são minha fonte de amor, obrigado por toda assistência e por tornarem a trajetória mais leve;

Agradeço a minha orientadora, co-orientador e demais professores que contribuíram na construção desse trabalho e em minha carreira acadêmica como um todo;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, muita gratidão, vocês foram as pessoas certas que Deus colocou em minha vida, agradeço por todo apoio, todo aprendizado, por cada momento compartilhado, pós-doc, doutores, mestres, estagiários e alunos de IC, levarei essa parceria construída para minha vida;

Agradeço aos amigos de outros laboratórios que também contribuíram com meu trabalho e crescimento acadêmico e profissional, vocês foram verdadeiros presentes para mim;

Aos meus amigos que não estavam diretamente ligados com minha pesquisa, mas que compartilharam momentos comigo, me acolheram sempre que precisei, me incentivaram e acreditaram em mim, obrigado por cada palavra, abraço, sorriso e momento compartilhado;

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos (DAnti), da Central Analítica do DQF-UFPE, do Laboratório de combustíveis LAC-UFPE por realizarem análises que contribuíram para meu trabalho;

Ao Cnpq e CAPES, pelo suporte financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, participaram, contribuíram e torceram em prol dessa realização, ela não é só minha, tem um pouco de todos vocês.

## RESUMO

Os núcleos heterocíclicos indol e tiazol ocupam posição de destaque no campo da química medicinal, estando presentes tanto em fármacos já utilizados na clínica como em novas moléculas candidatas à fármaco. São amplamente utilizados e explorados, pois, estão associados ao desempenho de múltiplas atividades biológicas, entre elas a atividade antiproliferativa. Nessa perspectiva, esse trabalho propôs a síntese de 8 novos derivados indol-tiazólicos, que foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, e utilizados em ensaios *in silico* e *in vitro*. Nas análises *in silico* os compostos apresentaram parâmetros correspondentes com uma boa biodisponibilidade via oral com exceção apenas do CS-06 (*p*-Ph). O potencial de interação entre os 8 (oito) novos derivados e as biomoléculas DNA e BSA foram avaliados e todos os derivados mostraram ser possíveis intercaladores com o DNA e apresentaram grau de interação com a BSA que indica bons parâmetros farmacocinéticos. Os compostos também foram avaliados quanto ao potencial antioxidante apresentando bons resultados nos testes com ABTS<sup>+</sup>, com destaque para o CS-04 (*p*-Br). A avaliação *in vitro* quanto à viabilidade celular em macrófagos J774, mostrou que a maioria dos compostos apresentam baixo grau de toxicidade. A atividade antiproliferativa foi inicialmente avaliada nas seguintes células transformadas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), T-47D (carcinoma ductal infiltrante de mama), DU-145 (Carcinoma prostático) e Jurkat (Células T de leucemia aguda), onde o composto que se destacou nesses testes foi o CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>), chegando a apresentar índice de seletividade de 113, adicionalmete além dessa molécula, os compostos CS-01 (*p*-F), CS-07 (*p*-CF<sub>3</sub>) e o CS-08 (*p*-OCH<sub>3</sub>) apresentaram valores próximos e superiores ao da Doxorubicina que foi utilizada como controle positivo. Foi desenvolvido com sucesso um método de validação para quantificar os compostos em HPLC-UV utilizando os parâmetros exigidos na FDA, ICH e RDC 166/17, o que permitiu a realização dos demais experimentos voltados à utilização de ferramentas nanotecnológicas para melhorar a solubilidade dessas novas moléculas. Foram desenvolvidos e caracterizados dois tipos de nanopartículas que variaram na composição do polissacarídeo utilizado, sendo elas DEX-ETCA e FUC-ETCA, contendo os compostos CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>) ou CS-08 (*p*-OCH<sub>3</sub>), que apresentaram tamanho em torno de 170 - 441nm, PDI de 0,059 a 0,193, carga superficial de -63 a +15mV, e taxa de encapsulamento dos compostos em suas respectivas nanopartículas obtendo-se valores aproximados de 70%, o que possibilitou a investigação *in vitro* na linhagem MDA-MB-231 (Câncer de mama metastático), permitindo a comparação de atividades dos compostos livres e encapsulados, onde foi verificado aumento da atividade antiproliferativa. Os resultados mostram que os *scaffolds* indol e tiazol são promissores quando condensados em uma única molécula, destacando-se na série sintetizada o composto CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>), que o encapsulamento dos compostos nas nanopartículas propostas contribuiu para otimização de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, e conseqüentemente aumentou as atividades dos novos derivados indol-tiazólicos.

**Palavras-chave:** Indol, Tiazol, Câncer, Nanotecnologia.

## ABSTRACT

The indole and thiazole heterocyclic nucleus occupy a prominent position in the field of medicinal chemistry, being present both in drugs already used in the clinic and in new drug candidate molecules. They are widely used and exploited, as they are associated with the performance of multiple biological activities, among them the antiproliferative activity. In this perspective, this work proposed the synthesis of 8 new indole-thiazole derivatives, which were characterized by spectroscopic techniques, and used in *in silico* and *in vitro* assays. *In silico* analyses, the compounds included in the corresponding parameters with good oral bioavailability with the exception only of CS-06 (*p*-Ph). The interaction potential between the 8 new derivatives and the biomolecules DNA and BSA were evaluated and all derivatives showed to be possible intercalators with DNA and showed a degree of interaction with BSA that indicates good pharmacokinetic parameters. The compounds were also evaluated for their antioxidant potential, showing good results in tests with ABTS<sup>+</sup>, with emphasis on CS-04 (*p*-Br). The *in vitro* evaluation for cell viability in J774 macrophages showed that most compounds have a low degree of toxicity. Antiproliferative activity was initially evaluated in the following transformed cells: MCF-7 (human breast adenocarcinoma), T-47D (breast infiltrating ductal carcinoma), DU-145 (prostatic carcinoma) and Jurkat (T cells of acute leukemia), the compound that stood out in these tests was CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>), reaching a selectivity index of 113, but in addition to this molecule, the compounds CS-01 (*p*-F), CS-07 (*p*-CF<sub>3</sub>) and CS-08 (*p*-OCH<sub>3</sub>), showed similar and even higher values than Doxorubicin, which was used as a positive control. A validation method was successfully developed to quantify the compounds in HPLC-UV, using the parameters required in FDA, ICH and RDC166/17 which allowed the carrying out of other experiments aimed at using nanotechnological tools to improve the solubility of these new molecules. Two types of nanoparticles that varied in the composition of the polymer used were developed and characterized, namely DEX-ETCA and FUC-ETCA, containing compounds CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>) or CS-08 (*p*-OCH<sub>3</sub>), which presented around 170 - 441nm, PDI from 0.059 to 0.193, surface charge of -63 to +15mV, and encapsulation rate of the compounds in their respective nanoparticles, obtaining values approximate of 70%, which enabled *in vitro* investigation on the MDA-MB-231 cellular lineage (Metastatic breast cancer), allowing the comparison of activities of free and encapsulated compounds, where an increase in antiproliferative activity was observed. The results show that the indole and thiazole scaffolds are promising when condensed into a single molecule, with the compound CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>) standing out in the synthesized series and that the encapsulation of the compounds in the proposed nanoparticles contributed to the optimization of physico-chemical parameters and pharmacokinetics, and consequently increased the antiproliferative activities of new indole-thiazole derivatives.

**Keywords:** Indole, Thiazole, Cancer, Nanotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Heterocíclicos nitrogenados com anéis de cinco membros	21
Figura 2 –	Estruturas químicas naturais e sintéticas contendo o núcleo indol	24
Figura 3 –	Diferença estrutural nos anéis tiazólicos	25
Figura 4 –	Derivados tiazólicos de origem natural.	26
Figura 5 –	Compostos destaques com potencial atividade antitumoral contendo os núcleos indol e tiazol	29
Figura 6 –	Estrutura da albumina do soro humano (HSA) com os respectivos locais de interação com ligantes destacados e cada subdomínio em cores distintas.	31
Figura 7 –	Estrutura da albumina do soro bovino (BSA) com os respectivos locais de interação com ligantes destacados e cada domínio em cores distintas.	32
Figura 8 –	Modos de interação e formação do complexo reversível ligante – DNA.	34
Figura 9 –	Alterações observáveis em espectros de absorção e fluorescência que estão relacionadas à interação ligante-biomolécula. A: hipocromismo, B: hiper Cromismo, C: hipsocromismo e D: batocromismo.	35
Figura 10 –	Alteração de coloração dos testes antioxidantes	37
Figura 11 –	As características do câncer.	38
Figura 12 –	Estimativa de novos casos de câncer em 2020, em mulheres de 0 a 74 anos, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.	39
Figura 13 –	Estimativa de novos casos de próstata em 2020, em homens de 0 a 74 anos, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.	39
Figura 14 –	Representação estrutural de alguns dos nanossistemas	41
Figura 15 –	Representação estrutural de nanocápsulas e nanoesferas.	41
Figura 16 –	Esquema do mecanismo de reação para síntese da tiossemicarbazida LqIT/LT-45.	44
Figura 17 –	Esquema do mecanismo de ação para síntese de LqIT/LT-53.	45

Figura 18 – Esquema do mecanismo de ação para sínteses dos derivados indol-tiazólicos	46
Figura 19 – Obtenção da tiossemicarbazida (LqIT/LT-45)	50
Figura 20 – Obtenção da tiossemicarbazona (LqIT/LT-53)	50
Figura 21 – Obtenção dos derivados indol-tiazólicos	51
Figura 22 – Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H do composto CS-01	68
Figura 23 – Espectroscopia de RMN <sup>13</sup> C do composto LqIT/CS-01	69
Figura 24 – Espectro de infravermelho do CS-01	71
Figura 25 – Espectros de absorção dos compostos LqIT/CS-07 e LqIT/CS-03 na presença de quantidades crescentes de ssDNA. [DNA]=0,10,20,40,60,80,100.	88
Figura 26 – Espectros de absorção dos compostos CS-06 e CS-02 na presença de quantidades crescentes de ssDNA. [DNA]=0,10,20,40,60,80,100.	89
Figura 27 – Efeitos hiperacrômico e batocrômico evidenciado nos compostos CS-06 e CS-03.	92
Figura 28 – Espectros de absorção da BSA na presença de LqIT/CS-03 e 04 em quantidades crescentes de [LqIT/CS]=0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40.	95
Figura 29 – Espectros de absorção da BSA na presença de LqIT/CS-01 e 07 em quantidades crescentes de [LqIT/CS]=0, 5, 10,15, 20, 25, 30, 35, 40.	97
Figura 30 – Avaliação da atividade in vitro dos compostos da série CS com o radical DPPH e ABTS.	99
Figura 31 – Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais MCF-7.	103
Figura 32 – Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais T-47D.	104
Figura 33 – Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais DU-145.	105
Figura 34 – Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais Jurkat.	106

- Figura 35 – Cromatogramas representativos de CS-03 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com 107 diferentes meios enriquecidos.
- Figura 36 – Cromatogramas representativos de CS-08 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com 108 diferentes matrizes.
- Figura 37 – Curva padrão do CS-03. Curva 1 (-●-), Curva 2 (-●-) e Curva 3 (-●-). 109
- Figura 38 – Homocedasticidade dos resíduos obtidos a partir de três curvas 110 padrão independentes com seis concentrações variando de 1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .
- Figura 39 – Curva padrão do CS-08. Curva 1 (-●-), Curva 2 (-●-) e Curva 3 (-●-). 110
- Figura 40 – Homocedasticidade dos resíduos obtida a partir de três curvas 111 padrão independentes da análise de seis concentrações de CS08 (variando de 1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$
- Figura 41 – Resíduo de CS-03 após corrida de concentração máxima de 20 112  $\mu\text{g.mL}$
- Figura 42 – Resíduo de CS-08 após corrida de concentração máxima de 20 113  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .
- Figura 43 – Precisão intermediária do método por HPLC para quantificação do 115 CS-03. Analista 1 (-●-), Analista 2 (-●-) e Analista 3 (-●-).
- Figura 44 – Precisão intermediária do método por HPLC para quantificação do 116 CS-08. Analista 1 (-●-), Analista 2 (-●-) and Analista 3 (-●-).
- Figura 45 – Espectro do CS-03 (**linha verde**), Mistura física CS-03 e NP-Fuc- 122 ETCA (**linha azul**), NP-Fuc-ETCA (**linha vermelha**), e CS03-NP-Fuc-ETCA (**linha preta**).
- Figura 46 – Espectro do CS-03 (**linha verde**), Mistura física com dextrana 123 (**linha roxa**), NP- Dex-ETCA (**linha rosa**), e CS-03-NP- Dex-ETCA (**linha laranja**).
- Figura 47 – Espectro do CS-08 (**linha laranja**), Mistura física com fucana 124 (**linha verde**), NP-Fuc-ETCA (**linha roxa**), and CS-08-NP-Fuc-ETCA (**linha rosa**).

Figura 48 – Espectro do CS-08 (linha laranja), Mistura física com dextrana (linha azul), NP-Dex-ETCA (linha vermelha), and CS-08-NP-Dex-ETCA (linha preta).	125
Figura 49 – Estrutura morfológica da NP-Dex-ETCA (A), CS03-NP-Dex-ETCA (B), NP-Fuc-ETCA (C) e CS03-NP-Fuc-ETCA (D) obtidas por MEV.	126
Figura 50 – Estrutura morfológica da NP-Dex-ETCA (A), CS-08-NP-Dex-ETCA (B), NP-Fuc-ETCA (C) e CS-08-NP-Fuc-ETCA (D) obtidas por MEV.	127
Figura 51 – Citotoxicidade do CS-03 livre e encapsulado	128
Figura 52 – Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-03 livre e encapsulados em nanopartículas com dextrana.	129
Figura 53 – Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-03 livre e encapsulados em nanopartículas com fucana.	130
Figura 54 – Citotoxicidade do CS-08 livre e encapsulado.	131
Figura 55 – Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-08 livre e encapsulados em nanopartículas com dextrana.	131
Figura 56 – Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-08 livre e encapsulados em nanopartículas com fucana.	132
Figura 57 – Células J774 antes e depois da incubação em diferentes tempos com sistema CS-03-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Dex-ETCA.	134
Figura 58 – Células J774 antes e depois da incubação em tempos diferentes com sistema CS-03-NP-Fuc-ETCA e CS-08-NP-Fuc-ETCA.	136
Figura 59 – Atividade antiproliferativa de CS-03 livre e encapsulado.	137
Figura 60 – Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-03 livre e encapsulado em nanopartículas com dextrana.	138
Figura 61 – Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-03 livre e encapsulado em nanopartículas com fucana.	139
Figura 62 – Atividade antiproliferativa de CS-08 livre e encapsulado.	140
Figura 63 – Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-08 livre e encapsulado em nanopartículas com dextrana	141
Figura 64 – Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-08 livre e encapsulado em nanopartículas com fucana.	142

- Figura 65 – Células MDA-MB-231 antes e depois da incubação em tempos 143  
diferentes com sistema CS-03-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Dex-  
ETCA.
- Figura 66 – Células MDA-MB-231 antes e depois da incubação em tempos 144  
diferentes com sistema CS-03-NP-Fuc-ETCA e CS-08-NP-Fuc-  
ETCA.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas de alguns medicamentos comercializados contendo núcleos heterocíclicos.	22
Tabela 2 –	Diferentes atividades biológicas de medicamentos comercializados contendo o núcleo tiazol.	26
Tabela 3 –	Parâmetros analíticos e variações para análise de robustez do método de HPLC-UV para quantificação do CS03	60
Tabela 4 –	Parâmetros analíticos e variações para análise de robustez do método de HPLC-UV para quantificação do CS08	60
Tabela 5 –	Combinação fatorial de parâmetros analíticos de robustez do CS-03.	61
Tabela 6 –	Combinação fatorial de parâmetros analíticos de robustez do CS-08	62
Tabela 7 –	Características físico-químicas e rendimentos dos novos derivados indol-tiazólicos	66
Tabela 8 –	Deslocamentos químicos em ppm dos sinais diagnósticos de RMN <sup>1</sup> H que indicam a formação dos derivados indol-tiazólicos	68
Tabela 9 –	Deslocamentos químicos em ppm dos sinais diagnósticos de RMN <sup>13</sup> C que indicam a formação dos derivados indol-tiazólicos.	70
Tabela 10 –	Sinais diagnósticos de IV para caracterização dos novos derivados da série CS em cm <sup>-1</sup> .	71
Tabela 11 –	Verificação dos parâmetros físico-químicos de acordo com RO5 e Veber.	78
Tabela 12 –	Parâmetros farmacocinéticos ADMET dos novos derivados indol-tiazólicos.	80
Tabela 13 –	Dados espectroscópicos de absorção UV-Vis dos compostos LqIT/CS's livres e interagindo com o ssDNA	87
Tabela 14 –	Dados espectroscópicos de emissão fluorescente dos compostos LqIT/CS's livres e interagindo com o ssDNA em concentrações crescentes.	91

Tabela 15 –	Dados espectroscópicos de absorção UV-vis da BSA livre e interagindo com quantidades crescentes dos derivados da série LqIT/CS's (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 $\mu$ M).	94
Tabela 16 –	Dados espectroscópicos de emissão fluorescente da BSA livre e interagindo com quantidades crescentes dos derivados da série LqIT/CS's (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 $\mu$ M).	96
Tabela 17 –	Resultados de atividade antioxidante <i>in vitro</i> promovido pelos derivados indol-tiazólicos.	98
Tabela 18 –	Resultados de CC <sub>50</sub> , IC <sub>50</sub> e IS promovidos pelos compostos LQIT/CS.	102
Tabela 19 –	Exatidão do método de quantificação por HPLC para o CS-03.	114
Tabela 20 –	Exatidão do método de quantificação por HPLC para o CS-08.	114
Tabela 21 –	Precisão intra-dia e e inter-dia nalaisadas pelo método de HPLC para quantificação do CS-03.	115
Tabela 22 –	Precisão intra-dia e e inter-dia nalaisadas pelo método de HPLC para quantificação do CS-08.	116
Tabela 23 –	Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, concentração teórica e conteúdo de CS-03.	117
Tabela 24 –	Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, concentração teórica e conteúdo de CS-08.	118
Tabela 25 –	Tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação do ETCA nanopartículas com CS-03 e com CS-08.	120

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>21</b>
2.1	ANÉIS HETEROCÍCLICOS E SUA RELEVÂNCIA PARA A QUÍMICA MEDICINAL	21
2.2	O INDOL E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS	23
2.3	O TIAZOL COMO CONSTITUINTE DE MOLÉCULAS COM VARIADAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	25
2.4	NÚCLEOS INDOL E TIAZOL NA PROPOSIÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS	29
2.5	RELEVÂNCIA DOS ESTUDOS <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	30
2.6	INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS COM O DNA E A PROTEÍNA ALBUMINA	31
2.7	A RELEVÂNCIA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	35
2.8	NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER	37
2.9	NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA DE OTIMIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACO	40
<b>3</b>	<b>DELINEAMENTO DA ESTRATÉGIA DE SÍNTESE</b>	<b>43</b>
3.1	MECANISMOS REACIONAIS	43
3.1.1	<b>Mecanismo reacional para formação do derivado hidrazina tiossemicarbazida (LqIT/LT-45)</b>	<b>43</b>
3.1.2	<b>Mecanismo reacional para formação do 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-53)</b>	<b>44</b>
3.1.3	<b>Mecanismo reacional para formação dos derivados 2-((1H-indol-3il)-metileno)-hidrazina)-4-fenil-3-(p-toluil)-2,3-dihidrotiazol (LqIT/CS)</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
4.1	OBJETIVO GERAL	47

4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
5.1	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES	48
5.2	EQUIPAMENTOS	48
5.3	SÍNTESE DOS OITO NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS	49
<b>5.3.1</b>	<b>Etapa 1: Obtenção da tiossemicarbazida</b>	<b>49</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Etapa 2: Obtenção da tiossemicarbazona</b>	<b>50</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Etapa 3: Obtenção derivados indol-tiazólicos</b>	<b>50</b>
5.4	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	52
<b>5.4.1</b>	<b>Avaliação das propriedades farmacocinéticas</b>	<b>52</b>
5.5	ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	52
<b>5.5.1</b>	<b>Ensaio de interação com DNA e BSA</b>	<b>52</b>
5.5.1.1	Preparo das soluções de DNA e BSA e das soluções estoque dos compostos	52
5.5.1.2	Espectroscopia de absorção eletrônica do composto livre	53
5.5.1.3	Espectroscopia de absorção eletrônica dos compostos com ssDNA e BSA	53
5.5.1.4	Espectroscopia de emissão de fluorescência com ssDNA e BSA	54
<b>5.5.2</b>	<b>Atividade antioxidante</b>	<b>55</b>
5.5.2.1	Método de redução de radicais DPPH	55
5.5.2.2	Método de redução radical ABTS <sup>+</sup> [2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]	56
<b>5.5.3</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular e atividades antiproliferativa compostos livres</b>	<b>57</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Estudos nanotecnológicos <i>in vitro</i></b>	<b>58</b>
5.5.4.1	Validação de método de quantificação	58
5.5.4.1.1	<i>Seletividade</i>	58
5.5.4.1.2	<i>Linearidade</i>	58
5.5.4.1.3	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	59
5.5.4.1.4	<i>Carry-over</i>	59
5.5.4.1.5	<i>Exatidão</i>	59
5.5.4.1.6	<i>Precisão</i>	59

5.5.4.1.7	<i>Robustez</i>	60
5.5.4.2	Obtenção das nanopartículas de Fucana-ETCA ou Dextrana-ETCA contendo os novos derivados indol-tiazólicos	63
5.5.4.3	Caracterização de nanopartículas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, carga superficial, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura	63
5.5.4.4	Taxa de encapsulamento das CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA	64
<b>5.5.5</b>	<b>Citotoxicidade de nanopartículas contendo os compostos da série LQIT/CS</b>	<b>64</b>
<b>5.5.6</b>	<b>Ensaio de captura celular das nanopartículas contendo os compostos da série LQIT/CS</b>	<b>65</b>
<b>5.6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
6.1	SEÇÃO QUÍMICA	66
6.1.1	Síntese dos novos derivados indol-tiazólicos	66
6.1.2	Características físico-químicas dos compostos sintetizados	66
6.1.3	Caracterização por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de carbono (RMN <sup>13</sup> C)	67
6.1.4	Caracterização por infravermelho por transformada de Fourier	70
6.1.5	Dados espectroscópicos e espectrométricos dos derivados indol-tiazólicos	72
6.2	ESTUDO <i>IN SILICO</i>	77
6.2.1	Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas	77
6.2.2	Avaliação <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas	79
6.3	ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	86
6.3.1	Interações com DNA e BSA	86
6.3.1.1	Interação com o ssDNA	86
6.3.1.1.1	<i>Espectroscopia de absorção UV-Vis</i>	86
6.3.1.1.2	<i>Espectroscopia de fluorescência</i>	90
6.3.1.2	Interações com BSA	93
6.3.1.2.1	<i>Espectroscopia de Absorção UV-Vis</i>	93

6.3.1.2.2	<i>Espectroscopia de fluorescência da BSA</i>	96
<b>6.3.2</b>	<b>Atividade antioxidante in vitro (DPPH e ABTS)</b>	<b>98</b>
<b>6.3.3</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade in vitro dos novos derivados sintetizados</b>	<b>100</b>
<b>6.3.4</b>	<b>Validação do método de quantificação em HPLC UV para os compostos da série</b>	<b>106</b>
6.3.4.1	Seletividade	106
6.3.4.2	Linearidade	109
6.3.4.3	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	111
6.3.4.4	Carry-over	112
6.3.4.5	Exatidão	113
6.3.4.6	Precisão	114
6.3.4.7	Robustez	117
<b>6.3.5</b>	<b>Desenvolvimento de nanopartículas de ETCA revestidas com fucana ou dextrana contendo os compostos e suas caracterizações</b>	<b>119</b>
6.3.5.1	Caracterização das NP's com a técnica de infra-vermelho por transformada de Fourier	121
6.3.5.2	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	125
<b>6.3.6</b>	<b>Citotoxicidade em macrófagos J774A.1 dos novos derivados indol-tiazólicos encapsulados nas nanopartículas poliméricas</b>	<b>127</b>
6.3.6.1	Nanopartículas com CS-03	127
6.3.6.2	Nanopartículas com CS-08	130
<b>6.3.7</b>	<b>Captura celular em macrófagos J774A.1 dos novos derivados indol-tiazólicos encapsulados nas nanopartículas poliméricas</b>	<b>132</b>
<b>6.3.8</b>	<b>Atividade antiproliferativa dos compostos encapsulados nas nanopartículas poliméricas</b>	<b>137</b>
<b>6.3.9</b>	<b>Captura celular dos compostos encapsulados nas nanopartículas poliméricas em células MDA-MB-231</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>145</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>147</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>171</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos para combater o câncer, faz-se extremamente necessário, pois muitos medicamentos utilizados não apresentam a efetividade de antes, isso deve-se aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células de câncer (Silva-Filho *et al.*, 2019; Reygaert, 2018; Chopra; Davies, 2019; Jiang *et al.*, 2023; Fessart, Robert, 2023). Além disso a toxicidade inerente de alguns dos tratamentos existentes limita as chances de sucesso terapêutico, o que reforça a busca de novos medicamentos menos tóxicos, para que aumentem o arsenal de possibilidades de tratamento e reduzam a taxa de mortes causadas por câncer (Guo *et al.*, 2019; Mohamed *et al.*, 2023).

Uma das estratégias para obtenção de bons resultados está na implementação de princípios e técnicas nanotecnológicas, que apresenta como vantagem a alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades controláveis (forma, tamanho e potencial de superfície) que interferem positivamente em propriedades físico-químicas, como a solubilidade, favorecendo o aumento da eficácia dos tratamentos, superando os mecanismos de resistência do câncer e diminuindo a toxicidade dos tratamentos (Bigaj-Józefowska, Grześkowiak, 2022; Gorabi *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2022).

A química medicinal é uma ciência multidisciplinar onde os esforços estão voltados para o planejamento, síntese e desenvolvimento de novos medicamentos. Algumas estruturas químicas, também chamadas de *scaffolds*, ocupam posições de destaque nessa área de pesquisa, como ocorre com os núcleos heterocíclicos nitrogenados, essas estruturas têm sido amplamente exploradas na investigação de possíveis atividades biológicas, o que permite o desenvolvimento de moléculas candidatas à fármacos para as mais variadas classes terapêuticas (Ajani *et al.*, 2016; Desai; Makwana; Rajpara, 2016; Almeida *et al.*, 2017).

Entre os compostos heterocíclicos nitrogenados há um destaque para os núcleos: benzoimidazol, imidazol, indol, tiazol, triazol e o tetrazol, que estão presentes em diversos medicamentos já comercializados e em muitas das moléculas candidatas à fármacos em fase de teste (Vitaku; Smith; Njardarson, 2014; Alves *et al.*, 2021; Kabir; Uzzman, 2022).

O núcleo indol, bem como o núcleo tiazol são extensivamente explorados e participam de moléculas que apresentam diversificadas atividades biológicas anti-antibacteriana, antifúngica, antidepressiva, antirretroviral, anti-inflamatória, antiparasitária e antitumoral (Mehndiratta; Nepali; Satapathy, 2017; Sanna *et al.*, 2018; Birmann *et al.*, 2019; Dhiman; Sharma; Singh, 2022). A investigação da associação desses dois núcleos em uma única molécula torna-se plausível para exploração de melhores resultados nas atividades biológicas (Guggilapu *et al.*, 2017; Parrino *et al.*, 2017).

A estratégia de hibridização tem sido utilizada com sucesso devido ao potencial terapêutico promissor em unir duas ou mais moléculas biologicamente ativas, combinando-as em uma única molécula. Dessa forma pretende-se criar novos medicamentos que sejam mais eficazes e menos tóxicos em comparação aos medicamentos já utilizados (Kumar, Hermann, Tsogdeva, 2020; Tilekar *et al.*, 2021). A partir da utilização dessa estratégia já possível desenvolver novos medicamentos anticâncer, antivirais e antimicrobianos eficazes. Apesar dos grandes avanços conquistados até o momento, o progresso no desenvolvimento de medicamentos híbridos ainda enfrenta grandes desafios relativos à arquitetura molecular (Kumar, Hermann, Tsogdeva, 2020).

Nesse processo de obtenção de novas moléculas, dados *in silico* facilitam e norteiam o andamento das pesquisas, pois o conhecimento dos parâmetros estruturais, físico-químicos e farmacocinéticos permite compreender as características das moléculas propostas e como elas possivelmente se comportarão no organismo (Patil *et al.*, 2022). Somados aos testes *in vitro* e *in vivo*, que verificam a eficácia e segurança das moléculas candidatas à fármaco, inicia-se o processo inicial na busca de atender às necessidades da sociedade, contribuindo para resolução de problemas que afligem à saúde da população (Dermachi *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2022).

Dessa forma baseando-se em estudos sobre esses *scaffolds* e nas técnicas de otimização nanotecnológica, o presente trabalho propôs a síntese de novos derivados indol-tiazólicos, bem como o encapsulamento em nanopartículas poliméricas com a finalidade de avaliar a atividade antiproliferativa.

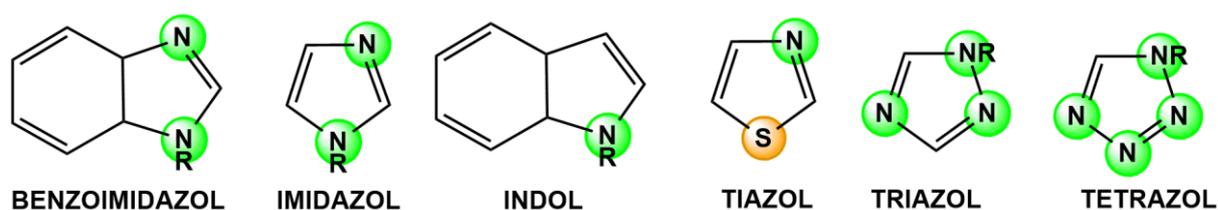
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ANÉIS HETEROCÍCLICOS E SUA RELEVÂNCIA PARA A QUÍMICA MEDICINAL

Compostos orgânicos heterocíclicos são aqueles que apresentam em sua estrutura química pelo menos uma cadeia fechada, também chamada de anel, que contém átomos diferentes de carbono e hidrogênio. Diversos átomos podem estar incluídos nessa estrutura, porém é comum encontrar átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre (Tandon *et al.*, 2018; Mermer *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020; Jacob *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). A presença e quantidade do heteroátomo interfere nas propriedades físico-químicas e atividades biológicas. A possibilidade de diferentes combinações em suas estruturas moleculares é responsável pela grande diversidade de aplicações terapêuticas (Ferreira *et al.*, 2020; Alves *et al.*, 2021; Mermer, Keles, Sirin, 2021; Wang *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2022; Gouveia *et al.*, 2022; Jacob *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023).

Os heterocíclicos nitrogenados se destacam pois estão presentes em 59% dos fármacos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), o que os torna estruturas significativas e consideradas *scaffolds* privilegiados entre os componentes estruturais de produtos farmacêuticos, apresentando anéis heterocíclicos que podem variar entre três ou até oito membros (Vitaku; Smith; Njardarson, 2014; Akhtar *et al.*, 2017). Entre os heteroaromáticos nitrogenados destacam-se o benzoimidazol, imidazol, indol, tiazol, triazol e o tetrazol. Dessas estruturas apenas o tiazol apresenta em sua estrutura um átomo de enxofre, os demais apresentam apenas o átomo de nitrogênio (Figura 1). Tanto o indol como o benzoimidazol apresentam-se condensados a um anel de seis membros compostos apenas por carbono e hidrogênio (Vitaku; Smith; Njardarson, 2014; Almeida *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2021; Shuaj *et al.*, 2021; Pacheco, Santos, 2022).

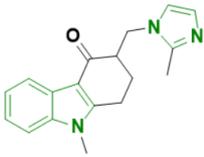
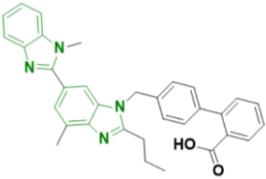
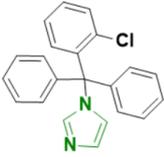
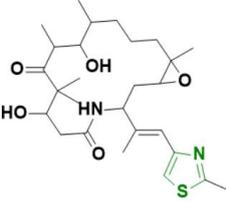
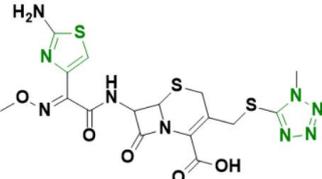
Figura 1– Heterocíclicos nitrogenados com anéis de cinco membros



Fonte: O autor, 2022.

A presença desses núcleos nitrogenados em medicamentos utilizados na prática clínica para diversas doenças, reforça a importância e serve de embasamento para que mais pesquisas sejam desenvolvidas visando a exploração do potencial terapêutico desses *scaffolds*. Alguns dos variados mecanismos e finalidades terapêuticas estão representados na tabela 1 (Vitaku; Smith; Njardarson, 2014).

Tabela 1. Estruturas de alguns medicamentos comercializados contendo núcleos heterocíclicos.

Medicamento	Heterocíclico	Classe terapêutica	Mecanismo de Ação	Referência
 Ondansetrona	Indol e Imidazol	Antiemética	Antagonista dos receptores 5-HT <sub>3</sub>	(Kaushik <i>et al.</i> , 2013)
 Telmisartana	Benzo-Imidazol	Anti-hipertensivo	Antagonista do receptor de angiotensina	(Gaba, Singh, Mohan <i>et al.</i> , 2014)
 Clotrimazol	Imidazol	Antifúngico	Inibidor da síntese de ergosterol	(Zhang <i>et al.</i> , 2014a)
 Ixabepilona	Tiazol	Anticâncer (pele)	Inibidor de microtúbulos	(Brogdon; Lee; Canetta, 2014)
 Cefmenoxime	Tiazol e Tetrazol	Antibiótico	Inibidor da síntese da parede celular bacteriana	(Myznikov; Hrabalek; Koldobskii, 2007)

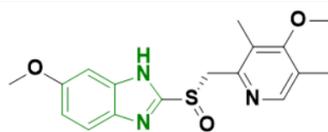


Fluconazol

Triazol

Antifúngico

Inibidor da síntese de ergosterol

(Carrilo-Munoz *et al.*, 2006)

Esomeprazol

Benzo-  
imidazol

Antiulceroso

Inibidor da bomba de prótons

(Sachs;Shin; Howden, 2006)

Fonte: O autor,2022.

## 2.2 O INDOL E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS

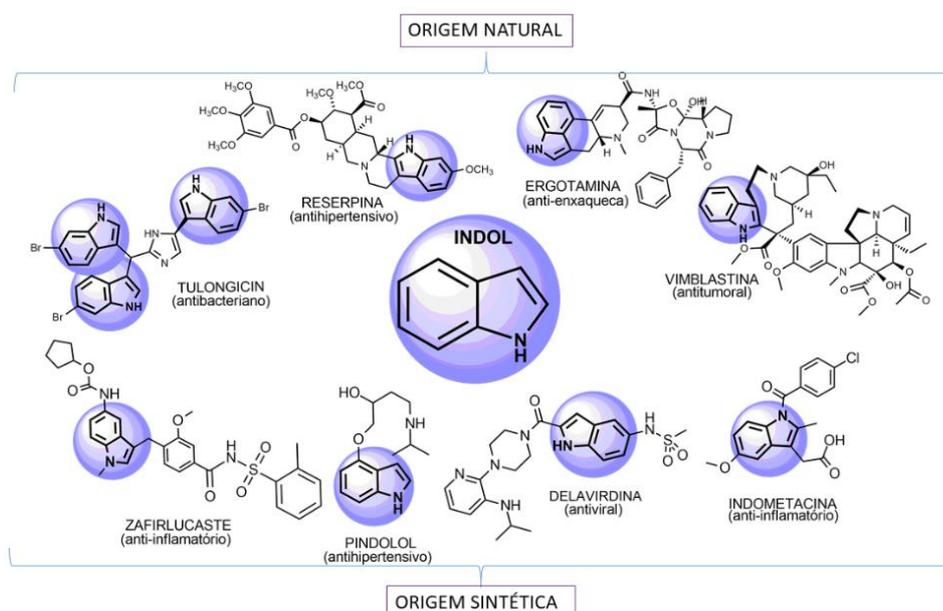
O indol ou benzo [b] pirrol é um heteroaromático bicíclico planar, contendo um anel benzeno fundido ao anel pirrol (Figura 1), é relatado como um importante bloco de construção no campo da química medicinal (Kaushik *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2021). É um núcleo no qual dez elétrons  $\pi$  se movem pela estrutura, caracterizando o comportamento de uma base fraca. Isso se deve à deslocalização do par de elétrons do átomo de nitrogênio para o sistema eletrônico- $\pi$  que circula livremente por todo o anel indólico. Dessa forma, o par de elétrons do nitrogênio não está disponível para protonação, esse processo então ocorre no C-3 porque esta posição, devido à retenção da aromaticidade, é termodinamicamente mais estável (Barluenga; Vald'es, 2011).

A versatilidade de aplicação do indol lhe rendeu um lugar de destaque nos estudos de descobertas de novos potenciais fármacos, observando-se nos últimos anos o desempenho de diferentes atividades farmacológicas (Akhtar *et al.*, 2017; Patil; Patil; Patil, 2017; Gupta *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2021; Dhiman, Sharma, Singh, 2022) O indol é parte constituinte do triptofano, um aminoácido essencial que interfere diretamente na síntese de proteínas e na regulação de importantes mecanismos fisiológicos como precursor da serotonina e da vitamina B3, além de estar presente na estrutura química da melatonina. Os derivados indólicos podem ser obtidos através de métodos sintéticos ou encontrados na natureza em vegetais e organismos

marinhos como algas, esponjas e microrganismos (Figura 2) (Kaushik *et al.*, 2013, Alves *et al.*, 2021).

Os compostos indólicos já foram estudados para as mais diversas atividades biológicas tais como: anti-inflamatória (Ozdemir *et al.*, 2015), antiviral (Zhang; Chen; Yang, 2015), antibacteriana (Sanna *et al.*, 2018), antidepressiva (Patil; Bari, 2016; Birmann *et al.*, 2019), anti-hipertensiva (Panda *et al.*, 2012), hipoglicemiante (Tzetkov *et al.*, 2014), além de apresentarem uma notável propriedade antitumoral (Mehndiratta; Nepali; Satapathy, 2017; Alves *et al.*, 2021; Dhiman, Sharma, Singh, 2022). Apesar de a inibição da formação dos microtúbulos seja o principal mecanismo de atuação anticancerígena, novos alvos para esses compostos têm sido explorados como as proteínas quinases, DNA topoisomerase, histonas desacetilases (HDAC's) e sirtuínas (Kumari; Singh, 2019; Dhiman, Sharma, Singh, 2022).

Figura 2 – Estruturas químicas naturais e sintéticas contendo o núcleo indol.



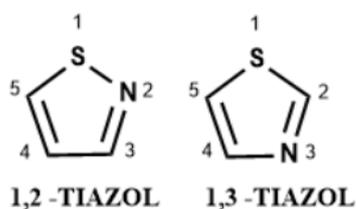
Fonte: O autor, 2022.

Os bancos de dados do FDA refletem a importância dos anéis heterocíclicos contendo nitrogênio no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos. Entre as moléculas registradas, nota-se que os derivados de indol estão na nona posição das 25 principais estruturas químicas em 2015, fazendo-se presente na síntese de medicamentos fundamentais aprovados pela FDA (Vitaku, Smith; Njardarson, 2014; Dhiman, Sharma, Singh, 2022).

### 2.3 O TIAZOL COMO CONSTITUINTE DE MOLÉCULAS COM VARIADAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os tiazóis são núcleos heteroaromáticos pentagonais, constituído por três átomos de carbono, um átomo de enxofre e um de nitrogênio, cuja fórmula molecular é  $C_3H_3NS$ . A maneira como esses átomos estão organizados no anel heterocíclico pode variar de duas maneiras levando a existência do 1,2-tiazol ou 1,3-tiazol (Figura 3). Classificando quimicamente o tiazol é uma base fraca com valor de pKa de 2,52 e exibe um comportamento aromático. No átomo de nitrogênio o tiazol pode sofrer uma alquilação para formar o cátion tiazólio, o que faz com que essa estrutura seja precursora de muitos compostos orgânicos (Zhang *et al.*, 2018). O tiazol é um importante farmacóforo que ocupa um lugar de destaque na química medicinal devido à sua reatividade e atividade biológica sendo amplamente empregado no combate de doenças de modo geral (Ayati *et al.*, 2015; Rouf; Tanyeli, 2015; Liaras, Fesatidou, Geronikaki, 2018; Moghaddam-Manesh, *et al.*, 2021; Niu *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023).

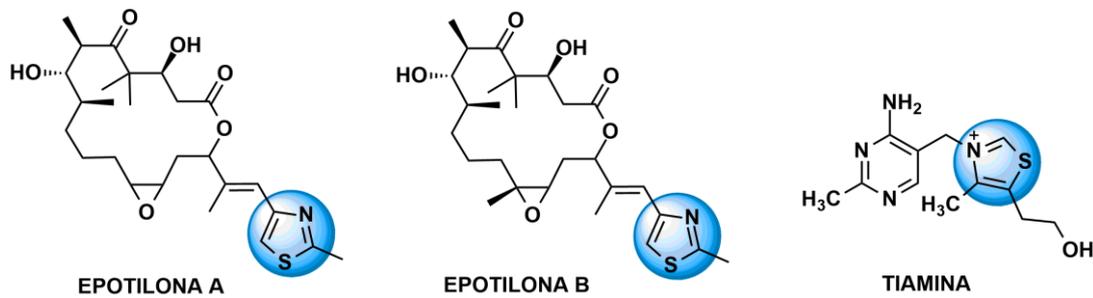
Figura 3 – Diferença estrutural nos anéis tiazólicos.



Fonte: O autor, 2022.

O anel tiazólico pode ser encontrado naturalmente em substâncias como as epotilonas, substâncias que apresentam atividade antifúngica e antitumoral, ou na Tiamina (Figura 4), micronutriente essencial para a síntese de neurotransmissores como a acetilcolina e o ácido gama-amino-butírico (GABA). Sinteticamente foi obtido pioneiramente por Hantzsch e Waber, no ano de 1887, utilizando uma reação entre tioamidas e halocetonas, estabelecendo tal métodos como o mais utilizado para obtenção do anel tiazólico, no entanto existem outros métodos como o de Cook-Heilborn e Robinson-Gabriel, que utilizam outras substâncias de partida (Chabria *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023).

Figura 4 – Derivados tiazólicos de origem natural.

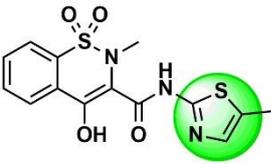
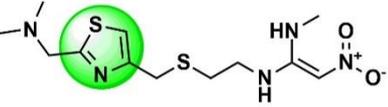
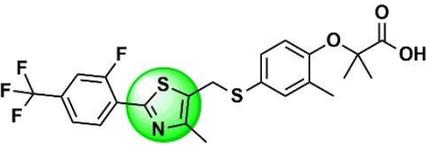
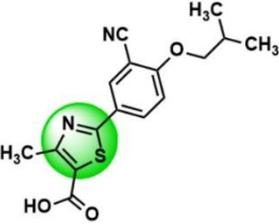


Fonte: O autor, 2022.

Compostos contendo esse *scaffold* em sua estrutura química já demonstraram diferentes atividades biológicas (Tabela 2), como: atividade antibacteriana (Bondock, Fouada, 2018; Othman *et al.*, 2022), antifúngica (Ouf *et al.*, 2018); antidiabética (Datusalia; Khatik, 2018), antituberculose (Scarim, Pavan, 2021; Veena *et al.*, 2022), antirretroviral e antiviral (Karypidou *et al.*, 2018; Almalki *et al.*, 2021), anti-inflamatória (Liaras, Fesatidou, Geronikaki, 2018), antioxidante (Secci *et al.*, 2019; Alfi *et al.*, 2022), antitumoral (Ayati *et al.*, 2018; Ejaz *et al.*, 2018; Guerrero-Pepinosa *et al.*, 2021; Othman *et al.*, 2022; Svircev *et al.*, 2022), entre outras (Niu *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023).

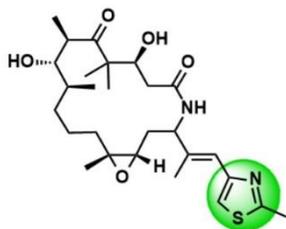
Tabela 2 – Diferentes atividades biológicas de medicamentos comercializados contendo o núcleo tiazol.

Estrutura Molecular	Medicamento	Classe Terapêutica	Mecanismo de Ação	Referência
	CEFEPIME	Antibacteriano	Inibidor da síntese da parede celular bacteriana	(Kashyap <i>et al.</i> , 2012)
	RITONAVIR	Antirretroviral	Inibidor de protease	(Gallant <i>et al.</i> , 2013)

	MELOXICAM	Anti-inflamatório	Inibidor da COX preferencialmente COX 2	(Turck <i>et al.</i> , 1997)
	NITAZOXANIDA	Antiparasitário	Inibidor da PFOR	(White JR., 2004)
	NIZATIDINA	Antiulceroso	Inibidor dos receptores H2	(Golin-Jones, 1995)
	DASATINIBE	Antineoplásico	Inibidor da proteína Quinase	(Kantarijan <i>et al.</i> , 2010)
	SODELGLITAZ AR	Antidiabético	Agonista do receptor PPAR	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
	AMIFENAZOL	Antídoto para overdose de barbitúricos e opiáceos	Antagonista da morfina/ Estimulante respiratório	(Crespo <i>et al.</i> , 1999)
	FEBUXOSTAT	Anti-hiperuricêmico	Bloqueador da enzima xantina oxidase	(Schumacher <i>et al.</i> , 2002)



FATOSTATIN	Antineoplásico	Bloqueio das SREBP	(Xiangyan <i>et al.</i> , 2014)
------------	----------------	--------------------	---------------------------------



IXABEPILONA	Antineoplásico	Estabilizador da formação dos microtúbulos	(Rugo <i>et al.</i> , 2012)
-------------	----------------	--	-----------------------------

Legenda: COX: cicloxigenase; COX-2: Cicloxigenase-2; PFOR: Enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase; PPAR: Receptor ativado de proliferadores de peroxissomas; SREBP: Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol. Fonte: O autor,2022.

A atividade antitumoral do tiazol vem sendo sustentada por pesquisas que atribuem a esse anel propriedades inibitórias de proteínas quinases (Das; Sikdar; Bairagi, 2016;) inibição da polimerização de tubulinas (Guggilapu *et al.*, 2017), inibidores de valosina-proteína (VCP) (Bursavich *et al.*, 2010), inibidor de autotaxina (ATX) (Balupuri *et al.*, 2017), essa variedade de mecanismos de ação vem sendo extensivamente estudada devido à sua potencialidade antitumoral por diferentes vias celulares (Niu *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023).

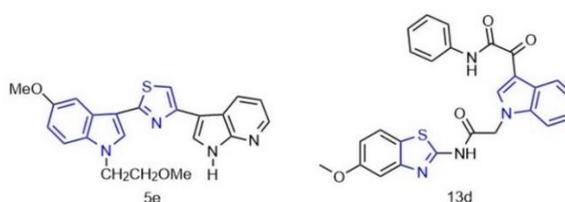
Diversos grupos de pesquisa exploram este núcleo conjugado a outros *scaffolds* devido as potenciais chances de alcançar sucesso no planejamento e síntese de novas moléculas candidatas a fármaco antineoplásicos. Tais estudos podem estabelecer: a) novas rotas sintéticas para obtenção dessas moléculas; b) aplicação de novas tecnologias como o uso de testes *in silico* com o intuito de selecionar as moléculas potencialmente mais promissoras; c) avaliação das atividades frente a diferentes linhagens celulares tumorais *in vitro*; d) verificar a interação com diferentes biomoléculas, investigando assim possíveis mecanismos de ação (Braga *et al.*,2016; Gomha *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Altintop *et al.*,2018; Mann *et al.*, 2018; O’dea *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2021, Jadhav *et al.*, 2021; Niu *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023).

## 2.4 NÚCLEOS INDOL E TIAZOL NA PROPOSIÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS

A associação entre os heterocíclicos indol e tiazol já vem sendo explorada em outros estudos e mostrou-se eficaz na obtenção de novos compostos *hit* potencialmente antitumorais (Figura 5) exercendo atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais MCF-7 (câncer de mama) através da parada do ciclo celular na fase G2/M induzida por inibição de CDK1/ciclina B, tendo como composto destaque o 5e com GI50 de 0,05 $\mu$ M e baixa toxicidade em células não transformadas (Parrino *et al.*, 2017). No estudo realizado por Alves e colaboradores (2021) também foi possível concluir que a associação entre núcleos indólicos e tiazólicos possibilitou a obtenção de moléculas intercalantes de DNA, que se ligam por meio do sulco menor da dupla hélice.

Na pesquisa realizada por Guggilapu e colaboradores (2017), o composto 13d também apresentou bons valores de IC50 nas linhagens tumorais DU-145 e PC-3 (câncer de próstata), A549 (câncer de pulmão) e HCT-15 (câncer de cólon), com valores respectivos de 0,093 $\mu$ M, 0,361 $\mu$ M, 2,1 $\mu$ M e 0,18 $\mu$ M. Ainda foi atribuída ao composto 13d atividade inibitória da polimerização da tubulina e capacidade de aumentar a concentração das espécies reativas de oxigênio (ERO), promovendo assim a morte por apoptose, além disso demonstrou baixa toxicidade em linhagens de células não transformadas e capacidade de inibir a migração celular na linhagem DU-145 (Guggilapu *et al.*, 2017).

Figura 5 – Compostos destaques com potencial atividade antitumoral contendo os núcleos indol e tiazol.



Fonte: Adaptado de Parrino *et al.*, 2017 e Guggilapu *et al.*, 2017

A capacidade de desempenhar atividade antiproliferativa é uma propriedade característica desses compostos e está intrinsecamente relacionada às propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dessas moléculas, tais características são imprescindíveis no processo de otimização adicional de compostos *hit-to-lead*, pois

podem limitar o desenvolvimento de uma nova molécula, a obtenção dos dados relacionados a essas propriedades o mais breve possível, favorece o aumento das chances de alcançar êxito no surgimento de um novo fármaco. Os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET) tornaram-se necessários no processo de triagem na seleção de novos candidatos à fármaco (Matias et al., 2017; Larik et al., 2019).

## 2.5 RELEVÂNCIA DOS ESTUDOS *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

A investigação dos parâmetros de ADMET é caracterizada como etapa essencial em trabalhos de síntese de novas moléculas candidatas à fármaco, a predição do perfil ADMET *in silico*, possibilita a classificação preliminar das moléculas em status favorável ou desfavorável no processo de desenvolvimento de moléculas com potenciais propriedades terapêuticas e pode auxiliar na tomada de decisão para solucionar possíveis problemas detectados (Patil et al., 2022).

Os estudos de Kuthyala e colaboradores (2019) e Almeida-Júnior e colaboradores (2017) utilizaram o recurso dessas análises *in silico* que podem trazer indícios de parâmetros que vão desde a solubilidade eficaz da molécula, fator que interfere diretamente na absorção, passando por parâmetros ligados ao volume de distribuição da droga, caracterizando porções que estão ligadas às proteínas ou livres no plasma para desempenhar atividade biológica, até dados de metabolização enzimática, depuração e toxicidade.

Nos últimos anos tem se tornado cada vez mais comum a presença dos estudos de ADMET *in silico*, o que reforça o grau de importância das informações obtidas por meio dessas análises e servem inclusive para auxiliar na discussão dos resultados, além de permitir a comparação das características inerentes dos compostos sintetizados na pesquisa com fármacos já utilizados na prática clínica (Alves et al., 2021; Veena et al., 2022; Raveesha et al., 2022; Irajil et al., 2022).

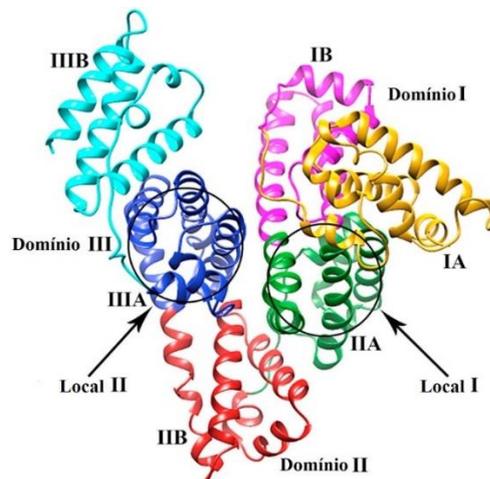
Como o comportamento farmacodinâmico depende de fatores como captação e distribuição, as ligações às proteínas plasmáticas se apresentam como uma variável de extrema importância e que deve ser devidamente investigada (Carter; Ho, 1994; Kuthyala et al., 2019; Alves et al., 2021; Ribeiro et al., 2021). Portanto é importante o estudo de ligações a proteínas séricas de novos derivados obtidos a partir da junção dos núcleos indol e tiazol.

## 2.6 INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS COM O DNA E A PROTEÍNA ALBUMINA

A albumina sérica humana (HSA) representa cerca de 60% das proteínas plasmáticas totais, correspondendo a uma concentração de 42mg/mL e apresentando funções como: manutenção da pressão osmótica coloidal, transporte e depósito de substâncias endógenas como ácidos graxos, vitaminas, metabólitos e aminoácidos e exógenas como fármacos (Meloun; Moravek; Kostka, 1975; Zhao *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2021).

Trata-se de uma proteína globular não glicosilada de cadeia única composta por 585 resíduos de aminoácidos e 17 pontes de dissulfeto, devido a 34 cisteínas presentes na molécula. Sua estrutura pode ser dividida em três domínios homólogos I, II e III, sendo cada um destes subdividido em subdomínios A e B (Koch-Weser; Sellers, 1976; Wang *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2021). Os principais locais de interação à molécula ligante na HSA situam-se em cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IIA e IIIA, que também são respectivamente denominados de local I e local II (Sun; Wang, 2017; Ribeiro *et al.*, 2021).

Figura 6 – Estrutura da albumina do soro humano (HSA) com os respectivos locais de interação com ligantes destacados e cada subdomínio em cores distintas.



Fonte: Adaptado de Mondal e colaboradores (2017).

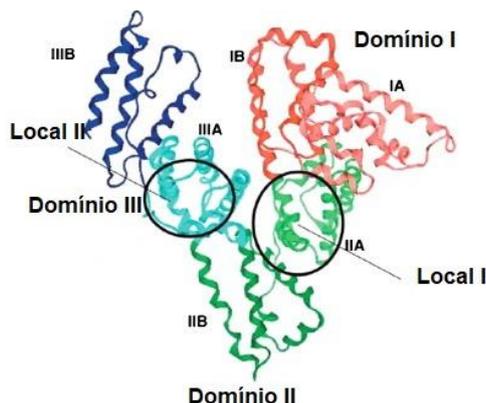
As interações entre a albumina e as moléculas ligantes e sua capacidade de transportar/fornecer substâncias (sejam elas endógenas ou exógenas) pela corrente sanguínea até órgãos-alvo vem sendo amplamente explorada (Sun; Wang, 2017; Gouveia *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Menezes *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2019;

Salem *et al.*, 2019; Yasrebi; Takjoo; Riazi, 2019; Ermakova; Danilova; Khairutdinov, 2020; Ribeiro *et al.*, 2021).

É comum que muitos estudos utilizem a albumina do soro bovino (BSA), devido ao alto grau de similaridade de 76% na sequência de aminoácidos e homologia de 80% com a HSA, o que a torna adequada para realização de estudos de interação proteína-ligante como pode ser notado nos estudos realizados com a HSA (Liu *et al.*, 2018; Rafols *et al.*, 2018; Kumar; Masran, 2019; Silva-Filho *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2021).

A BSA (Figura 7) é composta por 582 aminoácidos, e também é dividida em 3 domínios homólogos I-III, cada um deles é subdividido em A e B, estando unidos por 17 ligações dissulfetos, apresentando em sua estrutura 2 triptofanos localizados na posição 134 (no domínio I) e 212 (na bolsa hidrofóbica do domínio II), enquanto a HSA apresenta apenas o resíduo Trp-214, o que faz com que ambas apresentem uma fluorescência intrínseca. Os locais de ligação às substâncias endógenas ou exógenas da BSA encontram-se em cavidades hidrofóbicas presentes nos subdomínios IIA e IIIA, também chamados de local I e II semelhantes ao da HSA (Roy *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2021).

Figura 7– Estrutura da albumina do soro bovino (BSA) com os respectivos locais de interação com ligantes destacados e cada domínio em cores distintas.



FONTE: Adaptado de Cai e colaboradores (2010).

A interação ligante-proteína é de extrema importância para o entendimento das propriedades farmacocinéticas e conseqüentemente das atividades biológicas dos medicamentos. O acúmulo relativamente alto de albumina no ambiente tumoral, caracteriza essa proteína como um bom veículo na utilização de drogas anticâncer

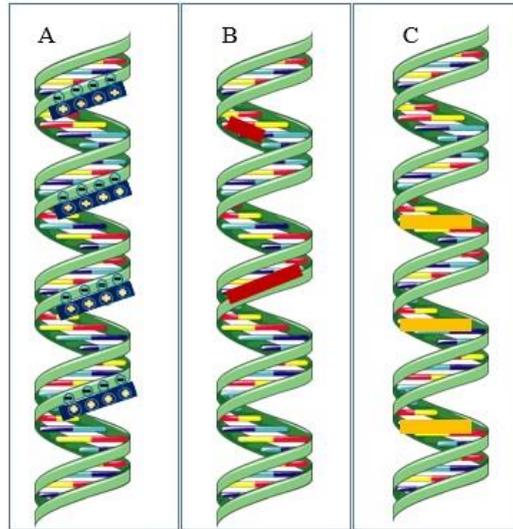
como o paclitaxel e a doxorubicina (Li *et al.*, 2014; Guhathakurta *et al.*, 2017). Além dos medicamentos utilizados na terapêutica, existem estudos que investigam a interação entre a albumina e potenciais candidatos à fármaco com atividade antitumoral (Mondal *et al.*, 2017; Takarada *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Medjedovic *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021)

Os mecanismos pelos quais essas moléculas candidatas à fármacos anticâncer atuam são bem diversificados, entre eles temos: inibições da enzima de ligação ao elemento regulador de esteroide (SREBP) (Xiangyan *et al.*, 2014), inibição da formação de microtúbulos (Rugo *et al.*, 2012; Brogdon; Lee; Canetta, 2014), aumento das EROS (Guggilapu *et al.*, 2017), inibição de proteínas quinases (Das; Sikdar; Bairagi, 2016), indução da degradação do HIF (Wang *et al.*, 2016;), inibição de VCP (Bursavich *et al.*, 2010), inibição de ATX (Balupuri *et al.*, 2017) parada do ciclo celular na fase G2/M induzida por inibição de CDK1/ciclina B (Parrino *et al.*, 2017), inibição de anidrase carbônica IX (Peerzada *et al.*, 2018; Eldehna *et al.*, 2018) e intercalação com DNA (Wang *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2018; Tomczyk; Walczak, 2018; Jafari *et al.*, 2019).

A interação entre fármacos e DNA, provoca alterações estruturais nessa biomolécula, o que fez com que esse mecanismo tenha sido explorado e os dados obtidos apresentam alta importância no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer. Essas moléculas, também chamadas de ligantes de DNA podem alterar a conformação do DNA, impedindo a replicação e transcrição dessa biomolécula, provocando assim a inibição da proliferação das células tumorais (Almeida *et al.*, 2017; Tomczyk; Walczak, 2018; Jafari *et al.*, 2019).

As três principais maneiras de interação reversível entre o ligante-DNA são: interações na espinha dorsal aniônica do DNA (Figura 8A) (sendo essas caracterizadas geralmente como inespecíficas), interações nos sulcos (Figura 8B) (maior ou menor) e empilhamento entre os pares de base (Figura 8C) (Almeida *et al.*, 2017; Tomczyk; Walczak, 2018; Marques *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2021; Albino *et al.*, 2023).

Figura 8 – Modos de interação e formação do complexo reversível ligante–DNA.



A: interações na espinha dorsal aniônica; B: interações nos sulcos; C: empilhamento entre os pares de base. Fonte: O autor, 2020.

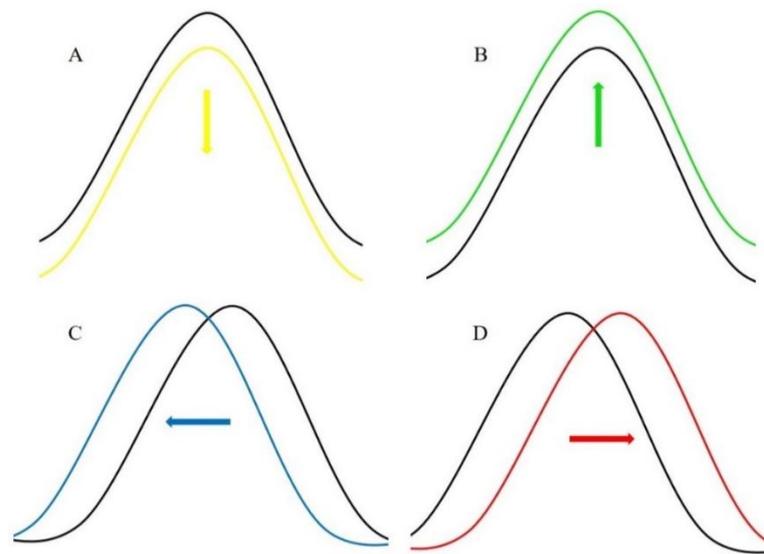
A figura 8A representa a interação inespecífica pois baseia-se na atração eletrostática entre uma porção catiônica do ligante com a porção aniônica da face externa da dupla hélice do DNA, devido a presença do grupo fosfato. Na figura 8B está representada a intercalação nos sulcos, podendo ocorrer tanto nos sulcos maiores ou menores, estas são classificadas como ligações não covalentes, assim como as representadas na figura 8C que é a intercalação entre os pares de bases. Nessa última, os anéis aromáticos dos ligantes ocupam os espaços entre os pares de bases do DNA aumentando a distância entre elas (Almeida *et al.* 2017).

Essas interações entre os ligantes e biomoléculas, seja albumina ou DNA, podem ser verificadas por meio de análises espectroscópicas de absorção e/ou fluorescência, onde ocorrem alterações nas intensidades dos picos, ou deslocamentos dos mesmos para outros comprimentos de onda, indicando uma possível alteração na conformação/estrutura molécula em estudo. Essas alterações variam em 4 tipos (Figura 9) e podem dar indícios sobre o tipo de interação que ocorre. A primeira delas é o hipocromismo, que corresponde a uma diminuição da intensidade da luz absorvida/emitida (Bas *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2021).

A segunda é o hiperchromismo, que também está relacionada a intensidade do pico formado, onde ocorre um aumento na intensidade de luz absorvida/emitida (Shahadabi; Maghsudi, 2014; Alves *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021). O terceiro efeito

é o batocrômico, ocorrendo quando o pico máximo de absorção é deslocado para um comprimento de onda mais longo (região do vermelho) (Pawar; Ottoor, 2018; Alves *et al.*, 2021). Por fim, o efeito hipsocrômico, este ocorre quando o pico máximo é deslocado para a região que abrange menores comprimentos de onda (região do azul) (Canovic *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021; Albino *et al.*, 2023).

Figura 9 – Alterações observáveis em espectros de absorção e fluorescência que estão relacionadas à interação ligante-biomolécula. A: hipocromismo, B: hiper Cromismo, C: hipsocromismo e D: batocromismo.



Fonte: O autor, 2020.

Os efeitos exemplificados na figura 9 servem para avaliação da interação ligante-biomoléculas, podendo então fornecer dados relacionados tanto à farmacocinética, quando falamos da albumina, quanto dados farmacodinâmicos quando se trata da interação com o DNA, estes dados podem ainda servir como indícios de possíveis mecanismos de ação de moléculas candidatas à fármacos antitumorais (Almeida *et al.*, 2017; Varrica *et al.*, 2018; Jafari *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021; Albino *et al.*, 2023).

## 2.7 A RELEVÂNCIA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo está elencado como uma das principais causas de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Sies *et al.*, 2017). Com objetivo de evitar quantidades exacerbadas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente), a utilização de

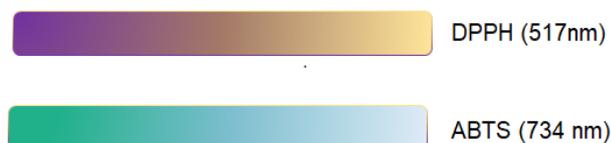
substâncias com capacidades antioxidantes torna-se de elevada importância pois regulam mecanismos de defesa do organismo, prevenindo o dano causado pela oxidação de outras moléculas, controlando o nível de ROS e RNS, em busca de um equilíbrio entre os antioxidantes e a geração e/ou eliminação dessas espécies reativas, mantendo funções fisiológicas adequadas (Silva *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de compostos sintéticos capazes de atuar como antioxidantes fortes, com alta eficiência e baixa toxicidade é uma área de pesquisa crescente no campo da química medicinal (Santos *et al.*, 2023). Moléculas que apresentam em sua estrutura química, átomos que possuam capacidade de doar par de elétrons ou doar hidrogênios podem caracterizar-se como agentes antioxidantes (Bingul *et al.*, 2019; Jacob *et al.*, 2022; Macías-Hernández *et al.*, 2022), além disso, Silva e colaboradores (2018) verificaram que anéis heterocíclicos contribuem positivamente na atividade antioxidante desempenhada por compostos sintéticos.

A verificação do potencial antioxidante pode ser realizada de muitas formas, no entanto é muito comum a utilização dos testes de captura dos radicais DPPH (2,2-di(4-terc-octilfenil)-1-picrilhidrazil) e ABTS [2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] (Bingul *et al.*, 2019; Jacob *et al.*, 2022; Macías-Hernández *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2023). O DPPH baseia-se na transferência de átomos de hidrogênio e o ABTS<sup>+</sup>, baseia-se tanto na transferência de elétrons quanto na transferência de hidrogênio, tendo assim uma maior abrangência, ambos os testes são baseados em estudos colorimétricos, realizados com espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Yang *et al.* 2020; Konus *et al.*, 2022).

O DPPH é um radical insolúvel em água, sendo solúvel apenas em solventes orgânicos, geralmente se dissolve em metanol, etanol ou suas respectivas misturas aquosas. No processo de neutralização desse radical ocorre mudança de coloração de um violeta intenso para amarelo pálido (Figura 10), onde a absorção é mensurada no comprimento de onda de 515nm (Munteanu, Apetrei, 2021; Macías-Hernández *et al.*, 2022).

Figura 10 – Alteração de coloração dos testes antioxidantes.



Fonte: O autor, 2022.

O radical ABTS quando neutralizado muda sua coloração de azul-esverdeado intenso para um azul pálido tendendo à transparência, essa diminuição da intensidade causa uma diminuição na absorbância (Figura 10) que é observada através da leitura no comprimento de onda específico (734 nm). Como o ABTS é solúvel em água e em solventes orgânicos, a utilização desse teste permite a determinação da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Munteanu, Apetrei, 2021; Jacob *et al.*, 2022; Macías-Hernández *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2022).

## 2.8 NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

A constante corrida para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais é justificada pela alta incidência de câncer somada a altas taxas de mortalidade à nível mundial, sendo a segunda principal causa de morte no mundo e responsável por mais de 9,6 milhões de mortes em 2018 (OPAS, 2020). Segundo dados da International Agency for Research on Cancer (IARC), cerca de 19,3 milhões novos casos foram diagnosticados em 2020, com expectativa de aumento para 28,4 milhões de casos em 2040.

Diversos mecanismos estão sendo estudados para uma maior elucidação de como essa doença consegue vencer as barreiras do sistema imunológico, mantendo-se em progressão e tornando-se resistente aos medicamentos já utilizados na prática clínica. Para um melhor entendimento de como ocorrem essas adaptações no microambiente tumoral, Hanahan (2022) elencou as dez principais características do câncer (Figura 11), que passaram a ser vistas na química medicinal como alvos terapêuticos, o desenvolvimento racional de novos candidatos à fármaco para terapia antineoplásica, tem como objetivo a atuação em alvos específicos, diminuindo assim a toxicidade do tratamento antitumoral (Galdino-Pitta *et al.*, 2017; Hamdy *et al.*, 2017;

Gouveia *et al.*, 2018; Youssif *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2019; Silva-Filho *et al.*, 2019).

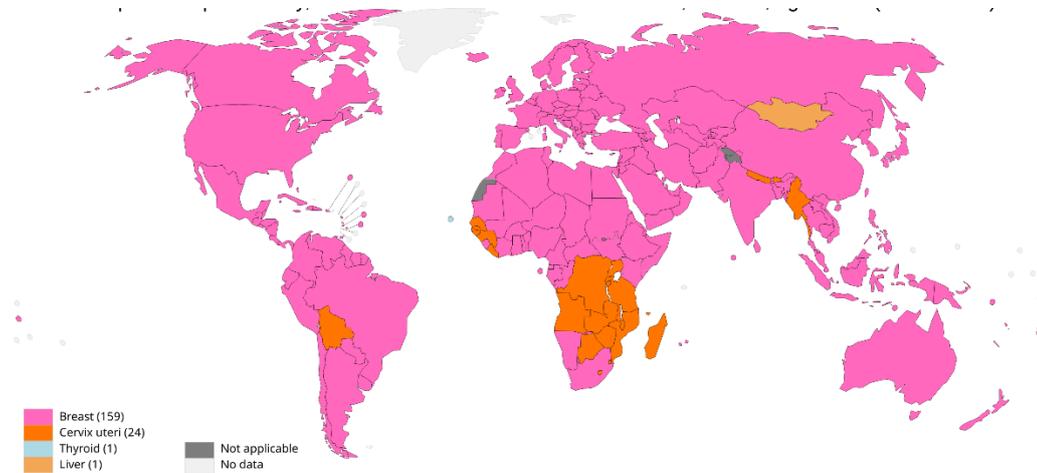
Figura 11 – As características do câncer.



Fonte: Hanahan 2022.

Entre os tipos de câncer, o que atinge as células mamárias é o segundo mais frequente em mulheres, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, nota-se na figura 12 os países destacados em rosa são os que apresentam altas estimativas de incidência de novos casos de câncer de mama (OMS, 2022).

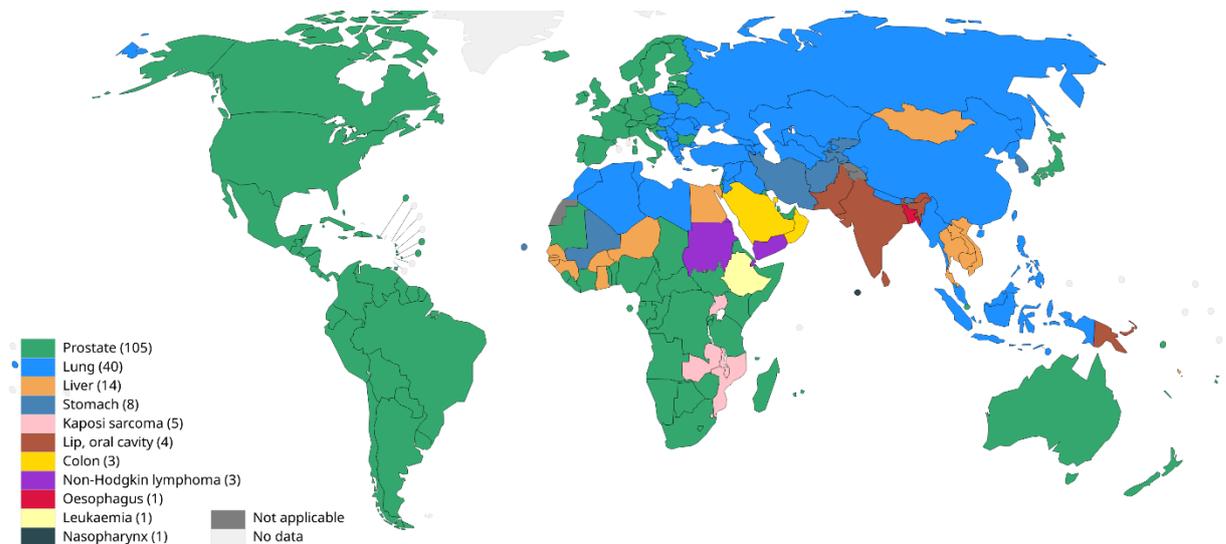
Figura 12 – Estimativa de novos casos de câncer em 2020, em mulheres de 0 a 74 anos, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.



Fonte: OMS, 2022.

Para os homens, o câncer de próstata é o mais comum a nível mundial, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, na figura 13, nota-se a presença de coloração esverdeada em toda América, alguns países continente europeu, africano e da Oceania (OMS, 2022).

Figura 13 – Estimativa de novos casos de próstata em 2020, em homens de 0 a 74 anos, excluindo-se o câncer de pele não-melanoma.



Fonte: OMS, 2022

De acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023-2025, com as regiões sul e sudeste concentrando cerca de 70% da incidência dos novos casos. No Brasil a

realidade mundial também é confirmada, sendo o câncer de mama a neoplasia mais frequente nas mulheres e o câncer de próstata nos homens, com previsão de 72 mil novos casos para o triênio citado anteriormente (INCA, 2022).

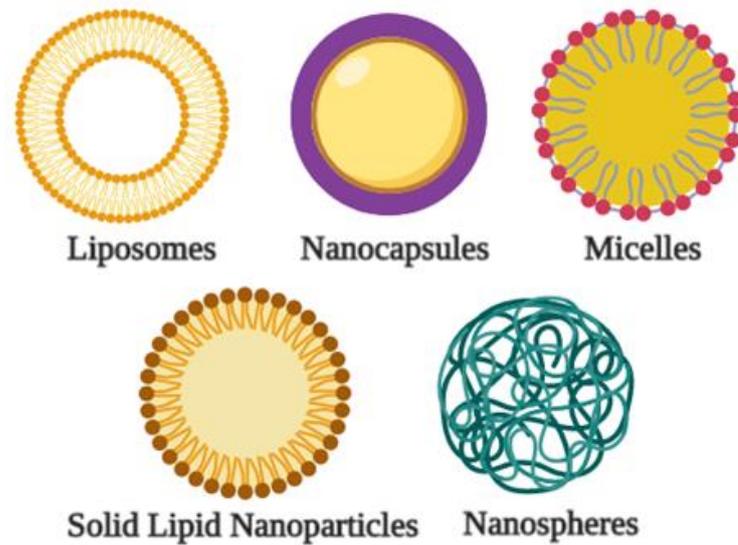
As alternativas terapêuticas além da quimioterapia, são: a cirurgia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, entretanto é comum a utilização dessas modalidades de maneira combinada, tendo ainda a quimioterapia adjuvante (pós-cirurgia) mostrado resultados satisfatórios na diminuição de recorrência local e dos casos de morte. Nos esquemas combinados são utilizados mais e um medicamento para promover a redução da toxicidade e resistência, além de aumentar a eficácia do tratamento (Chopra; Davies, 2019; Mohamed *et al.*, 2023). É comum a ocorrência de mielossupressão, alopecia, náusea, diarreia, cardiotoxicidade e infertilidade, o que ressalta mais uma vez a importância do desenvolvimento de novos agentes antitumorais com menor toxicidade e maior eficácia. (Chopra; Davies, 2019).

## 2.9 NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA DE OTIMIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACO

A nanotecnologia é um campo da ciência que estuda e manipula materiais analisando as propriedades da matéria em escala nanométrica (Leso; Fontana; Lavicoli, 2019). A aplicação da nanotecnologia no campo farmacêutico permite que haja um aprimoramento das propriedades físico-químicas que estão diretamente ligadas à atividade biológica desempenhada por determinada substância bioativa (Chen *et al.*, 2023; Fernandes *et al.*, 2023).

Existem diversos tipos de nanossistemas que podem ser utilizados na nanotecnologia farmacêutica como: lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, micelas, nanopartículas de polímeros biodegradáveis, entre outras que permite o encapsulamento de fármacos ou moléculas candidatas à fármaco (Figura 14). Essa estratégia de inclusão de uma substância bioativa em nanocarreadores tem como objetivo principal aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais (Gorabi *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023; Fernandes *et al.*, 2023).

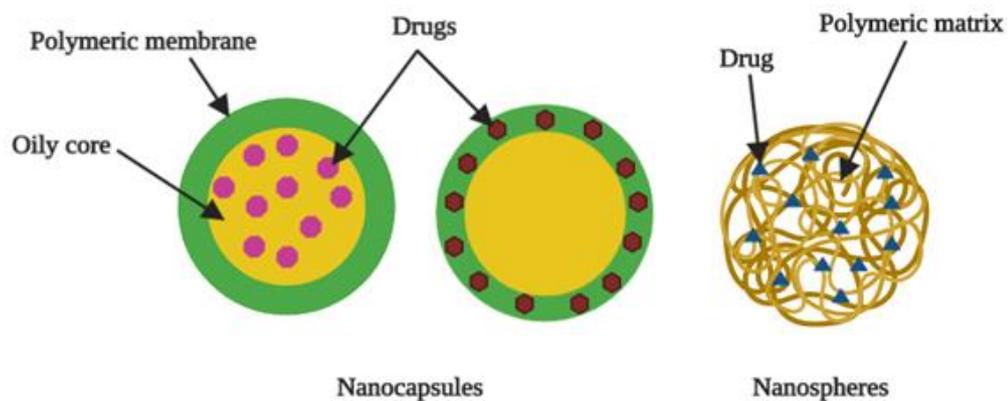
Figura 14 – Representação estrutural de alguns dos nanossistemas



Fonte: Cavalcanti, Soares, 2020.

As nanopartículas poliméricas (NP) são sistemas com tamanho inferior a  $1\mu\text{m}$ , podendo ser classificados em nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas apresentam a substância carregada no núcleo oleoso ou adsorvido na parede polimérica, enquanto as nanoesferas não apresentam óleo em sua formulação, sendo a substância de interesse encontrada retida ou adsorvida na matriz polimérica (Figura 15) (Griffin *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2022).

Figura 15 – Representação estrutural de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Cavalcanti, Soares, 2020.

As moléculas bioativas são liberadas das nanopartículas poliméricas a partir da regulação na taxa de biodegradação do polímero e liberação da substância para fora da matriz polimérica. As nanopartículas permitem aplicações terapêuticas como

veículos de substâncias, proteínas e antígenos para a administração oral, tópica, injetável, parenteral, oftálmica, implantes e sistemas bioadesivos. As nanopartículas poliméricas são um dos nanossistemas mais utilizados para a encapsulação de fármacos ou moléculas candidatas à fármaco (Crucho, Barros, 2017; El-Say, El-Sawy, 2017).

Essas nanoestruturas estão sendo utilizadas para a encapsulação do paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina, gemcitabina, e outros medicamentos utilizados na terapia antineoplásica e em outras condições patológicas. (Jurj *et al.*, 2017; Sahoo, Parveen, Panda, 2017; He *et al.*, 2023). A inserção da nanotecnologia farmacêutica no tratamento do câncer parece ser promissora e vem trazendo bons resultados com os medicamentos já existentes como o Doxil (Doxorrubicina em lipossomas) e o Abraxane (Paclitaxel em nanopartículas de albumina), bem como tem gerado um grande impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes (Ventola, 2017).

Com o objetivo de otimizar a administração dos medicamentos utilizados na clínica e também de moléculas candidatas à fármaco em fase de desenvolvimento, bem como reduzir a sua toxicidade e direcionar esses agentes aos sítios-alvo, a nanotecnologia farmacêutica oferece avanços promissores na superação das limitações quimioterápicas (Chen *et al.*, 2023; Fernandes *et al.*, 2023).

### 3 DELINEAMENTO DA ESTRATÉGIA DE SÍNTESE

Após sintetizar um série de indóis-tiossemicarbazona, Pedrosa (2017) obteve o composto 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT 53) que apresentou um  $GI_{50}$  para as linhagens tumorais K-562 (leucemia) de 0,16 $\mu$ M, para MCF-7 (mama) de 2,52  $\mu$ M e para HT-29 (colon) de 1,45 $\mu$ M, tendo concluído através da avaliação da estrutura-atividade que a presença do *scaffold* indol foi essencial para desempenho da atividade antiproliferativa e obtenção dos valores de  $GI_{50}$  (Pedrosa, 2017).

Para sintetizar a indol-tiossemicarbazona LQIT/LT-53 foi necessária a realização de uma etapa anterior que consistiu na obtenção da tiossemicarbazida (LqIT/LT-45), utilizando a estratégia de expansão molecular dessa tiossemicarbazida com o aldeído 3-indol carboxaldeído. Após obtenção do LQIT/LT-53 foi utilizada a estratégia de restrição molecular, que consiste numa ciclização com formação do anel tiazol, onde no carbono 4 teremos um grupamento fenílico substituído na posição para (para- R), onde R pode ser hidrogênio (não-substituído) e/ou grupos que atuam como retiradores de elétrons, tais como os grupamentos nitro (NO<sub>2</sub>) e trifluorometil (CF<sub>3</sub>), e/ou halogênios (F, Cl, Br) que mesmo apresentando efeito indutivo retirador ativam o anel em posições *orto/para*, e/ou grupamentos doadores de elétrons como: metoxila (OCH<sub>3</sub>) e fenil (Ph).

Tais substituintes são amplamente utilizados nas pesquisas realizadas pelo grupo do laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) e têm apresentado bons resultados, mostrando-se potencialmente ativos em estudos que envolvem atividades biológicas antiproliferativas, antimicrobianas, antiparasitárias e anti-inflamatórias.

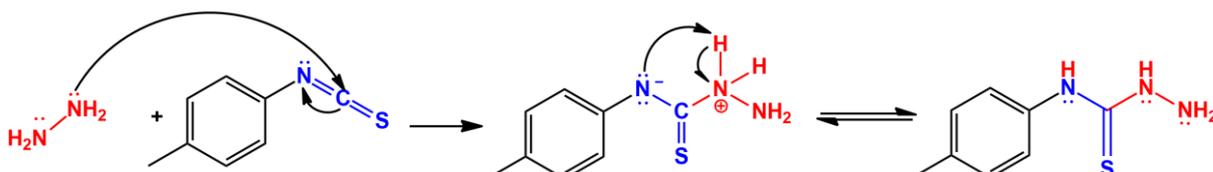
#### 3.1 MECANISMOS REACIONAIS

##### 3.1.1 Mecanismo reacional para formação do derivado hidrazina tiossemicarbazida (LQIT/LT-45)

Na síntese do *N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-45), o mecanismo geral representa a formação da tiossemicarbazida é caracterizado por ataque do nitrogênio da hidrazina ao carbono da tiocarbonila que conseqüentemente promove a deslocalização dos elétrons  $\pi$  ( $\pi$ ) para o nitrogênio vizinho conduzindo a síntese da tiossemicarbazida (Figura 16). Após a ruptura da ligação  $\pi$ , ocorre a passagem dos elétrons da ligação C=N para o nitrogênio, este por sua vez torna-se negativo,

desprotonando o nitrogênio que apresenta carga positiva, estabelecendo uma carga formal zero em toda a molécula promovendo a formação da tiossemicarbazida (Pedrosa, 2017). A presença do grupamento  $\text{NH}_2$  torna a tiossemicarbazidas em moléculas com potencial tóxico, sendo utilizadas na química medicinal como compostos intermediários.

Figura 16. Esquema do mecanismo de reação para síntese da tiossemicarbazida LQIT/LT-45.

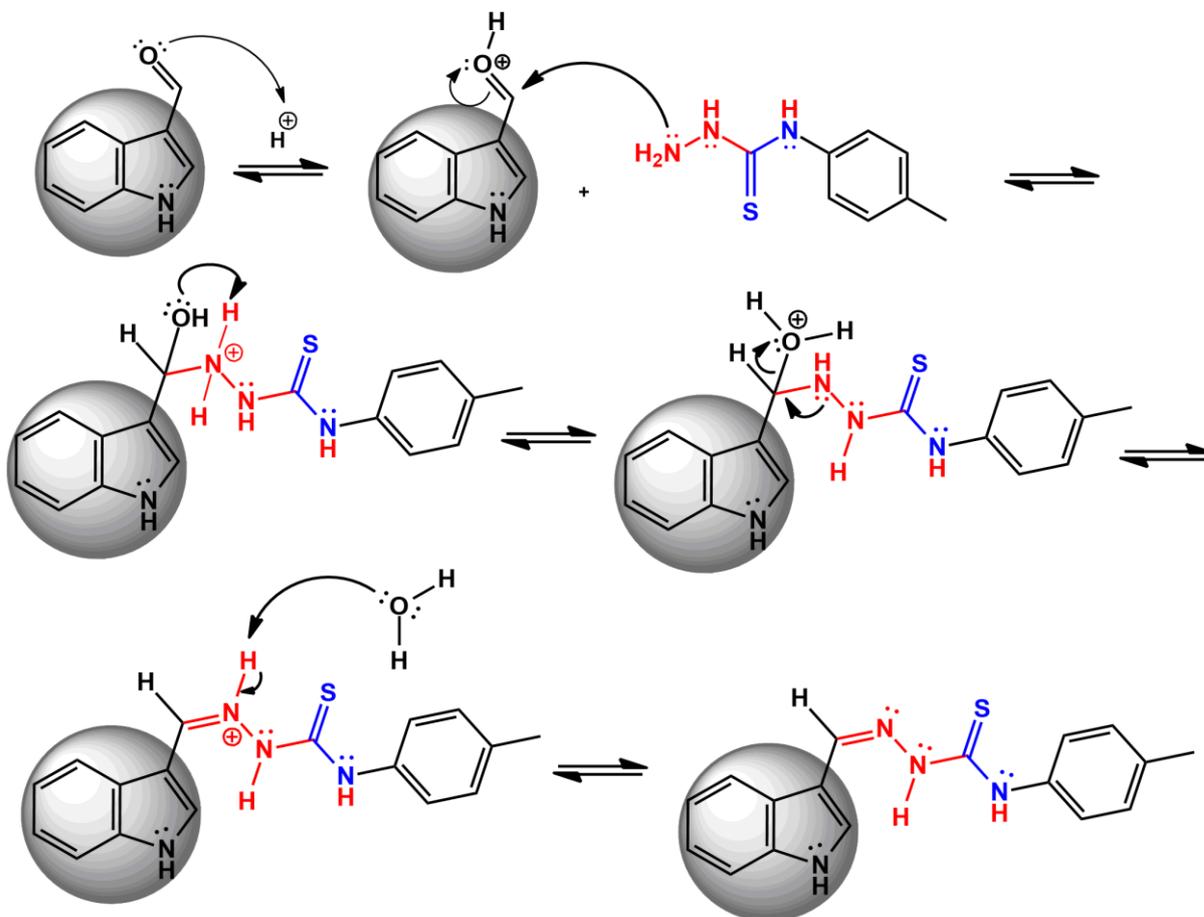


Fonte: O autor, 2022.

### 3.1.2 Mecanismo reacional para formação do 2- (5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno) -N-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-53)

A síntese do derivado 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-53), a partir do *N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LQIT/LT-45), caracteriza-se por uma reação de condensação. O ácido acético atua como catalisador protonando a carbonila da função aldeído do indol formando o íon oxônio. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio N-1 da hidrazina ao carbono positivo do aldeído formando um hemiaminal protonado e uma rápida transferência do próton do nitrogênio para o oxigênio (fenômeno denominado prototropismo). Decorrente a isto, ocorre a deslocalização dos elétrons do nitrogênio com posterior eliminação de água. Por fim, o nitrogênio que agora se encontra positivo é desprotonado pela molécula de água gerando um composto com a função imina (ligação azometínica), formando o derivado indólico-tiossemicarbazona (Figura 17) (Pedrosa, 2017).

Figura 17. Esquema do mecanismo de ação para síntese de LQIT/LT-53.



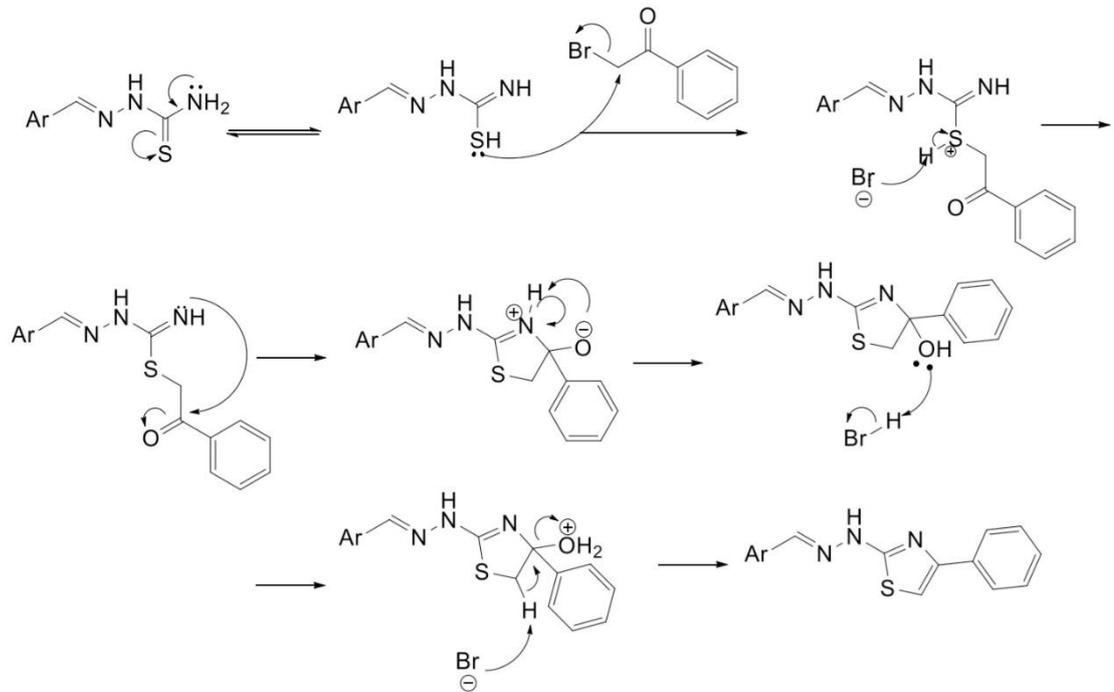
FONTE: O autor, 2022.

### 3.1.3 Mecanismo reacional para formação dos derivados 2-((1H-indol-3il)-metileno)-hidrazina)-4-fenil-3-(p-toluil)-2,3-dihidrotiazol (LQIT/CS)

O mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-((1H-indol-3il)-metileno)-hidrazina)-4-fenil-3-(p-toluil)-2,3-dihidrotiazol (LQIT/CS) foi descrito inicialmente por Hantzsch em 1887 (Souza *et al.*, 2005). Entre os métodos possíveis para obtenção destaca-se a reação de ciclização intramolecular utilizando compostos  $\alpha$ -halocarbonílicos com tiossemicarbazonas substituídas (Cardoso *et al.*, 2014). A reação tem como ponto de partida o tautomerismo da tiocarbonila e formação de uma imina. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico por meio do par de elétrons livres do átomo de enxofre ao carbono  $\alpha$ -halogenado da acetofenona, resultando na saída do bromo que logo abstrai o próton ligado ao enxofre. Em continuidade ao mecanismo, o nitrogênio com par de elétrons livres promove um ataque nucleofílico na carbonila, formando assim o anel de cinco membros. Posteriormente, o oxigênio com carga negativa abstrai os hidrogênios ligados ao nitrogênio que apresentava carga positiva

e do HBr formado anteriormente (Figura 18). Por fim, ocorre uma reação de desidratação conduzindo a formação do tiazol como composto final da reação (Halimehjani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2017).

Figura 18. Esquema do mecanismo de ação para sínteses dos derivados indol-tiazólicos.



Fonte: Nascimento, 2017.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar estrutura química e avaliar atividade antiproliferativa dos novos derivados indol-tiazólicos livres e encapsulados em nanopartículas poliméricas.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a síntese de 8 novos derivados indol-tiazólicos da série LQIT/CS;
- Determinar as características estruturais dos derivados por meio de ferramentas analíticas como ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) e infravermelho (IV);
- Analisar *in silico* as propriedades farmacocinéticas ADMET dos compostos da série LQIT/CS;
- Avaliar o possível perfil de interação dos novos derivados com o ssDNA e a BSA *in vitro*;
- Analisar a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos sintetizados;
- Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* dos novos derivados sintetizados em linhagens de células não transformadas macrófagos J774 e em células tumorais MCF-7, T-47D, DU-145 e Jurkat;
- Validar método de quantificação em HPLC-UV para os compostos da série LQIT/CS;
- Encapsular os compostos promissores da série LQIT/CS em dois tipos diferentes de nanopartículas DEX-ETCA e FUC-ETCA;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, carga superficial, além de caracterizá-las estruturalmente e morfológicamente através das técnicas de infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Quantificar a taxa de encapsulamento obtida nas nanopartículas obtidas;
- Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade em macrófagos J774 e atividade antiproliferativa *in vitro* das nanopartículas contendo os compostos encapsulados em células tumorais;
- Avaliar a captura celular *in vitro* das nanopartículas em macrófagos J774 e em células tumorais.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

Os reagentes com seus números de registro pelo Chemical Abstracts Service (CAS), utilizados para obtenção dos compostos estão descritos a seguir: p-toluil-isotiocianato (CAS: 622-59-3) e hidrazina (CAS: 10217-52-4), cloreto de metileno (CAS: 75-09-2), indol-3-carboxaldeído (CAS: 487-89-8), álcool etílico (CAS: 64-17-5), ácido acético glacial (CAS: 1186-52-3), 2-bromo-4-fluoroacetofenona (CAS: 403-29-2), 2-bromo-4-cloroacetofenona (CAS: 536-38-9), 2-bromo-4-nitroacetofenona (CAS: 99-81-0), 2,4-dibromoacetofenona (CAS: 99-73-0), 2-bromoacetofenona (CAS: 70-11-1), 2-bromo-4-fenilacetofenona (CAS: 135-73-9), 2-bromo-4-trifluoroacetofenona (CAS: 383-53-9), 2-cloro-4-metóxi-acetofenona (CAS: 2196-99-8). Todos os reagentes e solventes foram fornecidos pela Merck.

Além dos reagentes utilizados na síntese dos derivados indol-tiazólicos, também foram utilizados os seguintes reagentes e soluções para execução dos ensaios: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (CAS:1898-66-4 - Merck), Dimetilsulfóxido (CAS:67-68-5 -Merck), ácido ascórbico (CAS: 50-81-7 - Merck) hidroxitolueno butilado (BHT) (CAS: 128-37-0 - Merck), 2,2'- azinobis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (CAS: 30931-67-0 - Merck), Persulfato de potássio (CAS: 7727-21-1 - Merck), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) ( CAS: 298-93-1 – Merck), meio de cultura RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific), soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific), albumina de soro bovino (BSA) (CAS: 9848-46-8 – Merck), DNA de esperma de salmão (ssDNA), acetonitrila (CAS:75-05-8 – Merck).

### 5.2 EQUIPAMENTOS

Foram realizadas leituras utilizando o método de cromatografia em camada delgada (CCD) em placas cromatográficas Polygram Sil G/UV 254 com espessura de 0,20 mm, posteriormente reveladas através de radiação de luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254nm na câmara de radiação ultravioleta Vilber Lourmat®. O monitoramento das reações permitiu a visualização do término após verificação do desaparecimento dos reagentes utilizados inicialmente. A etapa de mensuração do ponto de fusão (P.F) foi realizada em um fusiômetro (Fisatom 431D).

As análises para elucidação estrutural foram realizadas através das técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), utilizando o Agilent ProPulse 300MHz e 75 MHz, respectivamente, a partir de soluções dos compostos em solvente DMSO –  $d_6$ , utilizando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). A Espectroscopia de Infravermelho (IV) na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o equipamento FT-IR/FT-NIR (PerkinElmer, Spectrum 400) à temperatura ambiente. A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada utilizando o HPLC/UV Agilent com injeção de 10  $\mu\text{L}$  de amostra e coluna C-18 em Acetonitrila/Metanol. A obtenção dos espectros de UV-vis foi realizada com o espectrofotômetro Ultraspec 3000 PRO UV-Visible, o espectro de emissão de fluorescência foi obtido utilizando o aparelho JASCO FP-6300. A caracterização das nanopartículas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e carga superficial foi realizada no Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument, EUA). Para realizar a análise por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas foi utilizado o metalizador (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100) e as nanopartículas foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, MIRA3). Nos ensaio de captura celular foi utilizado o microscópio de fluorescência (Zeiss Axio, Imager.M2m, objetiva de 40x, NA = 0,80) usando filtros DAPI (excitação 350/50 nm e emissão 460/50 nm) e Green Alexa488 (excitação 470/40 nm e 525 nm). /50 nm) filtros.

### 5.3 SÍNTESE DOS OITO NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS

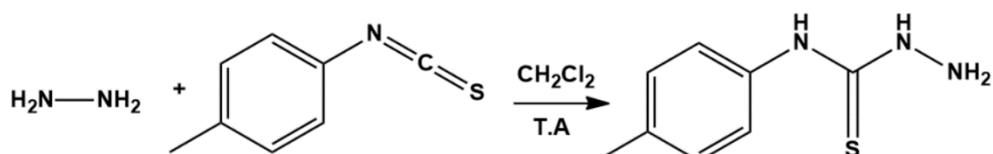
Todas as sínteses foram realizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil. Para obtenção dos 8 novos derivados indol-tiazólicos (CS01-08) foi necessária a realização de 3 etapas.

#### 5.3.1 Etapa 1: Obtenção da tiossemicarbazida

A primeira etapa consistiu na obtenção da tiossemicarbazida (LT-45), conforme a metodologia aplicada inicialmente por Gürsoy, Terzioglul, Ötük (1997) e Liesen e colaboradores (2010), onde ocorre uma adição nucleofílica entre a hidrazina e o isotiocianato (Figura 19), em proporção molar de 1:1, em 20mL de diclorometano, permanecendo em agitação magnética por 1 hora à temperatura ambiente. Após utilização da técnica de CCD e verificação do fim da reação, foi realizada a filtração,

onde o precipitado foi sendo concentrado no centro do papel de filtro, utilizando o diclorometano, posteriormente o filtrado foi seco em dessecador à vácuo, para então ser utilizado na etapa de síntese posterior (Oliveira *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2021; Jacob *et al.*, 2021).

Figura 19 – Obtenção da tiossemicarbazida (LQIT/LT-45)

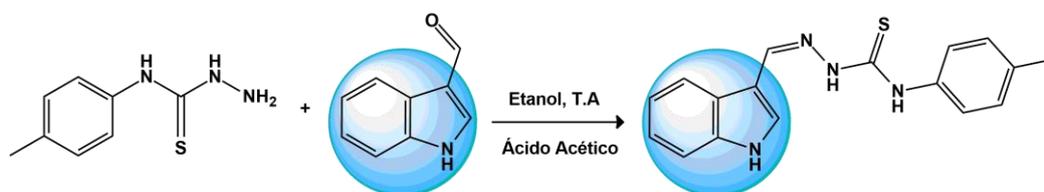


T.A: Temperatura ambiente. Fonte: O autor, 2022.

### 5.3.2 Etapa 2: Obtenção da tiossemicarbazona

Para obtenção do intermediário tiossemicarbazona (LqIT/LT-53), o LT-45 obtido na primeira etapa reagiu com o 3-indol carboxaldeído em quantidades equimolares (Figura 20). O etanol foi utilizado como solvente da reação e o ácido acético glacial foi adicionado ao sistema reacional em quantidades catalíticas (15 gotas), permanecendo sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 2 horas. O precipitado foi filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador à vácuo, para aplicação na próxima e última etapa da síntese (Oliveira *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2021; Jacob *et al.*, 2021).

Figura 20 – Obtenção da tiossemicarbazona (LQIT/LT-53)



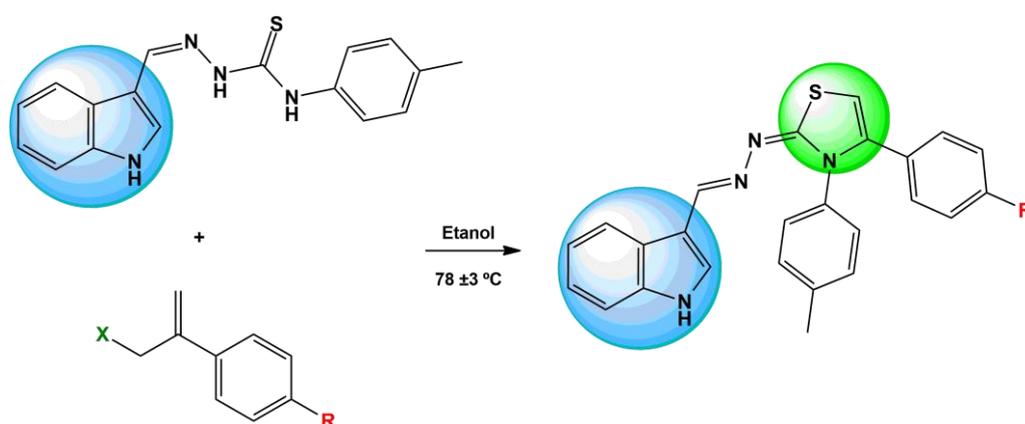
T.A: Temperatura ambiente. Fonte: O autor, 2022.

### 5.3.3 Etapa 3: Obtenção derivados indol-tiazólicos

Por fim, na terceira etapa realizou-se a síntese de Hantzsch cujo mecanismo visa a obtenção de tiazóis a partir de  $\alpha$ -halocarbonilas (acetofenonas) e

aminotioureas, em proporções equimolares (Figura 21). Nessa etapa foram utilizadas oito diferentes acetofenonas que reagiram separadamente com o LT-53. O solvente utilizado na reação foi o etanol, e o sistema para obtenção foi mantido sob agitação magnética e refluxo à temperatura de  $78^{\circ}\text{C} \pm 3$ . Nas reações onde não ocorreu precipitação espontânea do produto foi adicionada água destilada, obtendo-se então o precipitado, este foi filtrado e seco como nas etapas anteriores (Alves *et al.*, 2021).

Figura 21 – Obtenção dos derivados indol-tiazólicos



Composto	X	R
LQIT/CS-01	Br	F
LQIT/CS-02	Br	Cl
LQIT/CS-03	Br	NO <sub>2</sub>
LQIT/CS-04	Br	Br
LQIT/CS-05	Br	H
LQIT/CS-06	Br	Ph
LQIT/CS-07	Br	CF <sub>3</sub>
LQIT/CS-08	Cl	OCH <sub>3</sub>

Fonte: O autor, 2022.

## 5.4 ANÁLISES *IN SILICO*

### 5.4.1 Avaliação das propriedades farmacocinéticas

As predições das propriedades farmacocinéticas de ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção) dos compostos 8 novos derivados indol-tiazólicos sintetizados foram obtidas através das plataformas on-line SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina *et al.*, 2017) e pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) (Pires, Blundell, Ascher, 2015), os resultados das propriedades físico-químicas obtidos também foram analisados sob a ótica da RO5 (regra dos cinco) de Lipinski e pela regra de Veber, que determinam parâmetros físico-químicos aceitáveis para o desenvolvimento de moléculas com potencial de se tornarem futuros fármacos com administração oral (Lipinski, 2004; Veber *et al.*, 2002). O perfil das predições obtidas foi avaliado de acordo com a metodologia proposta por Almeida-Júnior e colaboradores (2019) e Gouveia e colaboradores (2022).

## 5.5 ANÁLISES *IN VITRO*

### 5.5.1 Ensaio de interação com DNA e BSA

#### 5.5.1.1 Preparo das soluções de DNA e BSA e das soluções estoque dos compostos

A solução de DNA de espermatozóide de salmão (ssDNA) foi preparada a partir da dissolução do mesmo em tampão Tris-HCl (50M, pH 8,0), e deixada em repouso por 24h, à 8 °C. Depois desse período a solução foi sonicada por 30 minutos, em seguida teve a concentração determinada por meio do cálculo do coeficiente de extinção molar  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 260 nm, como foi feito por Wolfe e colaboradores (1987). O grau de pureza da solução obtida é medido pela razão dos valores de absorvância em 260 e 280 nm. Após essas etapas a solução obtida permanece armazenada sob refrigeração (Alves *et al.*, 2021). A albumina de soro bovino (BSA) foi pesada e posteriormente também foi diluída em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) para obtenção de uma concentração de 1mM. Para preparação das soluções estoque de cada um dos compostos foi realizado um cálculo para que a concentração final dessa solução fosse de 1 $\mu$ M, utilizando como solvente o DMSO. Após o preparo todas foram mantidas em seus respectivos frascos-âmbar para proteção de uma possível fotodegradabilidade.

### 5.5.1.2 Espectroscopia de absorção eletrônica do composto livre

A solução estoque de cada composto foi utilizada para preparo das soluções teste para varredura (composto livre), sendo estas obtidas por diluição em Tris-HCl, as concentrações obtidas foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50  $\mu\text{M}$ . Esse processo foi realizado em triplicata para observação do perfil de absorção dos compostos e escolha de uma concentração para realização dos testes de interação.

### 5.5.1.3 Espectroscopia de absorção eletrônica dos compostos com ssDNA e BSA

Para realização desse ensaio, os novos derivados foram fixados na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e expostos à solução de ssDNA nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ . Após a adição da biomolécula as soluções testes (ssDNA + composto) foram homogeneizadas e permaneceram em repouso, à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização das substâncias no tampão. Todas amostras foram preparadas em triplicata e seguiram para análise entre os comprimentos de onda de 200 a 600nm, no Ultraspec 3000 PRO, utilizando uma cubeta de quartzo retangular com comprimento de 1 cm óptico de percurso (Alves *et al.*, 2021).

Após obtenção dos dados espectroscópicos foram calculados os valores das constantes de ligação, que servem como reveladores de afinidade entre a biomolécula e o composto testado. A constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ) foi obtida utilizando a equação de McGhee, Hippel (1974) descrita abaixo:

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

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

Onde,  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$  e  $\epsilon_f$  são coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Para obtenção dos valores de  $K_b$  a partir da razão entre a inclinação e o intercepto foram utilizados os gráficos dos  $[\text{CSs}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{CSs}]$  e  $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ . Os dados de ligação e gráficos foram obtidos por meio do software Origin.

Posteriormente foi realizado o teste com a BSA, sendo fixada na concentração de 20  $\mu\text{M}$  e os compostos teste utilizados nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{M}$ . Os sistemas foram preparados em triplicata, homogeneizados e deixados em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização no tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6), antes de serem encaminhados para a leitura no espectrofotômetro de absorção na faixa de comprimento de onda que variou entre 200-600nm.

Os dados espectroscópicos obtidos foram utilizados para calcular os valores das constantes de ligação intrínseca ( $K_b$ ), para avaliação da afinidade de ligação entre a biomolécula e os compostos teste. A equação utilizada para obtenção do  $K_b$  foi a mesma utilizada na análise de interação com o DNA (Mcghee & Hippel, 1974), sendo descrita da seguinte forma:

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

Onde, os coeficientes de extinção aparente, limitado e livre, estão representados respectivamente por  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$  e  $\epsilon_f$ . O ajuste de gráfico de  $[\text{CS}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{CS}]$  foi usado para obter valores de  $K_b$  da razão inclinação para interceptação. Os dados de ligação e gráficos foram obtidos por meio do software Origin.

#### 5.5.1.4 Espectroscopia de emissão de fluorescência com ssDNA e BSA

O perfil de fluorescência dos derivados CS com as biomoléculas foi realizado a 25°C em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de caminho de 1 cm em triplicata. Para o teste realizado com a BSA os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na região de 310-400 nm em um comprimento de onda de excitação de 285nm, com bandas de excitação e de emissão de 2,5 nm, em concentrações de (5-40  $\mu\text{M}$ ) e concentração fixada da BSA em 20  $\mu\text{M}$ . Para realização da titulação de fluorescência com o ssDNA foram utilizadas soluções do mesmo nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$  enquanto o composto foi fixado em 20  $\mu\text{M}$  (Ribeiro *et al.*, 2019, Alves *et al.*, 2021). As diferentes intensidades obtidas após a exposição do composto ao ssDNA e para a BSA foram utilizadas para calcular a constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), pela seguinte equação Lakowicz (2006):

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

Onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência no estado estacionário de compostos na ausência e na presença dos compostos, respectivamente,  $K_{sv}$  é a constante de Stern-Volmer, e  $[Q]$  é a concentração do ssDNA em  $\mu\text{M}$ . A constante de regressão linear foi obtida através do gráfico de intensidade de emissão relativa ( $F_0 / F$ ) versus  $[Q]$ . O software utilizado para obtenção dos dados de ligação também foi o Origin.

## 5.5.2 Atividade antioxidante

### 5.5.2.1 Método de redução de radicais DPPH

Para realização do ensaio de captura radicalar do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi adotada como base a metodologia proposta por Macías-Hernández e colaboradores (2022), com algumas modificações. O método é baseado na alteração da cor do DPPH, após sofrer reação de óxido-redução, o radical analisado que inicialmente apresenta coloração violeta intensa, passa a sua forma reduzida DPPH-H, apresentando então coloração amarela. Os compostos foram diluídos em DMSO em diferentes concentrações (7,8-1000  $\mu\text{g/mL}$ ), então 0,32 mL de cada concentração foi adicionado a 2,0 mL de solução de metanol com DPPH a 1mM. Os tubos de ensaio contendo suas respectivas amostras foram incubados a 25 °C durante 25 min na ausência de luz por aproximadamente 30 minutos. Depois desse tempo de reação entre os compostos e o DPPH, foi utilizado o espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) para leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 515nm. Os controles experimentais utilizados foram o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para determinação da ação antioxidante, foi utilizada a seguinte equação:

$$[\text{DPPH}](\%) = \left( \frac{\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}}{\text{ABS controle}} \right) \times 100$$

Onde: ABS controle = absorvância do controle; ABS amostra = absorvância da amostra contendo os compostos nas diferentes concentrações.

O coeficiente de inibição ( $\text{EC}_{50}$ ), concentração mínima de substância antioxidante necessária para promover redução da concentração inicial do radical livre

DPPH em 50%, foi determinada por ajuste de regressão linear da capacidade antioxidante *versus* as concentrações dos novos derivados indol-tiazólicos sintetizados.

#### 5.5.2.2 Método de redução radical ABTS<sup>+</sup> [2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]

Baseando-se na metodologia proposta por Jacob e colaboradores (2022) com poucas modificações, realizou-se o ensaio de captura de radicais catiônicos do ABTS<sup>+</sup>, que apresenta coloração azul-esverdeado e após a adição de substância antioxidante, o radical é reduzido e conseqüentemente perde a cor no meio reacional, deixando um aspecto transparente (Jacob *et al.*, 2022; Macías-Hernández *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2022). A solução de ABTS<sup>+</sup> foi obtida após a reação entre 7mM de ABTS (5mL) e 2,45mM de persulfato de potássio (88 µL), o resultado dessa reação permaneceu incubado por 16h na ausência de luz. Após esse tempo foi realizada uma diluição com etanol 80% para obter uma absorvância de 0,70-0,734nm. A solução de ABTS<sup>+</sup>(2,7mL) foi misturada com 0,3 mL para cada uma das concentrações (7,8-1000 µg/mL) analisadas dos compostos. Os tubos contendo essas misturas foram incubados a 25°C durante 5 minutos na ausência da luz. Para leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 734nm foi utilizado o espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). No experimento a solução de ABTS<sup>+</sup> foi utilizada como controle, o metanol foi utilizado como branco do equipamento. Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as porcentagens de sequestro de radical para cada uma das concentrações testadas foram determinadas pela seguinte equação:

$$[\text{ABTS}](\%) = \left( \frac{\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}}{\text{ABS controle}} \right) \times 100$$

Onde: ABS controle = Absorvância de controle; ABS amostras= Absorvância da amostra contendo os compostos nas diferentes concentrações.

O coeficiente de inibição (EC<sub>50</sub>), concentração mínima da substância antioxidante necessária para promover redução da concentração inicial do radical

ABTS<sup>+</sup> em 50%, foi determinada por ajuste de regressão linear da capacidade antioxidante versus as concentrações dos novos derivados indol-tiazólicos sintetizados.

### **5.5.3 Avaliação da viabilidade celular e atividades antiproliferativa dos compostos livres**

Para determinação da citotoxicidade foi utilizado o método de ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Tizziani e colaboradores (2017) com algumas modificações. A avaliação da viabilidade celular foi realizada em macrófagos J774 e as atividades antiproliferativas foram verificadas utilizando as seguintes linhagens de células transformadas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), T-47D (carcinoma ductal infiltrante de mama), DU-145 (Carcinoma prostático) e Jurkat (Células T de leucemia aguda). Todas as linhagens foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Gibco®) ou DMEN (Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB-Gibco®) e antibiótico (solução de estreptomicina 1%). As células foram incubadas na estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>.

Os três compostos padrões utilizados foram: amsacrina, asulacrina e doxorubicina. Os ensaios foram realizados usando  $1 \times 10^4$  células/poço para cada uma das linhagens celulares testados. Os padrões e os novos derivados indol-tiazólicos foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio de cultura respectivo para cada linhagem, as concentrações utilizadas para o teste foram 3,12 a 100 µg/mL e incubados por 24 ou 48h em câmara umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período determinado para cada linhagem celular, 20 µL de solução de MTT foram adicionados por 3h. Para dissolução dos cristais de formazan foi utilizado DMSO e a leitura da absorbância em 570nm em um leitor de placas modelo Varioskan.

Foram realizados dois experimentos independentes, ambos realizados em triplicata, para então calcular os valores de IC<sub>50</sub> por regressão linear, utilizando o software Origin. Para calcular o índice de seletividade (SI) utilizamos a razão entre os valores de CC<sub>50</sub> para células não transformadas (J774) e o IC<sub>50</sub> das células transformadas (MCF-7, T47-D, DU-145 e Jurkat).

## 5.5.4 Estudos nanotecnológicos

### 5.5.4.1 Validação de método de quantificação

Para validar o método de quantificação por HPLC-UV das duas moléculas CS escolhidas seguimos as recomendações dos guias do ICH (2005), FDA (2015) e RDC 166/17. Os parâmetros avaliados definidos pelas diretrizes foram: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação, e robustez.

#### 5.5.4.1.1 Seletividade

O ensaio de seletividade objetiva identificar uma concentração conhecida do analito em diferentes meios, que podem servir como interferentes. Para esse estudo utilizamos uma concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  das moléculas em estudo solubilizadas em solução tampão simulando o pH sanguíneo (pH 7,4), gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8), e quando inserida em meios contendo constituintes de nanopartículas de fucana ou constituintes de nanopartículas de dextrana. Foram realizados 5 corridas independentes de cada matriz testada e a área do pico e o tempo de retenção foram avaliados para identificar a capacidade do método de separar picos do CS e os compostos presentes na matriz. A seletividade também foi avaliada pela pureza do pico da molécula através do uso do software Empower 2 (Waters Corporation, Milford, USA).

#### 5.5.4.1.2 Linearidade

Para os estudos de linearidade, foi utilizado uma solução estoque de CS ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ao qual foi preparada em DMSO:acetonitrila (1:1 v/v), estocada em frascos hermeticamente fechados e armazenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  por duas semanas. Após este tempo, uma curva padrão foi preparada utilizando a solução estoque, ao qual as concentrações definidas foram 1, 2.5, 5, 10, 15 and  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando a fase móvel acetonitrila:água acidificada (0.05% de ácido trifluoroacético pH= 3, 85:15 v/v) para a molécula CS-03 e a fase móvel acetonitrila:água acidificada (0.05% de ácido trifluoroacético pH= 3, 70:30 v/v) para a molécula CS-08. A curva padrão foi ajustada usando regressão linear de mínimos quadrados, ponderada pelo recíproco da concentração, considerando a área do pico do CS. Os resíduos foram calculados com base na diferença entre os valores teóricos e experimentais da curva padrão.

#### 5.5.4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Para a obtenção dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) seguimos as recomendações oficiais do ICH (2005) para produtos farmacêuticos utilizando a curva padrão das moléculas CS. O LOD foi obtido a partir do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva padrão realizada em triplicata multiplicado por 3,3 (sinal/ruído maior ou igual a 3,3), enquanto o LOQ foi calculado pela razão entre o desvio padrão de resposta e a inclinação da curva de calibração dos CS multiplicada por 10 (sinal/ruído maior ou igual a 10).

#### 5.5.4.1.4 Carry-over

O carry-over é a quantidade de resíduo do analito no equipamento após este ser analisado. Para investigar o carry-over, uma injeção contendo apenas a fase móvel do método foi injetada no HPLC-UV após injeção de uma concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da molécula. A presença de um possível resíduo do CS foi avaliada e calculada no cromatograma em branco. O teste foi realizado 6 vezes.

#### 5.5.4.1.5 Exatidão

A exatidão do método de HPLC-UV do CS foi realizada em triplicata utilizando 3 diferentes concentrações das moléculas (1, 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) diluídas na fase móvel. As porcentagens de recuperação foram determinadas calculando a razão entre as concentrações observadas e teóricas das moléculas.

#### 5.5.4.1.6 Precisão

A precisão foi avaliada utilizando solução estoque do CS diluídas com a fase móvel nas concentrações de 1, 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  na temperatura de 25 °C. A repetibilidade (intradia) e a precisão intermediária em dias separados (interdia) foram avaliadas, ambas por diferentes analistas. Para a repetibilidade foram utilizadas amostras frescas, preparadas nas 3 concentrações determinadas, quanto à precisão interdia, a avaliação ocorreu através da injeção das concentrações em dias diferentes. Três analistas diferentes realizaram a injeção das amostras CS nas concentrações de 1, 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para obter os resultados. A repetibilidade e a precisão intermediária foram expressas como desvio padrão relativo (%RSD).

#### 5.5.4.1.7 Robustez

Para avaliar a robustez do método, foi considerada uma variação de 5% nas condições finais definidas para o método cromatográfico, com variação em níveis baixo, médio ou alto, em que o fluxo, a temperatura da coluna e a fase móvel foram variadas de acordo com o especificado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Parâmetros analíticos e variações para análise de robustez do método de HPLC-UV para quantificação do CS-03.

<b>Parâmetros</b>	<b>Variações (Especificação)</b>		
Concentração da acetonitrila na fase móvel	80.75% (AA)	85% (Aa)	89.25% (aa)
Concentração da água acidificada na fase móvel	19.25% (BB)	15% (Bb)	10.75% (bb)
Temperatura da coluna	23.7 °C (CC)	25.0 °C (Cc)	26.3 °C (cc)
Fluxo da fase móvel	0.76 (DD)	0.80 (Dd)	0.84 (dd)

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 4 – Parâmetros analíticos e variações para análise de robustez do método de HPLC-UV para quantificação do CS-08.

<b>Parâmetros</b>	<b>Variações (Especificação)</b>		
Concentração da acetonitrila na fase móvel	66.5% (WW)	70.0% (Ww)	73.5% (ww)
Concentração da água acidificada na fase móvel	33.5% (XX)	30.0% (Xx)	26.5% (xx)
Temperatura da coluna	23.7 °C (YY)	25.0 °C (Yy)	26.3 °C (yy)
Fluxo da fase móvel	0.66 (ZZ)	0.70 (Zz)	0.74 (zz)

Fonte: O autor, 2022.

Um total de 27 corridas experimentais foram realizadas, para cada molécula, para o ensaio de robustez do método em HPLC-UV utilizando uma concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup>. As tabelas 5 e 6 apresentam as combinações dos parâmetros para cada corrida. Para determinar os efeitos das variáveis, foi calculada a razão entre as concentrações observadas e teóricas das moléculas.

Tabela 5 – Combinação fatorial de parâmetros analíticos de robustez do CS-03.

Combinação fatorial	Parâmetros analíticos				Referência
	Concentração da acetoneitrila na fase móvel	Concentração da água acidificada na fase móvel	Temperatura da coluna	Fluxo da fase móvel	
1	AA	BB	CC	DD	R1
2	AA	BB	Cc	DD	R2
3	AA	BB	cc	DD	R3
4	AA	BB	CC	Dd	R4
5	AA	BB	CC	dd	R5
6	AA	BB	cc	Dd	R6
7	AA	BB	cc	dd	R7
8	AA	BB	Cc	Dd	R8
9	AA	BB	Cc	dd	R9
10	Aa	Bb	CC	DD	R10
11	Aa	Bb	Cc	DD	R11
12	Aa	Bb	cc	DD	R12
13	Aa	Bb	CC	Dd	R13
14	Aa	Bb	CC	dd	R14
15	Aa	Bb	cc	Dd	R15
16	Aa	Bb	cc	dd	R16
17	Aa	Bb	Cc	Dd	R17
18	Aa	Bb	Cc	dd	R18
19	aa	bb	CC	DD	R19
20	aa	bb	Cc	DD	R20
21	aa	bb	cc	DD	R21
22	aa	bb	CC	Dd	R22
23	aa	bb	CC	dd	R23
24	aa	bb	cc	Dd	R24
25	aa	bb	cc	dd	R25
26	aa	bb	Cc	Dd	R26
27	aa	bb	Cc	dd	R27

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 6 – Combinação fatorial de parâmetros analíticos de robustez do CS-08.

Combinação fatorial	Parâmetros analíticos				Referência
	Concentração da acetonitrila na fase móvel	Concentração da água acidificada na fase móvel	Temperatura da coluna	Fluxo da fase móvel	
1	WW	XX	YY	ZZ	R1
2	WW	XX	Yy	ZZ	R2
3	WW	XX	yy	ZZ	R3
4	WW	XX	YY	Zz	R4
5	WW	XX	YY	zz	R5
6	WW	XX	yy	Zz	R6
7	WW	XX	yy	zz	R7
8	WW	XX	Yy	Zz	R8
9	WW	XX	Yy	zz	R9
10	Ww	Xx	YY	ZZ	R10
11	Ww	Xx	Yy	ZZ	R11
12	Ww	Xx	yy	ZZ	R12
13	Ww	Xx	YY	Zz	R13
14	Ww	Xx	YY	zz	R14
15	Ww	Xx	yy	Zz	R15
16	Ww	Xx	yy	zz	R16
17	Ww	Xx	Yy	Zz	R17
18	Ww	Xx	Yy	zz	R18
19	ww	xx	YY	ZZ	R19
20	ww	xx	Yy	ZZ	R20
21	ww	xx	yy	ZZ	R21
22	ww	xx	YY	Zz	R22
23	ww	xx	YY	zz	R23
24	ww	xx	yy	Zz	R24
25	ww	xx	yy	zz	R25
26	ww	xx	Yy	Zz	R26
27	ww	xx	Yy	zz	R27

Fonte: O autor, 2022.

#### 5.5.4.2 Obtenção das nanopartículas de Fucana-ETCA ou Dextrana-ETCA contendo os novos derivados indol-tiazólicos

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de polimerização em emulsão aniônica (AEP), de acordo com a metodologia realizadas por Lira e colaboradores 2011 e Cavalcanti e colaboradores 2021. Dessa forma, 50mg do polissacarídeo (fucana – FUC ou dextrana – DEX) foram diluídos em 5mL de água ultrapura, sendo posteriormente realizada correção do pH da solução para 2,5 utilizando ácido clorídrico 1M (HCl). A solução foi então mantida em agitação a 1200 rpm e então foram adicionados 100µL de etilcianoacrilato (ETCA). Após 1 minuto de agitação, uma solução dos compostos da série LQIT/CS (5mg/mL) em DMSO:Acetonitrila 1:1 v/v foi adicionada e mantida em agitação magnética durante 3 horas. Após o processo de polimerização, as nanopartículas obtidas foram dialisadas em uma membrana de diálise (membrana Spectra-por® 100.000 g/mol peso molecular cutoff (MWCO), Biovalley, Marne la Vall'ee, França) em 1 L de água destilada durante a noite, obtendo-se as CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA. Através dessa técnica também foram produzidas as nanopartículas sem conter os novos derivados sintetizados (NP-Dex-ETCA e NP-Fuc-ETCA) para possibilitar que fossem feitas comparações com os padrões nas análises futuras.

#### 5.5.4.3 Caracterização de nanopartículas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, carga superficial, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura

Os parâmetros das nanopartículas foram avaliados usando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument, EUA). Para esta análise, as nanopartículas foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:20 e lidas no equipamento a uma temperatura de 25°C e um ângulo fixo de 90°. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados por sua média e desvio padrão.

As análises de infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas utilizando 5 mg de LQIT/CS e nanopartículas (NP-Dex-ETCA, NP-Fuc-ETCA, CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA), bem como da mistura física (NP-Fuc-ETCA mais CS e NP-Dex-ETCA mais CS). Os espectros foram obtidos com uma resolução de 4cm<sup>-1</sup> na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> usando um FT-IR/FT-NIR (PerkinElmer, Spectrum 400). Os dados foram processados e os gráficos foram plotados no software Origin 8 (OriginLab Northampton, EUA).

Para a análise no microscópio eletrônico de varredura, inicialmente, as nanopartículas (NP-Dex-ETCA, NP-Fuc-ETCA, CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA) foram diluídas em água ultrapura (Milli Q®) na proporção de 1:10 (v/v) e seco em uma pastilha de silício a 37°C em estufa por 24 horas. Após a secagem, o *wafer* de silício foi fixado em *stubs* contendo fita de carbono e metalizado com ouro e paládio utilizando um metalizador (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100). As nanopartículas foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, MIRA3).

#### 5.5.5.4 Taxa de encapsulamento das CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA

A taxa de encapsulamento em ambas as nanopartículas (CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA) foi determinada usando um método de HPLC-UV validado e seguiu a metodologia proposta por Cavalcanti e colaboradores (2021). Uma alíquota de 50 µL de cada formulação (antes e após a diálise) foi dissolvida em 600 µL de DMSO e em um balão volumétrico o volume foi completado para 5 mL com a mistura de acetonitrila:água acidificada na proporção de 70: 30 v/v, sendo esta a fase móvel do método validado. A taxa de encapsulamento foi definida usando a seguinte equação:

$$\text{Taxa de Encapsulamento(\%)} = \left( \frac{PD \times 100}{BD} \right)$$

Onde PD é a concentração do LQIT/CS pós-diálise e BD é a concentração de LQIT/CS pré-diálise.

#### 5.5.5 Citotoxicidade de nanopartículas contendo os compostos da série LQIT/CS

A citotoxicidade de CS-NP-Dex-ETCA e CS-NP-Fuc-ETCA foi estudada utilizando também o ensaio MTT (Lira *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2021). Resumidamente, os macrófagos J774A.1 e a linhagem celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 foram adquiridos no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados em frasco de cultura (75 cm<sup>2</sup>) utilizando meio L-15 de Leibovitz e mistura de nutrientes F-12. (1:1 v/v) para MDA-MB-231 e meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para células de macrófagos J774A.1. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As experiências *in vitro* foram realizadas com células da 7<sup>a</sup> à 8<sup>a</sup> passagem.

### **5.5.6 Ensaio de captura celular das nanopartículas contendo os compostos da série LQIT/CS**

Para análise de captação celular foram utilizados macrófagos J774.1 e a linhagem celular de câncer de mama metastático (MDA-MB-231) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Inicialmente, as células foram cultivadas em meio DMEM para macrófagos e uma mistura de meio L-15 de Leibovitz e mistura de nutrientes F-12 (1:1 v/v) para MDA-MB-231, contendo 10% de FBS e 1% de antibióticos. (penicilina e estreptomicina), foram adicionados a uma placa de 24 poços (1 x 10<sup>5</sup> células/poço) contendo uma lamela de vidro redonda (8 mm de diâmetro). Após a adesão celular, as amostras das nanopartículas contendo os compostos, foram diluídas no mesmo meio utilizado para cultura celular, na concentração final de 10 µg.mL<sup>-1</sup>, foram inseridas nos respectivos poços. Células incubadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. As placas foram incubadas por 15 min, 1 e 3 horas a 37°C. Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS), as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (400 µL) por 20 min, seguido de nova lavagem com PBS. Em seguida, foram adicionados 400 µL de cloreto de amônio (50 mM) para bloquear a reatividade do aldeído, reagindo por 10 min. Finalmente, as células foram lavadas e a lamínula foi removida dos poços e selada em lâmina. As amostras foram observadas sob um microscópio de fluorescência (Zeiss Axio, Imager.M2m, objetiva de 40x, NA = 0,80) usando filtros DAPI (excitação 350/50 nm e emissão 460/50 nm) e Green Alexa488 (excitação 470/40 nm e 525 nm). /50 nm) filtros.

### **5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados experimentais foram expressos como média ± erro padrão (S.E.). Foi aplicado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) one-way e two-way, seguido do pós-teste de Tukey e Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 SEÇÃO QUÍMICA

#### 6.1.1 Síntese dos novos derivados indol-tiazólicos

A rota sintética estabelecida foi realizada em 3 etapas, obtendo com êxito os 08 novos derivados indol-tiazólicos, que formaram precipitados após adição de água no meio reacional e passaram apenas por processo de lavagem com éter etílico quando necessário para remoção de subprodutos.

#### 6.1.2 Características físico-químicas dos compostos sintetizados

Após obtenção dos compostos, todos foram submetidos a análises iniciais referentes às suas características físico-químicas, conforme observa-se na tabela 7.

Tabela 7. Características físico-químicas e rendimentos dos novos derivados indol-tiazólicos.

Composto	Cor do pó obtido	Rendimento (%)	Faixa de P.F. (° C)	Rf/Eluente (n-Hex/AcOEt)
CS-01	Branco	68,21	279-280	0,43 (6,5:3,5)
CS-02	Amarelo claro	45,83	269-271	0,55 (6,5:3,5)
CS-03	Vermelho	70,67	259-260	0,53 (6,5:3,5)
CS-04	Amarelo claro	75,62	272-274	0,62 (6:4)
CS-05	Amarelo claro	71	265-267	0,40 (6,5:3,5)
CS-06	Branco	33	255-256	0,69(6,5:3,5)
CS-07	Amarelo claro	49,8	295-296	0,66 (6:4)
CS-08	Amarelo escuro	50,41	247-249	0,54 (6:4)

n-Hex: n-Hexano; AcOEt: Acetato de etila. FONTE: O autor, 2022.

A coloração dos compostos variou de acordo com os substituintes contidos em suas moléculas, obtendo-se 4 diferentes tonalidades. Os rendimentos obtidos variaram entre 33% e 75,62%, sendo a maioria dos valores obtidos acima de 50%, todos os novos derivados apresentaram faixa de ponto de fusão variando no máximo 2°C e fatores de retenção avaliados por CCD entre 0,40 e 0,7 em mistura de *n*-Hexano e Acetato de Etila em diferentes proporções. Após a realização dessas análises

iniciais os compostos da série LqIT/CS foram caracterizados utilizando as técnicas de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e IV.

### 6.1.3 Caracterização por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN $^{13}\text{C}$ )

Considerando-se que as novas moléculas obtidas apresentam alto grau de similaridade, pois sofrem variações apenas na posição *para* (-p) do anel aromático ligado na posição quatro do anel tiazólico, sendo essa a porção da molécula que foi derivada de diferentes acetofenonas. O composto CS-01, será tomado como exemplo para explanação dos espectros, servindo como base para correlação com as demais moléculas (Figura 22). A presença de núcleos aromáticos favoreceu que alguns sinais ficassem muito próximos, mas ainda assim é possível realizar a caracterização dessa região.

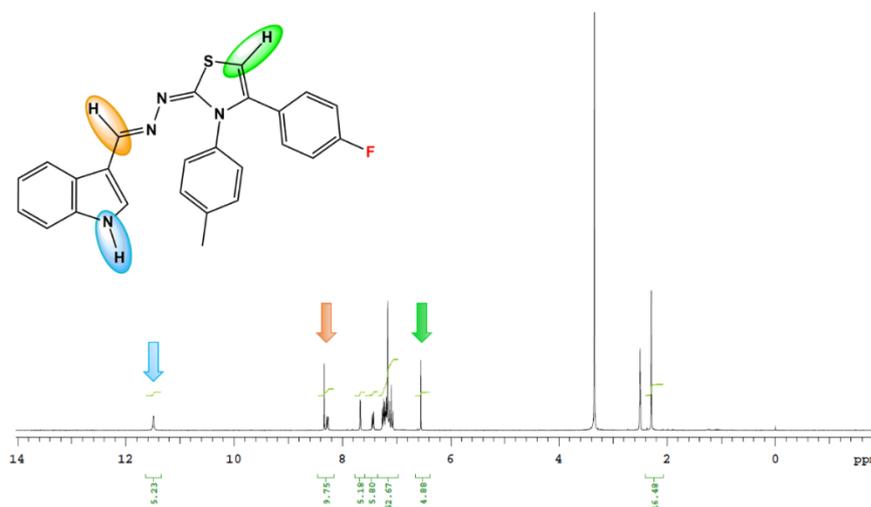
A quantidade de hidrogênios em cada um dos derivados CS foi confirmada por meio da análise de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz). Na região de campo baixo houve a presença de um sinal na forma de singlete, com valores aproximados de 11,50 ppm, esse sinal foi atribuído ao hidrogênio da porção indol, que por estar ligado a um átomo de nitrogênio, apresenta-se bastante desblindado, em alguns dos espectros esse singlete estava um pouco alargado, tal característica pode ter ocorrido devido à labilidade da ligação N – H, devido às transferências rápidas (alta frequência) dos prótons que acabam causando desacoplamento dos spins (Pedrosa, 2017).

Os hidrogênios pertencentes ao grupo metil da porção *p*-toluil, que está presente em todas as moléculas, foi constatado na forma de singlete integrando para 3 hidrogênios entre 2,29 ppm. O hidrogênio pertencente ao anel tiazol, ligado na posição C<sub>5</sub>, foi observado como um singlete em 6,55 ppm, indicando que houve formação desse núcleo heterocíclico (Silva, 2014). O hidrogênio da porção azometínica foi representado por um singlete em 8,33 ppm, como observado nas caracterizações de outros trabalhos do grupo de pesquisa (Pedrosa, 2017; Oliveira *et al.*, 2017). Além disso foi observado um multiplete integrando para dez hidrogênios, sendo eles da porção toluil, fenil e indol, todos ligados a carbonos sp<sup>2</sup>, estando em regiões que apresentam ambientes semelhantes devido à ressonância presente no anel aromático.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto CS-01 (Figura 22) mostra em destaque os sinais diagnósticos que indicam que houve a formação da molécula esperada. Em azul temos o hidrogênio do indol que está diretamente ligado ao heteroátomo, em

laranja temos o hidrogênio azometínico, ligado a um carbono sp<sup>2</sup> que está ligado a um nitrogênio e em verde o único hidrogênio do anel tiazol.

Figura 22. Espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H do composto CS-01



Fonte: O autor,2020

Os sinais característicos que indicam a formação dos derivados indol-tiazólicos estão listados na tabela 8, para cada um deles, evidenciando-se a proximidade entre os valores, o que já era esperado devido ao alto grau de similaridade em grande parte da molécula.

Tabela 8. Deslocamentos químicos em ppm dos sinais diagnósticos de RMN <sup>1</sup>H que indicam a formação dos derivados indol-tiazólicos

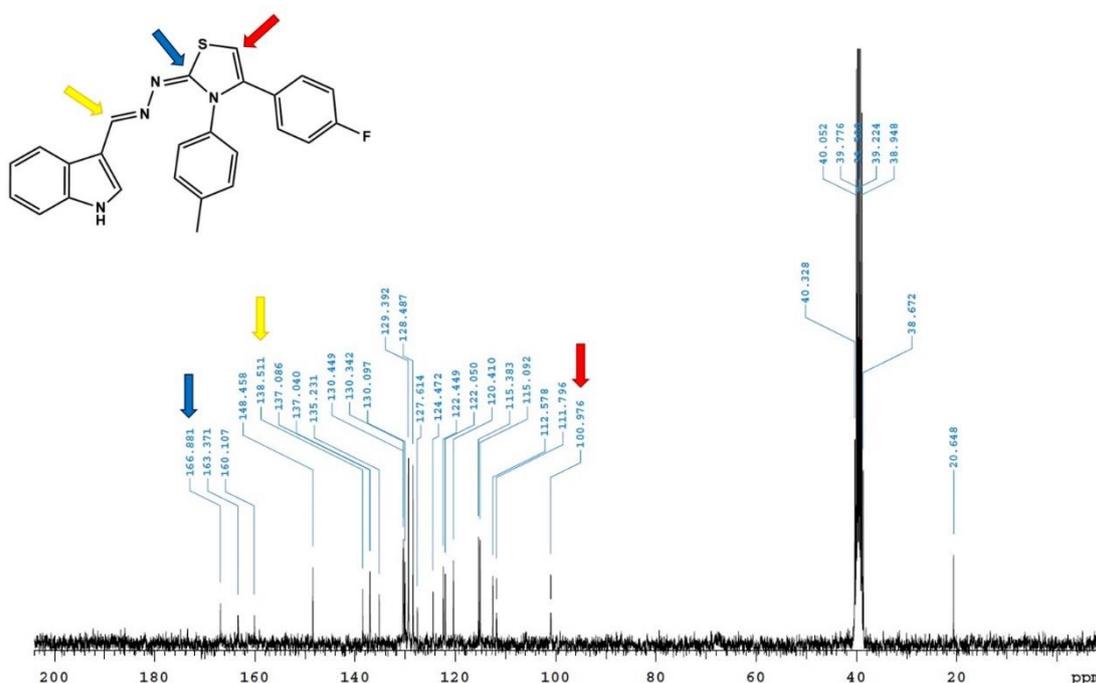
Composto	N-H (indol)	HC=N (Azometínico)	C-H (tiazol)
CS-01	11,48	8,33	6,55
CS-02	11,50	8,34	6,60
CS-03	11,51	8,37	6,88
CS-04	11,52	8,36	6,63
CS-05	11,48	8,34	6,55
CS-06	11,85	8,58	7,23
CS-07	11,53	8,37	6,77
CS-08	11,52	8,35	6,44

Fonte: O autor,2022

Os espectros evidenciando os descolamentos dos demais compostos sintetizados estão dispostos nos apêndices.

Os dados obtidos pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100MHz) permitiram a identificação de todos os carbonos das moléculas, apresentando deslocamentos químicos em concordância com as estruturas propostas. Foram destacados os sinais referentes ao C<sub>5</sub> (CH) e C<sub>2</sub> (N=C-S), ambos do anel tiazólico, além do C azometínico (HC=N), indicando a formação dos novos derivados, corroborando com os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  e com outros trabalhos do grupo de pesquisa do LQIT (Pedrosa, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Lafayette *et al.*, 2017). Na figura 23 podem ser observados os carbonos destacados utilizando seta amarela para o C azometínico, seta azul para o C<sub>2</sub> do tiazol e seta vermelha para o C<sub>5</sub> desse mesmo anel.

Figura 23. Espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto LqIT/CS-01



Fonte: O autor, 2020

Os sinais diagnósticos destacados para o CS-01 também foram destacados para os demais compostos dessa série de moléculas. A tabela 9 apresenta os valores dos deslocamentos químicos obtidos, onde observa-se o mesmo padrão, o carbono azometínico variando entre 138,34-139,96 ppm, o C<sub>2</sub> variando entre 166,51 e 167,86 ppm, e o C<sub>5</sub> apresentando valores entre 100,14-110,66 ppm.

Tabela 9. Deslocamentos químicos em ppm dos sinais diagnósticos de RMN  $^{13}\text{C}$  que indicam a formação dos derivados indol-tiazólicos.

Composto	C <sub>2</sub> (tiazol)	C <sub>5</sub> (tiazol)	HC=N (Azometínico)
CS-01	166,88	100,97	138,51
CS-02	166,77	101,72	138,34
CS-03	166,51	105,12	138,84
CS-04	167,28	102,28	138,91
CS-05	166,98	100,96	139,59
CS-06	167,86	110,66	139,96
CS-07	167,18	103,94	138,63
CS-08	167,60	100,14	148,75

Fonte: O autor, 2022

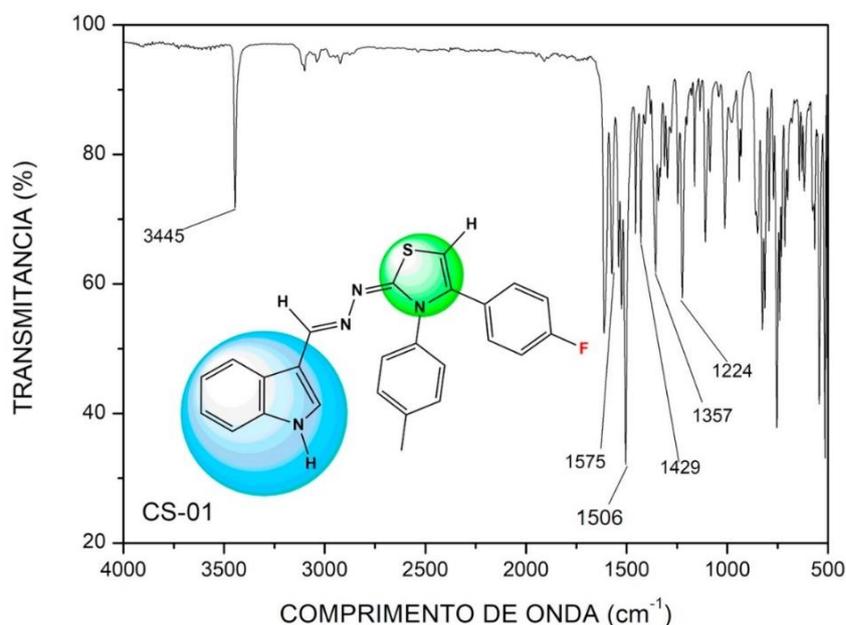
Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos demais compostos evidenciando seus respectivos deslocamentos químicos encontram-se dispostos nos apêndices.

#### 6.1.4 Caracterização por infravermelho por transformada de Fourier

Utilizando a técnica de infravermelho foi possível identificar as bandas de absorção que caracterizam grupos característicos dos compostos sintetizados. No composto CS-01, a ligação NH foi evidenciada como uma banda de média intensidade em  $3445\text{ cm}^{-1}$ , além de outras ligações como do carbono azometínico com o nitrogênio (C=N) na forma de uma banda de forte intensidade em  $1541\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ , a ligação referente ao C=N exocíclico que apresentou uma banda de média intensidade em  $1429\text{ cm}^{-1}$ , o grupo NCS foi identificado por uma banda de média intensidade em  $1357\text{ cm}^{-1}$  e uma outra banda de média intensidade em  $1224\text{ cm}^{-1}$  caracterizando a ligação N-N=C (Figura 24).

As demais bandas observadas caracterizam a presença de ligações C=C de carbonos aromáticos, como também foi observado nos trabalhos de Silva (2009), Pedrosa (2017), Oliveira e colaboradores (2017) e Galdino e colaboradores (2019).

Figura 24. Espectro de infravermelho do CS-01



Fonte: O autor,2022

Os espectros das demais moléculas da série sintetizada encontram-se nos apêndices. Na tabela 10 estão apresentadas as bandas observadas pela técnica de infravermelho que representam os sinais diagnósticos que corroboram com os dados previamente obtidos indicando a formação dos novos derivados indol-tiazólicos, seguindo sempre o padrão apresentado e detalhado acima do composto CS-01.

Tabela 10. Sinais diagnósticos de IV para caracterização dos novos derivados da série CS em  $\text{cm}^{-1}$ .

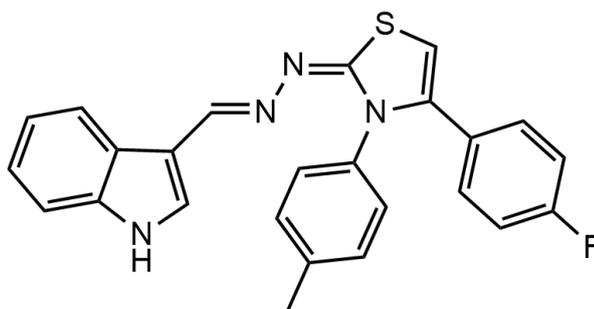
Composto	N-H (indol)	C=N (Azometínico)	C=N (Exocíclico)	N-N=C	N=C-S
CS-01	3445	1541-1575	1429	1224	1357
CS-02	3307	1543-1557	1428	1220	1321
CS-03	3307	1542	1427	1196-1247	1325
CS-04	3190	1558-1576	1440	1247	1356
CS-05	3154-3104	1542-1568	1444	1248	1359
CS-06	3173	1539	1441	1357	1298
CS-07	3178	1575-1537	1440	1323	1372
CS-08	3338	1575-1538	1440	1247	1335

Fonte: O autor,2022

### 6.1.5 Dados espectroscópicos e espectrométricos dos derivados indol-tiazólicos

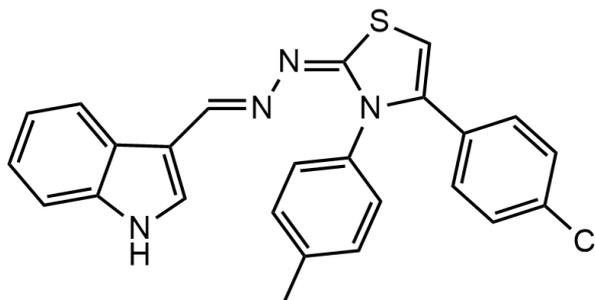
Os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos das moléculas foram reportados em ppm e a representação da multiplicidade, em seus respectivos deslocamentos químicos, foi da seguinte forma: singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m).

#### **2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-4-(4-fluorofenil)-3-(p-toluil)-2,3-dihidrothiazol (CS-01)**



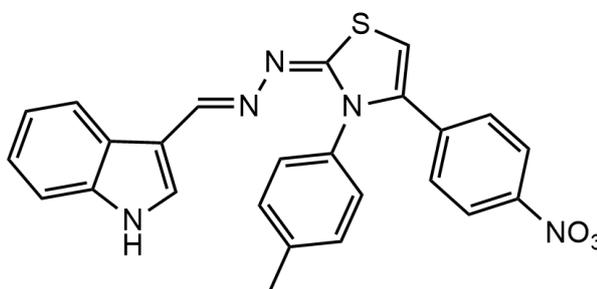
- Fórmula molecular: C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>4</sub>S
- Massa molecular: 426,51 g/mol
- RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz): δ = 11,48 (s, 1H, NH); 8,33 (s, 1H, HCN); 8,27 (dd, 1H, J=8Hz e 4Hz, indol); 7,66 (d, 1H, J=4Hz, indol); 7,43 (dd, 1H, J=8Hz e 4Hz, indol); 7,06-7,26 (m, 10H, p-F-fenil, p-toluil, indol); 6,55 (s, 1H, tiazol); 2,29 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz): δ = 166,88 (C<sub>2</sub> tiazol); 163,37 (C-F); 160,10 (C=NH); 148,45 (HC=N); 138,51-130,09 (C aromáticos); 129,39-127,61 (C-indol); 124,47-111,79 (C fenil e p-toluil); 100,97 (C<sub>5</sub> tiazol); 20,46 ppm (CH<sub>3</sub>).
- IV (KBr): cm<sup>-1</sup> = 3445 (N-H), 1541-1575 (C-N azometínico), 1429 (C=N exocíclico), 1357 (NCS), 1224 (N-N=C).

#### **2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-4-(4-clorofenil)-3-(p-toluil)-2,3-dihidrothiazol (CS-02)**



- Fórmula molecular:  $C_{25}H_{19}ClN_4S$
- Massa molecular: 442,96 g/mol
- RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 600MHz):  $\delta$  = 11,50 (s longo, 1H, NH); 8,36 (s, 1H, HCN); 8,29 (dd, 1H, J=12Hz e 6Hz, indol); 7,84 (dd, 1H, , J=12Hz e 6Hz, indol); 7,67 (d, 1H, J=6Hz, indol), 7,65-7,63(m, 2H, indol); 7,57 (d, 2H, J=12Hz, fenil); 7,46-7,21 (m, 6H, p-toluil, indol); 6,63 (s, 1H, tiazol); 2,30 ppm (s, 3H,  $CH_3$ ).
- RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 150MHz):  $\delta$  = 166,77 ( $C_2$  tiazol), 148,59 (HCN); 138,34 (CH-NH); 137,07-130,15 (C aromáticos); 129,80-128,30 (C indol); 124,47-111,79 (C fenil, p-toluil); 101,72 ( $C_5$  tiazol); 20,64 ppm ( $CH_3$ ).
- IV (KBr):  $cm^{-1}$  = 3307 (N-H), 1543-1557 (C-N azometínico), 1428 (C=N exocíclico), 1321 (NCS), 1220 (N-N=C).

**2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-4-(4-nitrofenil)-3-(p-toluil)-2,3-dihidrotiazol (CS-03)**

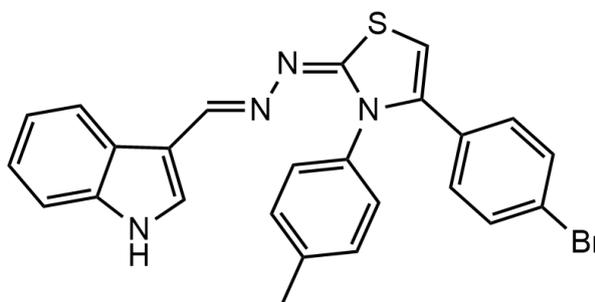


- Fórmula molecular:  $C_{25}H_{19}N_5O_2S$
- Massa molecular: 453,52 g/mol
- RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300MHz):  $\delta$  = 11,51 (s, 1H, NH); 8,37 (s, 1H, HCN); 8,26-8,28 (m, 1H, indol); 8,06-8,09 (d, 2H, J=9Hz, p-nitro); 7,69 (d, 1H, J=3Hz,

indólico); 7,43-7,46 (d,2H J=9Hz, indólico e *p*-toluil); 7,15-7,23 (m, 7H, *p*-nitro e *p*-toluil); 6,88 (s, 1H, tiazol); 2,29 ppm (s, 3H, metila).

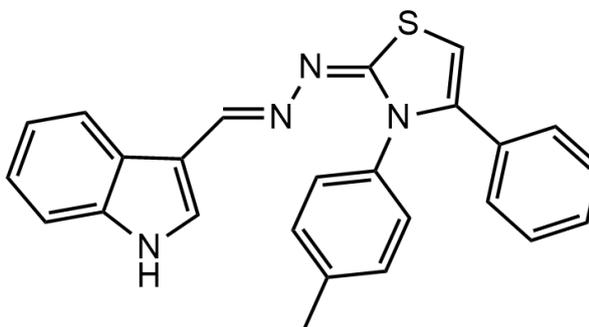
- RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  = 166,51 ( $\text{C}_2$  tiazol), 149,10 (C- $\text{NO}_2$ ); 146,63 (HCN); 138,84 (C azometínico); 137,68-129,79 (C aromático); 129,57-128,21 (C indol); 124,45-111,85 (C fenil, *p*-toluil); 105,12 ( $\text{C}_5$  tiazol); 20,66 ppm ( $\text{CH}_3$ ).
- IV (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  = 3307 (N-H), 1542 (C-N azometínico), 1427 (C=N exocíclico), 1325 (NCS), 1196-1247 (N-N=C).

**2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-4-(4-bromofenil)-3-(*p*-toluil)-2,3-dihidrotiazol (CS-04)**



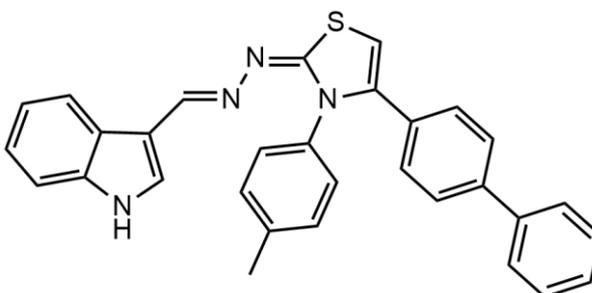
- Fórmula molecular:  $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{BrN}_4\text{S}$
- Massa molecular: 487,41 g/mol
- RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600MHz):  $\delta$  = 11,53 (s, 1H, NH); 8,36 (s, 1H, HCN); 8,28-8,30 (d, 1H, J=12Hz, indol); 7,69 (s, 1H, indol), 7,44-7,46 (d, 2H, J=12Hz, indólico e *p*-toluil), 7,13-7,21 (m, 9H, *p*-bromo e *p*-toluil), 6,63 (s, 1H, tiazol), 2,30 ppm (s, 3H, metila).
- RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150MHz):  $\delta$  = 167,28 ( $\text{C}_2$  tiazol), 149,12 (HC=N); 138,91 (C azometínico); 138,72-135,68 (C aromáticos); 131,70-126,26 (C-indol); 124,98-112,30 (C fenil, *p*-toluil); 102,28 ( $\text{C}_5$  tiazol), 21,14 ppm ( $\text{CH}_3$ ).
- IV (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  = 3190 (N-H), 1576-1558 (C-N azometínico), 1440 (C=N exocíclico), 1356 (NCS), 1247 (N-N=C).

**2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono) -4-fenil-3-(p-toluil) -2,3-dihidrotiazol (CS-05)**



- Fórmula molecular: C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>S
- Massa molecular: 408,52 g/mol
- RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz): δ = 11,48 (s, 1H, NH); 8,34 (s, 1H, HCN); 8,27-8,30 (d, 1H, J=9Hz, indol); 7,67 (s, 1H, indolico); 7,42-7,45 (d, 1H, J=9Hz, indólico); 7,15-7,23 (m, 11H, fenil, indólico, p-toluil); 6,55 (s, 1H, tiazol); 2,28 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d, 100MHz): δ = 166,98 (C<sub>2</sub> tiazol); 148,39 (HC=N); 139,59(C azometínico); 137,05-130,06 (C aromáticos); 129,31 – 128,05 (C indol); 124,45-111,78 (C fenil e p-toluil); 100,96(C<sub>5</sub> tiazol), 20,61 ppm (CH<sub>3</sub>).
- IV (KBr): cm<sup>-1</sup> = 3154-3104 (N-H), 1568-1542 (C-N azometínico), 1444 (C=N exocíclico), 1359 (NCS), 1248 (N-N=C).

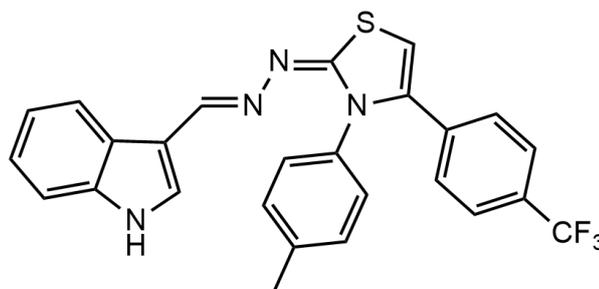
**2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-4-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(p-toluil)-2,3-dihidrotiazol (CS-06)**



- Fórmula molecular: C<sub>31</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>S
- Massa molecular: 484,61 g/mol

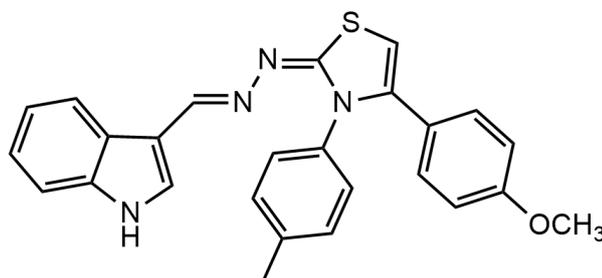
- RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300MHz):  $\delta$  = 11,85 (s, longo, 1H, NH); 8,58 (s, 1H, HCN); 8,18-8,21 (dd, 1H,  $J=9\text{Hz}$  e  $3\text{Hz}$ , indol); 7,93-7,94 (d, 1H,  $J=3\text{Hz}$ , indol); 7,65-7,66 (d, 1H, indol); 7,60-7,63 (d, 1H,  $J=9\text{Hz}$ , indol); 7,23-7,52 (m, 15H, *p*-fenil, indol, toluil,  $\text{C}_5$  tiazólico); 2,35 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).
- RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$  = 167,86 ( $\text{C}_2$  tiazol), 149,04 (HCN); 141,28-137,27 (C aromáticos); 132,96 (C azometínico); 130,57-121,20 (C fenil e indólicos); 110,66 ( $\text{C}_5$  tiazol); 20,83 ppm ( $\text{CH}_3$ ).
- IV (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  = 3173 (N-H), 1539 (C-N azometínico), 1441 (C=N exocíclico), 1357 (NCS), 1298 (N-N=C).

**2-(1H-indol-3-il)metileno-hidrazono)-3-(*p*-toluil)-4-(4-(trifluorometil)fenil)-2,3-dihidrotiazol (CS-07)**



- Fórmula molecular:  $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_4\text{S}$
- Massa molecular: 476,52 g/mol
- RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 600MHz):  $\delta$  = 11,53 (s, 1H, NH); 8,37 (s, 1H, HCN); 8,28-8,29 (d, 1H,  $J=6\text{Hz}$ , indol); 7,70 (m, 1H, indol); 7,62-7,63 (d, 2H,  $J=6\text{Hz}$ ); 7,45-7,46 (d, 1H,  $J=6\text{Hz}$ , indol); 7,41-7,43 (d, 2H,  $J=12\text{Hz}$ , indol); 7,17-7,23 (m, 6H, *p*-trifluorometil e *p*-toluil); 6,77 (s, 1H, tiazol); 2,30 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).
- RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150MHz):  $\delta$  = 167,18 ( $\text{C}_2$  tiazol); 149,34 (HC=N); 138,63 (C azometínico); 137,60-130,76 (C aromáticos); 129,98 – 125,66 (C indol); 122,96-111,32 (C fenil e *p*-toluil); 103,94 ( $\text{C}_5$  tiazol), 21,14 ppm ( $\text{CH}_3$ ).
- IV (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  = 3178 (N-H), 1575-1537 (C-N azometínico), 1440 (C=N exocíclico), 1372 (NCS), 1323 (N-N=C).

**2-(1H-indol-3-il)metileno-hidrazono)-3-(p-toluil)-4-(4-(metoxi)fenil)-2,3-dihidrotiazol (CS-08)**



- Fórmula molecular: C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>OS
- Massa molecular: 438,54 g/mol
- RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 600MHz): δ = 11,52 (s, 1H, NH); 8,35 (s, 1H, HCN); 8,30-8,31 (d, 1H, J=6Hz, indol); 7,68 (s, 1H, indol); 7,45-7,46 (d, 1H, J=6Hz, indol); 7,22-7,16 (m, 6H, *p*-metóxi, *p*-toluil), 7,13-7,11 (d, 2H, J=12Hz, indol) 6,79-6,80 (d, 2H, J=6Hz, *p*-toluil), 6,44 (s, 1H, tiazol), 3,69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,30 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>).
- RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 150MHz): δ = 167,60 (C<sub>2</sub> tiazol), 159,55 (C-OCH<sub>3</sub>); 148,75 (C azometínico); 139-135,92 (C aromáticos); 130-128,99 (C indol); 125,00-112,29 (C fenil e *p*-toluil); 100,14 (C<sub>5</sub> tiazol), 55,57 (OCH<sub>3</sub>); 21,14 ppm (CH<sub>3</sub>).
- IV (KBr): cm<sup>-1</sup> = 3338(N-H), 1575-1538 (C-N azometínico), 1440 (C=N exocíclico), 1335 (NCS), 1247 (N-N=C).

## 6.2 ESTUDO *IN SILICO*

### 6.2.1 Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas

Um das ferramentas utilizadas para avaliação dos parâmetros físico-químicos são a regra de Lipinski, também conhecida como Regra dos cinco (RO5) e regra de Veber, através dos valores estipulados por esses pesquisadores torna-se possível identificar se as moléculas avaliadas possuem características que os classifiquem como um possível fármaco de administração por via oral. Os parâmetros obtidos *in silico* servem como dados preditivos e norteadores no planejamento de novos candidatos à fármacos (Veber *et al.*, 2002; Lipinski, 2004; Almeida Júnior *et al.*, 2019). Os dados obtidos após análise dos novos derivados indol-tiazólicos encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Verificação dos parâmetros físico-químicos de acordo com RO5 e Veber.

Composto	Massa molecular <sup>a</sup>	DLH <sup>b</sup>	ALH <sup>c</sup>	MLog P <sup>d</sup>	TPSA (Å <sup>2</sup> ) <sup>e</sup>	Ligações rotativas <sup>f</sup>
<b>CS-01</b>	426,51	1	3	4,65	73,68	4
<b>CS-02</b>	442,96	1	2	4,75	73,68	4
<b>CS-03</b>	453,52	1	4	3,19	119,50	5
<b>CS-04</b>	487,41	1	2	4,85	73,68	4
<b>CS-05</b>	408,52	1	2	4,28	73,68	4
<b>CS-06</b>	484,61	1	2	5,27	73,68	5
<b>CS-07</b>	476,52	1	5	5,00	73,68	5
<b>CS-08</b>	438,54	1	3	3,92	82,91	5

<sup>a</sup>SwissADME massa molecular; <sup>b</sup>SwissADME doadores de ligações de hidrogênio; <sup>c</sup>SwissADME aceptores de ligações de hidrogênio; <sup>d</sup>SwissADME log do coeficiente de partição octanol-água; <sup>e</sup>SwissADME cálculo da área de superfície polar topológica; <sup>f</sup>SwissADME número de ligações rotativas.  
 FONTE: O autor, 2022.

Analisando os dados obtidos pode-se verificar os compostos apresentam pesos moleculares entre 408,52 a 487,41g/mol, sendo todos abaixo de 500 g/mol, que é o valor estabelecido pela regra, quanto ao número de doadores de ligação de hidrogênio para todos os compostos foi igual a 1 e o limite máximo seria 5 (Lipinski, 2004). O número de aceptores de ligações de hidrogênio variou entre 2 e 5, de acordo com Lipinski esses valores devem ser iguais ou menores que 10, deixando todos os novos derivados dentro dos parâmetros (Lipinski, 2004; Almeida Júnior *et al.*, 2019).

Ao observar o MLog de P, que traz valores referentes a lipofilicidade dos compostos, e de acordo com a RO5 devem ser iguais ou menores que 5, nota-se que o composto CS-06 foi o único a violar um dos parâmetros da regra de Lipinski, pois apresentou um MLog P acima de 5, enquanto os outros sete compostos apresentaram valores entre 3,19 e 5,00, portanto, a única exceção foi o CS-06 que apresentou um MlogP de 5,27, tal valor pode ser atribuído devido à presença de um anel aromático (fenil) a mais que está presente em sua estrutura (Lipinski, 2004; Almeida Júnior *et al.*, 2019).

Os outros dois parâmetros apresentados na tabela 12 são analisados de acordo com Veber, ele estabelece que a TPSA deve ser igual ou menor que 140 Å<sup>2</sup>,

e o número de ligações rotacionáveis deve ser igual ou menor que 10 (Veber *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2021). Os valores encontrados para TPSA variaram entre 73,68 e 119,50, e número de ligações rotacionáveis variou entre 4 e 5, estando todos os compostos dentro dos valores estabelecidos por Veber. Os resultados obtidos na tabela 12 sugerem que os compostos analisados possuem uma boa biodisponibilidade oral e boa absorção intestinal (Veber *et al.*, 2002; Lipinski, 2004; Almeida Júnior *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2021).

### 6.2.2 Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas

Os dados obtidos na análise das características físico-químicas podem ser suplementados analisando mais fatores ligados à farmacocinética, que envolvem os processos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos sintetizados, bons resultados desses aspectos são importantes preditores para moléculas candidatas à fármaco e servem para identificar possíveis problemas no decorrer da pesquisa, obter esses dados previamente possibilita ganho de tempo e diminui custos (Pires, Blundell, Ascher, 2015; Larik *et al.*, 2019; Domínguez-Villa, 2021).

A avaliação de parâmetros farmacocinéticos *in silico*, permite que sejam obtidos previamente, e de maneira preditiva, dados referentes ao comportamento das moléculas em estudo dentro do organismo. A avaliação por meio de abordagens computacionais acelera o processo de obtenção de valores ligados aos processos de ADMET pode contribuir na análise de dados obtidos nos testes *in vitro* e *in vivo* (Almeida Júnior *et al.*, 2019; Domínguez-Villa, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021).

A avaliação de 31 parâmetros (Tabela 12) realizada forneceu informações relevantes, com dados que podem pressupor comportamentos farmacocinéticos indicando as possíveis melhores moléculas para prosseguimento da pesquisa, servindo como um filtro inicial na busca do melhor composto da série, bem como indicando fatores que serão desafios durante a pesquisa. A identificação desses fatores no início da pesquisa permite que, de acordo com os resultados obtidos, sejam estabelecidas metodologias complementares, novas abordagens e implementações tecnológicas em busca da otimização das características dos novos derivados indol-tiazólicos (Pires, Blundell, Ascher, 2015; Domínguez-Villa, 2021).

Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos ADMET dos novos derivados indol-tiazólicos.

Parameters	CS-01	CS-02	CS-03	CS-04	CS-05	CS-06	CS-07	CS-08	Unit
<b>Absorption</b>									
Solubilidade em água	-5.919	-5.906	-5.893	-5.905	-5.979	-5.649	-5.756	-5.783	Numérico (log mol/L)
Permeabilidade Caco2	1.069	1.023	0.344	1.021	1.031	0.983	1.036	1.071	Numérico (log Papp in 10 <sup>-6</sup> cm/s)
Absorção Intestinal	92.863	91.906	90.55 1	91.839	93.415	93.35	90.142	93.68	Numérico (%Absorção)
Permeabilidade cutânea	-2,737	-2.739	-2.735	-2.739	-2.74	-2.735	-2.737	-2.732	Numérico (log Kp)
Substrato Glicoproteína-P	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor Glicoproteína-P I	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor Glicoproteína-P II	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
<b>Distribution</b>									
VDss	0,126	0.177	-0,246	0.191	0.105	-0.315	0.197	0.228	Numérico (log L/kg)
Fração livre	0,220	0.204	0.202	0.204	0.203	0.286	0.194	0.195	Numérico (Fu)
Permeabilidade BBB	0,561	0.568	-0.739	0.566	0.615	0.551	0.626	0.392	Numérico (log BB)
Permeabilidade CNS	-0,656	-0.622	-1.346	-0.622	-0.633	-0.298	-0.578	-1.340	Numérico (log PS)
<b>Metabolism</b>									
Substrato CYP2D6	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Substrato CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor CYP2C19	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor CYP2C9	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Inibidor CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
<b>Excretion</b>									
Clearance Total	0,016	0.147	0.184	0.125	0.277	0.237	0.200	0.194	Numérico (log mL/min/kg)
Substrato Renal OCT2	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
<b>Toxicity</b>									
Toxicidade AMES	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)

Dose Máxima tolerada	0.709	0.694	0.601	0.694	0.708	0.490	0.686	0.689	Numérico (log mg/kg/dia)
Inibidor hERG I	Não	Categórico (Sim/Não)							
Inibidor hERG II	Sim	Categórico (Sim/Não)							
Toxicidade aguda oral em ratos	1.962	1.889	2.246	1.889	1.869	2.425	1.856	2.253	Numérico (mol/kg)
Toxicidade crônica oral em ratos	1.17	0.447	0.793	0.419	0.567	0.462	0.270	0.878	Numérico (log mg/kg_bw/dia)
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Sensibilização cutânea	Não	Categórico (Sim/Não)							
Toxicidade <i>T. Pyriformis</i>	0.287	0.287	0.285	0.287	0.287	0.285	0.286	0.287	Numérico (log µg/L)
Toxicidade em peixe	-2.478	-2.130	-2.259	-2.276	-1.623	-3.366	-1.736	-2.751	Numérico (log mM)

Fonte: O autor, 2022

A absorção é a primeira etapa da farmacocinética e alguns parâmetros são limitantes para que tal ação ocorra, como é o caso da solubilidade em água a 25°C (logS). Os valores preditivos de logS obtidos mostram que todos os compostos são moderadamente solúveis em água (-1 e -5), apresentando valores muito próximos entre eles, o que já era esperado por se tratar de moléculas orgânicas e pelo alto grau de similaridade entre elas. (Lambertucci *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019). A avaliação da permeabilidade celular Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano) é amplamente utilizada para prever a absorção de fármacos administrados por via oral, uma alta absorção está atribuída à valores de log Papp > 0,90 (Pires, Blundell, Ascher, 2015).

Apenas o composto CS-03 apresentou valor inferior ao especificado, o que pode ser explicado devido ao caráter iônico da porção que o diferencia dos demais compostos, que é o grupo nitro que apresenta por apresentar cargas (N<sup>+</sup> e O<sup>-</sup>) não consegue atravessar facilmente a membrana das células em estudo. Quanto aos demais compostos analisados, todos apresentaram valores acima de 0,98 indicando boa permeabilidade das moléculas através da mucosa dessas células (Cui *et al.*, 2016).

Avaliando-se a absorção intestinal, nota-se também que o CS-03 e o CS-07 foram os que apresentaram menores taxas de absorção intestinal quando comparado aos demais, mas para ser considerada como uma molécula com baixa absorção o percentual apresentado deve ser abaixo de 30%, o que está bem distante dos 90% apresentado pelos composto em questão, tal resultado leva à conclusão de que para o CS-03 a presença do grupo nitro pode promover uma diminuição da absorção intestinal do composto, devido a ionização que esse grupo sofre no ambiente biológico (Cui *et al.*, 2016).

Na estrutura do CS-07 temos um grupo trifluorometil que segundo Boechat, Pinto e Bastos (2015), contribui para um aumento da lipofilicidade, fator que contribui para uma melhor absorção intestinal, apesar de ter apresentado um dos valores mais baixos para esse parâmetro em análise computacional. Dessa forma, apesar do efeito do grupo nitro no CS-03 e do grupo trifluorometil no CS-07, todos esses compostos apresentam alta capacidade para atravessar a barreira intestinal ( Larik *et al.*, 2019).

Somado a esses parâmetro temos a permeabilidades cutânea que é considerada relevante para o desenvolvimento de drogas desenvolvidas para administração transdérmica, esse parâmetro considera a constante de

permeabilidade da pele  $\log K_p$ , quando este valor está acima de -2,5, considera-se o composto apresentando baixa permeabilidade cutânea, tal comportamento pode ser observado em todas as moléculas estudadas, pois apresentaram  $\log K_p$  variando em torno de -2,7, o que reforça uma via de administração que não seja a transdérmica ou a possibilidade de implementação de ferramentas da tecnologia farmacêutica que possibilitem a administração por essa via (Larik *et al.*, 2019).

A análise *in silico* da interação entre as moléculas estudadas e a glicoproteína P podem fornecer dados relevantes, tendo em vista que além de estar relacionada à possíveis interações medicamentosas, essa proteína está associada a casos de resistência a múltiplas drogas por funcionar como um mecanismo de expulsão de xenobióticos, influenciando diretamente na diminuição da biodisponibilidade (Lu *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022). Os resultados obtidos são categóricos e indicam a possibilidade de que os compostos testados atuem como substrato para essa enzima, ou como inibidores de glicoproteína P I/II. Os testes iniciais indicam que todos os compostos da série em estudo podem servir como substratos e todas também podem inibir essa enzima, sendo necessária a realização de testes mais conclusivos como por exemplo o docking molecular que pode esclarecer melhor essas interações entre os compostos e a glicoproteína P (Lu *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

Avaliando *in silico* a etapa de distribuição, correlacionando o volume de distribuição aparente ( $VD_{ss}$ ) e a fração livre (FI) torna-se possível entender como ocorre a distribuição de uma molécula e determinar quantitativamente a porção da molécula que não está ligada às proteínas plasmáticas (Almeida Júnior *et al.* 2019). Os valores de  $VD_{ss} > 0,45$  indicam uma maior distribuição nos tecidos enquanto valores de  $VD_{ss} < -0,15$  indicam uma maior distribuição no plasma (Lambertucci *et al.*, 2018).

Entre os compostos da série LQIT/CS, apenas os derivados CS-03 e CS-06 apresentaram valores de  $VD_{ss}$  abaixo de -0,15, isso estabelece que ocorre uma maior distribuição no plasma, importante notar que ambos são os pontos extremos de lipofilicidade, sendo o CS-03 o menos lipofílico, e a maior hidrofiliicidade tende a deixar a molécula no plasma, enquanto o CS-06 é o que apresenta maior força de ligação com a albumina, o que justifica sua maior permanência no plasma (Milosevic *et al.*, 2017; Merzouki *et al.*, 2022). Todos os outros compostos apresentam valores intermediários de  $VD_{ss}$ , o que os torna distribuídos mais uniformemente entre os tecidos e o plasma em comparação com o CS-03 e CS-06.

Quanto a fração livre os valores variaram entre 0,194 e 0,286, que são considerados como bons resultados de fração livre, indicando que as moléculas estarão disponíveis em boas quantidades para uma possível atuação sobre o alvo farmacológico (Almeida Júnior *et al.* 2019).

A permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BHE) fornece dados relevantes que auxiliam no entendimento da ação da molécula, efeitos colaterais e conseqüentemente uma possível toxicidade. Através da análise computacional pelo pkcsm, as moléculas que apresentam valores de logBB acima de 0,3 atravessam prontamente a BHE, enquanto as que apresentam logBB abaixo de -1 são mal distribuídas para o cérebro (Speciale *et al.*, 2021).

Das moléculas avaliadas apenas o CS-03 apresentou valores negativos, tal fato pode estar diretamente relacionado a ionização que ocorre em sua estrutura molecular, que já foi fator interferente em outras propriedades para essa molécula (Cui *et al.*, 2016). O CS-08, apresentou valores acima de 0,3, o que reflete uma possível capacidade de atravessar a BHE, os demais compostos apresentaram valores muito próximo entre si, em torno de 0,5 e 0,6, sendo todos, portanto caracterizados como moléculas que atravessam a BHE, o que pode levar a efeitos colaterais ou algum nível de toxicidade, mas tratam-se de dados preliminares que necessitam de mais estudos para serem de fato esclarecidos (Speciale *et al.*, 2021; Merzouki *et al.*, 2022).

Corroborando com os resultados de permeabilidade da BBB, a análise da permeabilidade do sistema nervoso central (SNC), mostrou que os compostos possuem tal capacidade pois apresentam valores de logPS maiores que -2, é importante notar que os compostos CS-03 e CS-08, mais uma vez se destacam apresentando valores dissonantes dos demais compostos da série, mostrando que mesmo apresentado determinada capacidade ela é cerca de duas vezes menor quando comparada com os demais compostos, excluindo-se o CS-06, que é o composto mais lipofílico da série, que chegou a violar a regra de Lipinski, e apresenta como esperado, uma maior capacidade de atingir o SNC (Speciale *et al.*, 2021; Merzouki *et al.*, 2022).

Analisando as moléculas sintetizadas quanto à capacidade de inibir o citocromo P450, um importante complexo enzimático de metabolização e desintoxicação do organismo, foi possível observar a presença ou ausência do efeito inibitório da molécula sobre diferentes isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). Todos os compostos se comportaram como substrato do CYP3A4,

importante metabolizador de fármacos, e apenas o composto CS-06 não realiza a inibição desse complexo enzimático, o que sugere uma maior atenção para os demais compostos quanto aos parâmetros relacionados a hepatotoxicidade (Kumar, Sharma, Roychowdhury, 2012; Yamaki *et.al*, 2017; Govindarão *et al.*, 2022).

Os parâmetros referentes a excreção foram o Clearance total (CT) (medida de eliminação hepática e renal das substâncias) e a capacidade de inibir o transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), que promove a eliminação de compostos endógenos e de vários fármacos utilizados na clínica, a inibição pode comprometer a liberação dessas substâncias bem como evidenciar contraindicações potenciais, principalmente se outros inibidores de OCT2 forem administrados concomitantemente. Nenhum dos compostos avaliados atuam como substratos do OCT2, e quanto aos valores de CT, o composto que apresentou o menor valor foi o CS-01, sendo cerca de dez vezes menor em comparação com os demais compostos, o que pode levar a um maior tempo circulante dentro do organismo.

O estudo da toxicidade *in silico* possui elevada importância e, por isso, deve ser avaliado nas etapas iniciais de desenvolvimento de uma molécula candidata à fármaco até a possível comercialização como medicamento inovador. O teste de AMES consiste na avaliação da atividade mutagênica das moléculas (Naven *et al.*, 2010; Matias *et al.*, 2017). De acordo com os dados obtidos quatro dos compostos apresentam potencial atividade mutagênica (LqIT/CS-01,04,07 e 08).

A dose máxima tolerada para a maioria dos compostos variou entre 0,6 e 0,7 log (mg/kg/dia), o que é considerado uma dose alta, a única exceção foi o CS-06 que apresentou uma dose um pouco inferior no valor de 0,490, para esse parâmetro considera-se um valor baixo quando é inferior a 0,477, o que classifica o CS-06 com uma dose moderada.

A possibilidade de inibição dos canais de potássio codificados pelo gene hERG (*human ether-a-go-go gene*) está correlacionada ao desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido, que conseqüentemente conduz à arritmia ventricular fatal, os compostos avaliados apresentaram resultados inconclusivos para esse parâmetro, pois apesar de todos serem preditivamente caracterizados como inibidores do hERG II, não foram constatados como inibidores do hERG I (Garrido *et al.*,2020).

Além de outros fatores ligados à toxicidade, foi avaliado o potencial de hepatotoxicidade, já que tal parâmetro está associado a possíveis problemas sérios associados a medicamentos (Björnsson, 2008) e verificou-se que, com exceção do

composto LqIT/CS-06, todos os demais apresentam uma potencial toxicidade hepática, sugerindo que devem ser estudados de maneira mais cuidadosa e profunda na tentativa de elucidar melhor os dados obtidos e possíveis mecanismos envolvidos (Matias *et al.*, 2017). Por fim, também foi avaliado o potencial de sensibilização da pele e concluiu-se que com exceção do LqIT/CS-01 os demais compostos não provocam efeito sensibilizante na pele (Larik *et al.*, 2019).

### 6.3 ANÁLISES *IN VITRO*

#### 6.3.1 Interações com DNA e BSA

Para realização dos testes de interação, inicialmente foram realizadas as varreduras dos compostos na região de 200 a 600nm, onde os compostos apresentaram absorção entre 320 e 420nm, corroborando com resultados já descritos na literatura, pois apresentam em suas estruturas químicas anéis aromáticos, heterocíclicos insaturados e/ou grupos de átomos portadores de pares de elétron desemparelhados (Lakowicz, 2016). Todos os compostos foram fixados na concentração de 20 $\mu$ M para realização de interação, foi possível obter o perfil absorptivo de todos os compostos, enquanto os perfis de fluorescência só foram obtidos para sete dos oito compostos, a única exceção foi o CS-04.

##### 6.3.1.1 Interação com o ssDNA

###### 6.3.1.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os compostos da série LqIT/CS's fixados a concentração de 20 $\mu$ M foram expostos a quantidades crescentes de ssDNA (0 a 100 $\mu$ M). Após a verificação dos gráficos foi possível observar a presença dos efeitos hipercrômico (Baltazar *et al.*, 2018), hipocrômico e hipsocrômico (Almeida *et al.*, 2015). A presença desses efeitos indica uma possível formação de um complexo DNA-ligante, servindo como dados iniciais para elucidação do mecanismo de ação pelo qual ocorre a interação de pequenas moléculas com o DNA (Almeida *et al.*, 2015; Lafayette *et al.*, 2017; Baltazar *et al.*, 2018).

Os dados obtidos estão presentes na tabela 13, onde podemos comparar a absorção máxima dos compostos livres e interagindo com o ssDNA, além de observar o valor da constante de ligação ( $K_b$ ) de cada um desses dos compostos, o que serve como parâmetro de força de interação entre moléculas e o DNA, sendo aplicado para comparar moléculas estruturalmente diferentes, além de indicar os modos de ligação

ao DNA (Mcghee; Hippel, 1974; Plsikova *et al.*, 2012; Lafayette *et al.*, 2017). Os valores referentes a intercaladores típicos estão compreendidos no intervalo entre  $10^4$  e  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Thalmilarasan *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017). Os espectros de absorção dos compostos interagindo com o DNA encontram-se nos apêndices.

Tabela 13. Dados espectroscópicos de absorção UV-Vis dos compostos LqIT/CS's livres e interagindo com o ssDNA

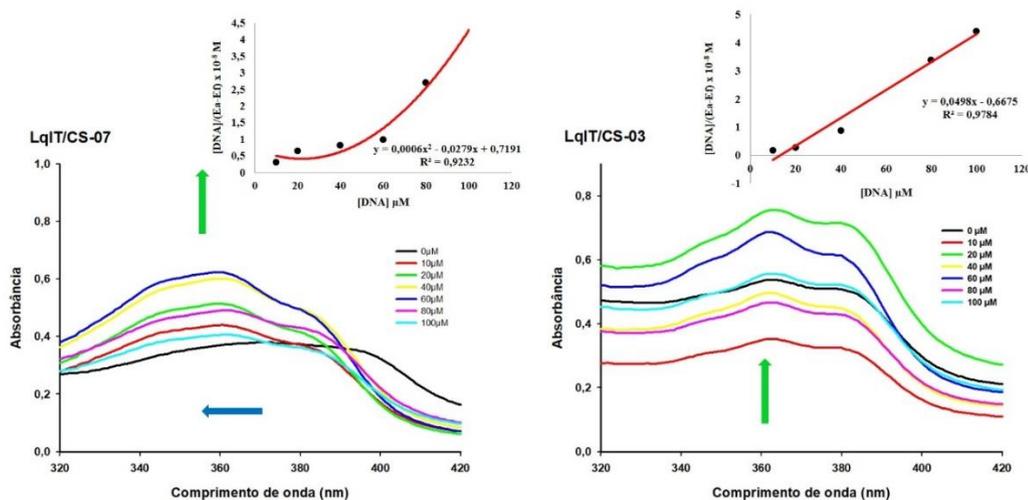
Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercromismo (%) <sup>a</sup>	Hipocromismo (%) <sup>b</sup>	Kb(M <sup>-1</sup> )	R
CS-01	367	366	1	22,61	-	$6,26 \times 10^4$	<i>p</i> -F
CS-02	365	366	1	-	7,24	$3,11 \times 10^4$	<i>p</i> -Cl
CS-03	363	363	0	29,06	-	$3,07 \times 10^4$	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>
CS-04	363	363	0	16,13	-	$3,71 \times 10^5$	<i>p</i> -Br
CS-05	368	366	2	17,88	-	$6,78 \times 10^5$	<i>p</i> -H
CS-06	364	363	1	-	27,47	$8,81 \times 10^4$	<i>p</i> -Ph
CS-07	369	361	8	29,29	-	$4,08 \times 10^4$	<i>p</i> -CF <sub>3</sub>
CS-08	367	367	0	-	3,22	$3,95 \times 10^4$	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>

a. Hipercromismo resultante da interação entre os compostos da série LqIT/CS's e 20 $\mu$ M de ssDNA em comparação aos compostos livres. b. Hipocromismo resultante da interação entre os compostos da série LqIT/CS's e 20 $\mu$ M de ssDNA em comparação aos compostos livres. Fonte: O autor, 2022.

A presença dos efeitos hiper ou hipocrômicos caracteriza alterações estruturais na dupla hélice do DNA, quando está interagindo com outras moléculas (Lafayette, 2013; Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013). Foi observado que cinco dos oito compostos apresentaram hipercromismo e apenas três deles apresentaram hipocromismo. O CS-07 apresentou a maior variação no comprimento de onda, caracterizando um deslocamento para uma região com comprimento de ondas menores, caracterizando um efeito hipsocrômico, que pode estar relacionado a presença dos três átomos de flúor presentes no substituinte retirador de elétrons trifluorometil (CF<sub>3</sub>). Esta molécula ainda apresentou a maior elevação no pico de absorção quando conjugada ao DNA, semelhante ao perfil encontrado na avaliação do fármaco Flutamida (Temerk; Ibrahim, 2015), medicamento antitumoral utilizada no combate ao câncer de próstata que também apresenta em sua estrutura o substituinte (CF<sub>3</sub>).

Entre os demais compostos que apresentaram hipercromismo, o CS-03, apresentou uma taxa de 29,06% muito próxima do CS-07 (Figura 25), outros três compostos apresentaram taxas de 16, 17 e 22%, sendo respectivamente valores referentes ao CS-04, CS-05 e CS-01, tal característica sugere que a presença do aumento desse pico absorptivo está relacionada a ligações com o ssDNA por ligações parciais, por contatos externos via fosfato ou nos sulcos (Arshad *et al.*, 2017; Baltazar *et al.*, 2018). A maior intensidade desse tipo de interação ocorre quando há presença de fortes cargas positivas, neste caso o fato de ambas moléculas (CS-07 e CS-03) apresentam em comum a substituição com grupamentos que são fortes retiradores de elétrons, nas posições *p*-trifluorometil e *p*-nitro, respectivamente, está diretamente relacionada ao perfil apresentado (Arjmand; Jamsheera, 2011)

Figura 25. Espectros de absorção dos compostos LqIT/CS-07 e LqIT/CS-03 na presença de quantidades crescentes de ssDNA. [DNA]=0,10,20,40,60,80,100.



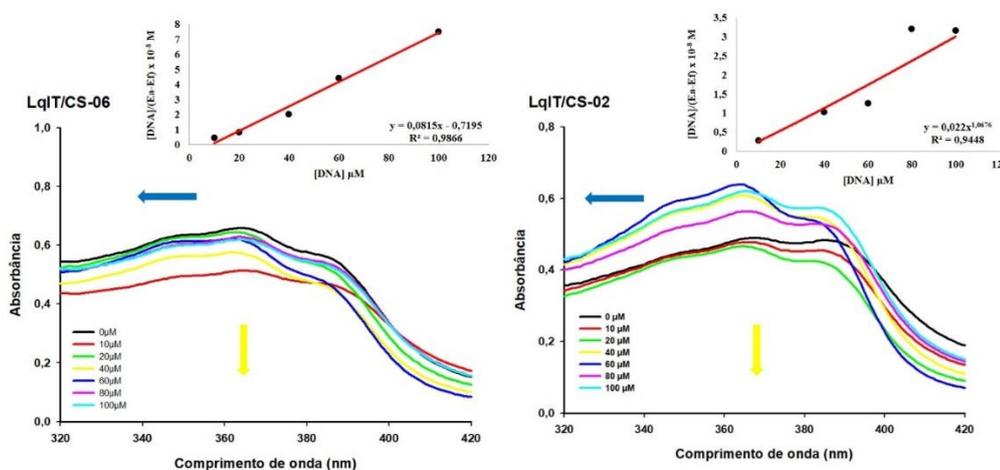
Fonte: O autor, 2022.

Os compostos CS-02 e 06 e 08, apresentaram as seguintes taxas de hipocromismo 7,24%, 27,47% e 3,22%, respectivamente, o efeito de diminuição do pico absorptivo pode estar relacionado à intercalação ao ssDNA, provavelmente por meio de interações de empilhamentos de elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos presentes nas estruturas químicas dos compostos e os pares de base do ssDNA (Ozuler, Kara *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Narva *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018).

O CS-06 apresentou um efeito hipocrômico, que ser explicado devido ao substituinte *p*-fenil, o que conseqüentemente leva a uma estabilização do complexo ligante-ssDNA formado (Figura 26). Além de alterações na intensidade dos picos de

absorção, foi observado para o CS-02 e 06 uma variação quanto ao comprimento de onda de 1nm, caracterizando assim a presença de um leve desvio para regiões com comprimentos de onda menores (deslocamento para região do azul). Estas variações não foram encontradas para o LqIT/CS-08, que por sua vez apresenta em sua estrutura o grupamento metóxi, que é um doador de elétrons, diferente do substituinte Cl que é um retirador de elétrons.

Figura 26. Espectros de absorção dos compostos CS-06 e CS-02 na presença de quantidades crescentes de ssDNA. [DNA]=0,10,20,40,60,80,100.



Fonte: O autor, 2022.

O grau de afinidade biomolécula-ligante foi calculado por meio da constante intrínseca ( $K_b$ ), o valor obtido reflete a intensidade da força de ligação entre os compostos da série LqIT/CS e o ssDNA. A obtenção do  $K_b$  foi realizada utilizando os dados das alterações de absorbâncias apresentadas pelos compostos quando expostos ssDNA nas concentrações já especificadas, conforme o método de McGhee e Von Hippel (1974).

O composto CS-03 apresentou o menor valor de  $K_b$ , seguido pelo CS: 02, 08, 07, 01, 06, 04, em ordem crescente, tendo um destaque maior o CS-05, que é o derivado sem substituição, quanto maior o valor do  $K_b$ , mais forte é a interação entre a molécula e os pares de base do DNA, caracterizando um bom grau de afinidade por intercalação (Kumar *et al.*, 2019). Os resultados obtidos indicam que a presença das substituições diminuiu a força de interação ssDNA-ligante, mas não exclui a capacidade de ligação entre os demais compostos e o ssDNA, pois os valores para intercaladores típicos que interagem com o DNA estão na faixa de  $10^4$  e  $10^6$   $M^{-1}$

(Ihmels; Otto, 2005) indicando assim que todos os compostos da série apresentam capacidade de interação com o DNA, o que pode indicar um possível mecanismo de ação.

Observando os compostos halogenados, nota-se que a presença de um átomo de flúor favorece uma maior força de ligação com o DNA se comparada com o trifluorometil, apesar de serem ambos retiradores de elétrons, a substituição com um forte retirador de  $e^-$  halogenado diminui a interação com o DNA. Isto pode ser evidenciado ao analisarmos o  $K_b$  dos compostos que apresentaram hipercromismo, pois o substituído com Br (CS-04), apresenta valor superior aos substituintes  $CF_3$ , F e Cl é atribuído ainda ao CS-04 uma elevada reatividade que contribui para que o mesmo exerça uma atividade alquilante sobre o DNA.

#### 6.3.1.1.2 Espectroscopia de fluorescência

As análises por meio da espectroscopia de fluorescência servem para confirmar os dados obtidos com a espectroscopia de absorção, complementando assim os estudos de interação entre pequenas moléculas e o DNA, apresentando como vantagem uma alta taxa de sensibilidade, grande faixa de concentração linear e seletividade (Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Ribeiro *et al.*, 2019).

O DNA apresenta baixa propriedade de fluorescência, sendo assim para os estudos de fluorescência a análise foi realizada avaliando as alterações do perfil de fluorescência dos compostos, a presença do anel indólico nas estruturas das moléculas testadas pode ter contribuído para visualização da fluorescência dos compostos, como foi realizado no estudo de Singhal, Khanna e Khanna (2019).

Os compostos quando avaliados isoladamente, na concentração de 20  $\mu M$ , apresentaram fluorescência na faixa de 420 a 520 nm, (Tabela 14), a única exceção foi o composto CS-04, pois não foi possível evidenciar a formação de um pico de fluorescência, o que conseqüentemente também impediu a visualização da interação desse composto com o DNA, por não permitir a análise dos dados obtidos. Para tal composto torna-se necessário a utilização de outras técnicas complementares como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) em estudos futuros. Todos os espectros de emissão fluorescente estão dispostos nos apêndices.

Os demais compostos foram expostos ao DNA em diferentes concentrações, como pode-se observar na tabela 14, houve um efeito hipercrômico que aumentou de

acordo com a concentração nos compostos CS-01,02 e 03, enquanto nos compostos CS-05,06 e 07 ocorreu um aumento da fluorescência até a concentração de 80  $\mu\text{M}$ , acima disso iniciou-se um hipocromismo, e no composto CS-08 a fluorescência estabilizou-se mostrando-se inalterada nas concentrações de 80 e 100  $\mu\text{M}$ .

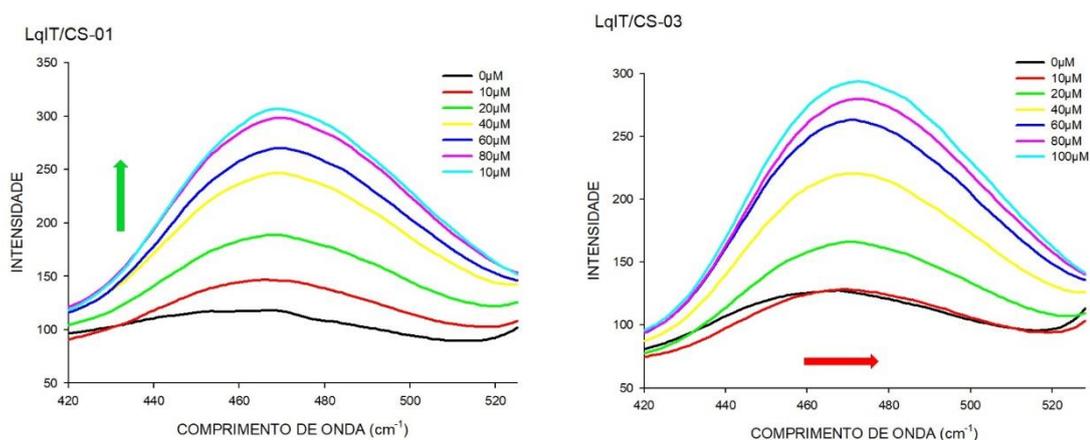
Tabela 14. Dados espectroscópicos de emissão fluorescente dos compostos LqIT/CS's livres e interagindo com o ssDNA em concentrações crescentes.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	Exc. (nm)	Emi. (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercromismo (%) <sup>a</sup>	Bandas Exc Emi (nm)	R
CS-01	467	469	273	449	2	37,58	5_5	p-F
CS-02	467	469	273	452	2	17,45	5_5	p-Cl
CS-03	468	471	272	451	3	23,40	5_5	p-NO <sub>2</sub>
CS-04	-	-	-	-	-	-	-	p-Br
CS-05	467	469	276	450	2	17,73	5_5	p-H
CS-06	469	469	275	440	0	35,56	5_5	p-Ph
CS-07	469	470	277	454	1	34,26	5_5	p-CF <sub>3</sub>
CS-08	467	467	277	451	0	17,69	5_5	p-OCH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Hipercromismo resultante da interação entre os compostos da série CS e 20 $\mu\text{M}$  de ssDNA em comparação aos compostos livres. Fonte: O autor, 2022.

A alteração na intensidade do pico fluorescente, pode ter ocorrido devido à diminuição da flexibilidade conformacional da nova estrutura formada (ligante-DNA) (Faulhaber *et al.*, 2011). A maior elevação foi observada após interação do composto CS-01 (Figura 27), e foi decrescendo segundo a ordem: CS-06, 07, 03, 05, 08 e o de menor efeito hipercrômico foi o CS-02. Esse aumento de fluorescência pode estar relacionado a uma maior ligação no local de intercalação com o DNA (Faulhaber *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2021). Os compostos CS-06 e 08, que foram os únicos que não apresentaram um efeito batocrômico leve, para os demais foi possível observar a variação de 1-3nm no pico fluorescente a mais quando exposto à concentrações crescentes do DNA, esse efeito também sugere a formação do complexo (ligante-DNA) (Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Alves *et al.*, 2021). Esse deslocamento do pico para a região do vermelho foi mais no CS-03 o que apresentou o desvio de 3nm.

Figura 27. Efeitos hipercrômico e batocrômico evidenciado nos compostos CS-06 e CS-03.



Fonte: O autor, 2022.

Devido a variação da intensidade fluorescente não ter obedecido o aumento da concentração, não houve uma linearidade, dessa forma não foi possível calcular o  $K_{sv}$  dos compostos, necessitando então de uma análise por outro método para confirmação da interação, que serão realizados em estudos futuros com a técnica de dicroísmo circular que permite visualizar a interação com DNA de maneira mais detalhada. Contudo os resultados preliminares alcançados não excluem o indício de formação do complexo ligante-DNA, pois nota-se que os compostos tiveram a fluorescência intrínseca modificada na presença do DNA.

Este comportamento se assemelha ao evidenciado pelas sondas fluorescentes utilizadas para estudos de fluorescência como o Brometo de Etídeo (BE) ou 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) que se ligam ao DNA por intercalação nas cadeias duplas de DNA e promovem um aumento da intensidade fluorescente do complexo formado, a elevação do pico fluorescente tende a ser diminuída após a adição de uma outra molécula, causando assim a supressão da fluorescência e possibilitando o cálculo da extinção de fluorescência, tendo em vista a competição entre a sonda fluorescente e a biomolécula adicionada pelos locais de ligação ao DNA (Sirajuddin; Ali; Badshah, 2013; Ma *et al.*, 2018).

O composto CS-06 apresentou um hipocromismo mais acentuado na análise de absorção e também o maior pico na fluorescência com o DNA o que serve como indício para evidenciar a intercalação entre o ligante estudado e o DNA. É importante destacar também que o composto CS-05 que apresentou o maior valor de  $K_b$  também apresentou um valor intermediário de hiperromismo e um leve efeito batocrômico,

ambos servindo como indícios de interação por intercalação com o DNA (*Jiang et al., 2005*).

#### 6.3.1.2 Interações com BSA

A ligação de fármacos às proteínas é um fator determinante sobre a ação dos fármacos no organismo, impactando diretamente aspectos da farmacocinética e farmacodinâmica (Buddanavar, Nandibewoor, 2017). Entre as proteínas plasmáticas a albumina se destaca por se apresentar em maior quantidade, além disso o papel de transportadora de substâncias fez com que de diversos grupos de pesquisa viessem a investigar o perfil de interação entre ligantes-albumina. Técnicas espectroscópicas aplicadas para esse fim permitem a observação de mudanças nos perfis absorptivos e fluorescentes da mesma quando está livre e quando está possivelmente interagindo com outros ligantes/moléculas (Buddanavar, Nandibewoor, 2017).

##### 6.3.1.2.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

Diferente dos estudos realizados com o DNA, para a investigação da possibilidade de interação ligante-BSA, foi utilizado como padrão os parâmetros da proteína, pois ela já é amplamente caracterizada e tem suas informações já muito bem detalhadas na literatura, (*Liu et al., 2018; Rafols et al., 2018; Kumar; Masran, 2019; Silva-Filho et al., 2019*) apresentando um pico de absorção relacionado à absorção de aminoácidos (Trp, Tyr e Phe) na faixa de 278-280nm, que pode sofrer alterações quando a BSA interage com outras moléculas (*Chaturvedi et al., 2015; Mohamadi et al., 2015; Ribeiro et al., 2019*). Os dados espectroscópicos referentes à absorção UV-vis da BSA livre bem como exposta a concentrações crescentes (0-40  $\mu$ M) dos novos derivados indol-tiazólicos estão dispostos na tabela 15.

Tabela 15. Dados espectroscópicos de absorção UV-vis da BSA livre e interagindo com quantidades crescentes dos derivados da série LqIT/CS's (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{M}$ ).

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ Interagindo (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercromis mo (%)	Hipocro mismo (%)	$K_b(\text{M}^{-1})$	R
CS-01	278	278	0	52,88	-	$1,30 \times 10^5$	<i>p</i> -F
CS-02	278	278	0	52,10	-	$1,41 \times 10^5$	<i>p</i> -Cl
CS-03	278	278	0	64,15	-	$1,29 \times 10^4$	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>
CS-04	278	277	1	47,01	-	$1,14 \times 10^5$	<i>p</i> -Br
CS-05	278	278	0	43,50	-	$1,14 \times 10^5$	<i>p</i> -H
CS-06	278	278	0	61,14	-	$1,45 \times 10^5$	<i>p</i> -Ph
CS-07	278	278	0	61,58	-	$1,39 \times 10^5$	<i>p</i> -CF <sub>3</sub>
CS-08	278	278	0	56,45	-	$1,38 \times 10^5$	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>

Fonte: O autor, 2022.

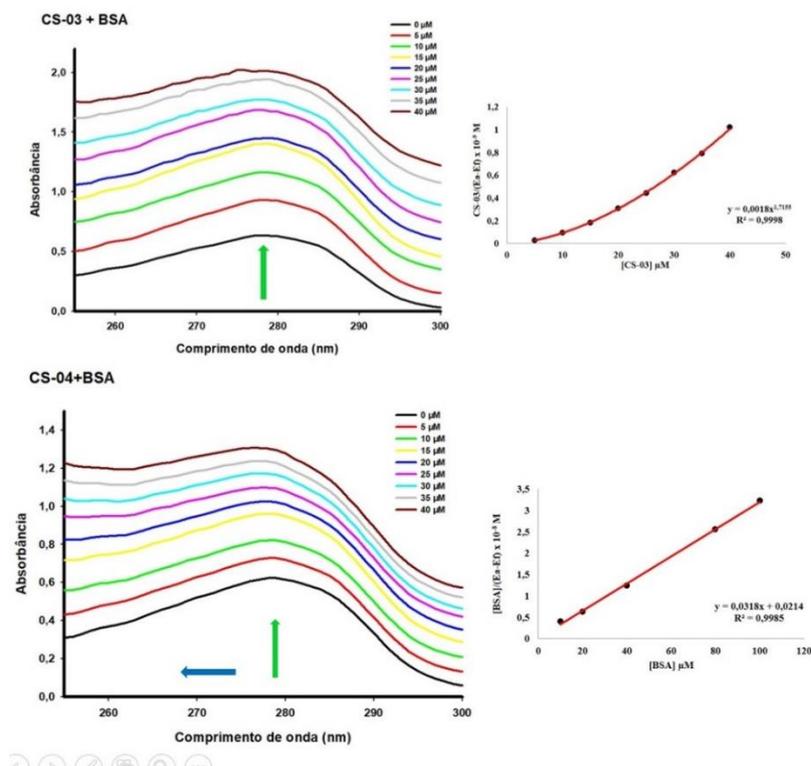
A adição dos compostos à solução de BSA, gerou um leve efeito hipsocrômico, variando 1 nm, apenas para o composto CS-04, este deslocamento somado a um efeito hiperocrômico de 47,01% (Figura 28), deve-se provavelmente a interação de maneira não covalente, através do empilhamento de elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos dos novos derivados e resíduos de aminoácidos na cavidade hidrofóbica de ligação da BSA (Singla; Luxami; Paul *et al.*, 2016). Podemos inferir ainda que o sítio ativo da proteína, disponível para ligação dos compostos, está exposto em um ambiente hidrofóbico, provavelmente próximo ao resíduo Trp-212 (Belatik *et al.*, 2012; Raja; Bhuvanesh; Natarjan *et al.*, 2011).

Segundo os dados da tabela 16, os valores de  $K_b$  variaram entre  $1,29 \times 10^4$  a  $1,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , indicando um bom grau de afinidade com a BSA (Silva-Filho *et al.*, 2019), a ordem crescente de força de ligação foi **CS-03, 05, 04, 01, 08, 07, 02, 06**. O composto que causou maior elevação do pico de absorção foi o CS-03 (Figura 28), que também apresentou o menor valor de  $K_b$ , o que nos leva a concluir que a presença do grupamento nitro, contribui diretamente para uma maior absorção, porém quando comparado com as demais moléculas sintetizadas, este derivado não se liga tão fortemente a BSA. Com exceção dos compostos CS-04 e CS-05 todos os demais promoveram um aumento de intensidade do pico absorptivo acima de 50% o que é

indicativo de interação ligante-BSA, e também não exclui a interação desses dois compostos, pois eles apresentaram uma força de ligação intermediária, semelhante aos demais (Almeida *et al.*, 2017).

Nota-se que a diminuição da eletrofilicidade dos halogênios promoveu um aumento do valor de  $K_b$ , dessa forma o composto substituído com o bromo (CS-04), apresentou valor superior ao do cloro (CS-02), que por sua vez apresentou uma constante superior ao composto substituído com o átomo de flúor (CS-01). Estes compostos halogenados podem ter interagido com a BSA promovendo uma maior exposição dos resíduos de aminoácidos, Trp-134 e Trp-212, que estavam inicialmente situados em bolsões hidrofóbicos, fazendo com que ficassem mais expostos devido à alteração na estrutura terciária da proteína (Almeida *et al.*, 2017; Asadi *et al.*, 2020). Os demais espectros de absorção da BSA na presença dos compostos encontram-se dispostos nos apêndices.

Figura 28. Espectros de absorção da BSA na presença de LqIT/CS-03 e 04 em quantidades crescentes de [LqIT/CS]=0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40.



Fonte: O autor, 2022.

### 6.3.1.2.2 Espectroscopia de fluorescência da BSA

Através da supressão dos picos de fluorescência pode-se investigar o perfil de interação entre ligantes-BSA, esses dados podem contribuir para um melhor entendimento das alterações já visualizadas no espectro de absorção (Gouveia *et al.*, 2018, Silva-Filho *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2019). A diminuição do pico fluorescente deve-se à interação da estrutura terciária da BSA levando à alterações do ambiente hidrofóbico onde o Trp está presente, e possível local onde ocorre a ligação entre o composto e a proteína, causando assim a supressão da fluorescência (Shi *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2018). Para prosseguir com a realização dessa análise na região de fluorescência da proteína foi verificado previamente que os compostos sintetizados não apresentaram picos nessa região de estudos, pois isso poderia ser um fator de interferência no estudo. A tabela 16 apresenta os resultados obtidos após a realização dessa análise em triplicata. Os demais espectros estão dispostos nos apêndices.

Tabela 16. Dados espectroscópicos de emissão fluorescente da BSA livre e interagindo com quantidades crescentes dos derivados da série LqIT/CS's (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{M}$ ).

Composto	Exc. (nm)	Bandas Exc Emi (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocro mismo (%) <sup>a</sup>	KSV ( $\text{M}^{-1}$ )	R
CS-01	285	2,5_2,5	342	339	3	70,7	$10,41 \times 10^4$	<i>p</i> -F
CS-02	285	2,5_2,5	342	338	4	59,74	$5,22 \times 10^4$	<i>p</i> -Cl
CS-03	285	2,5_2,5	342	340	2	46,53	$5,98 \times 10^4$	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>
CS-04	285	2,5_2,5	342	341	1	50,18	$7,42 \times 10^4$	<i>p</i> -Br
CS-05	285	2,5_2,5	342	339	3	44,94	$6,19 \times 10^4$	<i>p</i> -H
CS-06	285	2,5_2,5	342	339	3	61,45	$12,65 \times 10^4$	<i>p</i> -Ph
CS-07	285	2,5_2,5	342	336	6	47,91	$5,29 \times 10^4$	<i>p</i> -CF <sub>3</sub>
CS-08	285	2,5_2,5	342	338	4	51,37	$6,02 \times 10^4$	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Hipocromismo resultante da interação entre os compostos da série CS e 20 $\mu\text{M}$  de BSA. Fonte: O autor, 2022.

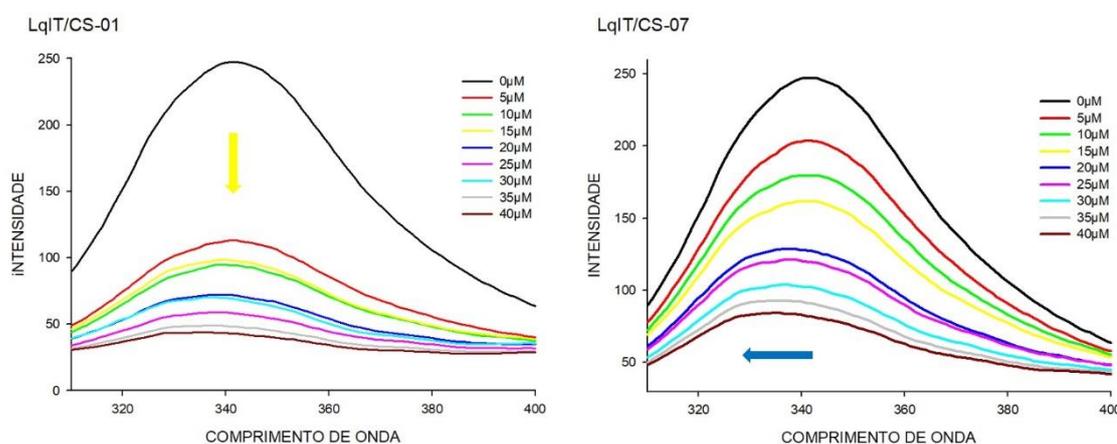
Observando a tabela 17, nota-se que todos os compostos quando adicionados ao meio contendo a BSA promoveram extinção da fluorescência, caracterizada por

um intenso hipocromismo, que variou entre 44% a 70,7%. O maior hipocromismo foi evidenciado pelo composto CS-01 (Figura 29), nesse caso pode-se observar que o hipocromismo seguiu uma ordem decrescente de acordo com a diminuição da eletrofilicidade dos compostos halogenados, pois o CS-02, substituído com o *p*-Cl, apresentou resultado inferior ao substituído com o *p*-F, e superior ao hipocromismo apresentado pelo CS-04, substituído com o *p*-bromo. A extinção da fluorescência da BSA é evidenciada após a adição de sondas fluorescentes (Ghosh; Rathi; Arora, 2016), como todos os compostos se comportaram dessa forma na análise com o DNA (promovendo um aumento da fluorescência do mesmo), é mais um fator que indica a interação das moléculas sintetizadas com o DNA, apesar da impossibilidade calcular a  $K_{sv}$ .

O cálculo da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) mostrou que o maior valor,  $12,65 \times 10^4$  está atribuído ao CS-06, composto que apresenta maior hidrofobicidade, corroborando com os resultados encontrados nos testes *in silico* e com resultados observados por Gouveia e colaboradores (2018).

Além disso, foi observado também a presença do efeito hipocromico em todos os compostos, sendo mais intenso (6nm) para o CS-07 (Figura 29), o que também é indicativo de interação entre a BSA e o ligante (Ribeiro *et al.*, 2019). A presença dos efeitos hiperocrômico na absorção e hipocromico na fluorescência são indícios de que houve alguma provável mudança na estrutura da proteína após interação (Kalaiarasi *et al.*, 2016; Muralisankar *et al.*, 2016).

Figura 29. Espectros de absorção da BSA na presença de LqIT/CS-01 e 07 em quantidades crescentes de  $[LqIT/CS]=0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40$ .



Fonte: O autor, 2020.

Nota-se nos resultados da tabela 17 que o composto CS-05 apresentou um menor valor de fluorescência, bem como de absorbância, apesar de apresentar valores de  $K_b$  e  $K_{sv}$  intermediários, provavelmente a ausência de um substituinte na posição -p, diferente dos demais compostos acabou causando uma menor exposição do Trp, gerando então uma baixa absorção e baixa fluorescência, o que não exclui o fato de ocorrer ligação entre o composto e a molécula com força intermediária, se comparado aos demais compostos da série.

### 6.3.2 Atividade antioxidante in vitro (DPPH e ABTS)

Os resultados obtidos no teste de DPPH podem ser observados na figura 30, onde os quadrantes A e B mostram os oito compostos da série, é possível notar que não houve uma regularidade entre os valores, que acabaram não sendo dose dependente, tal comportamento pode ser explicado pela ausência de ligações de hidrogênio fracas nas moléculas o que não permite a doação de hidrogênio que viria a reduzir o DPPH e fazê-lo alterar sua coloração (Iraji *et al.*, 2022).

De acordo com esse teste a maioria dos compostos não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações estudadas, ainda assim na tabela 17 foi possível verificar o  $EC_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  dos compostos 04,06 e 08, mas os valores apresentados são muito maiores quando comparados ao controle o que mais uma vez reflete que o mecanismo de doação de hidrogênio não ocorre com as moléculas da série.

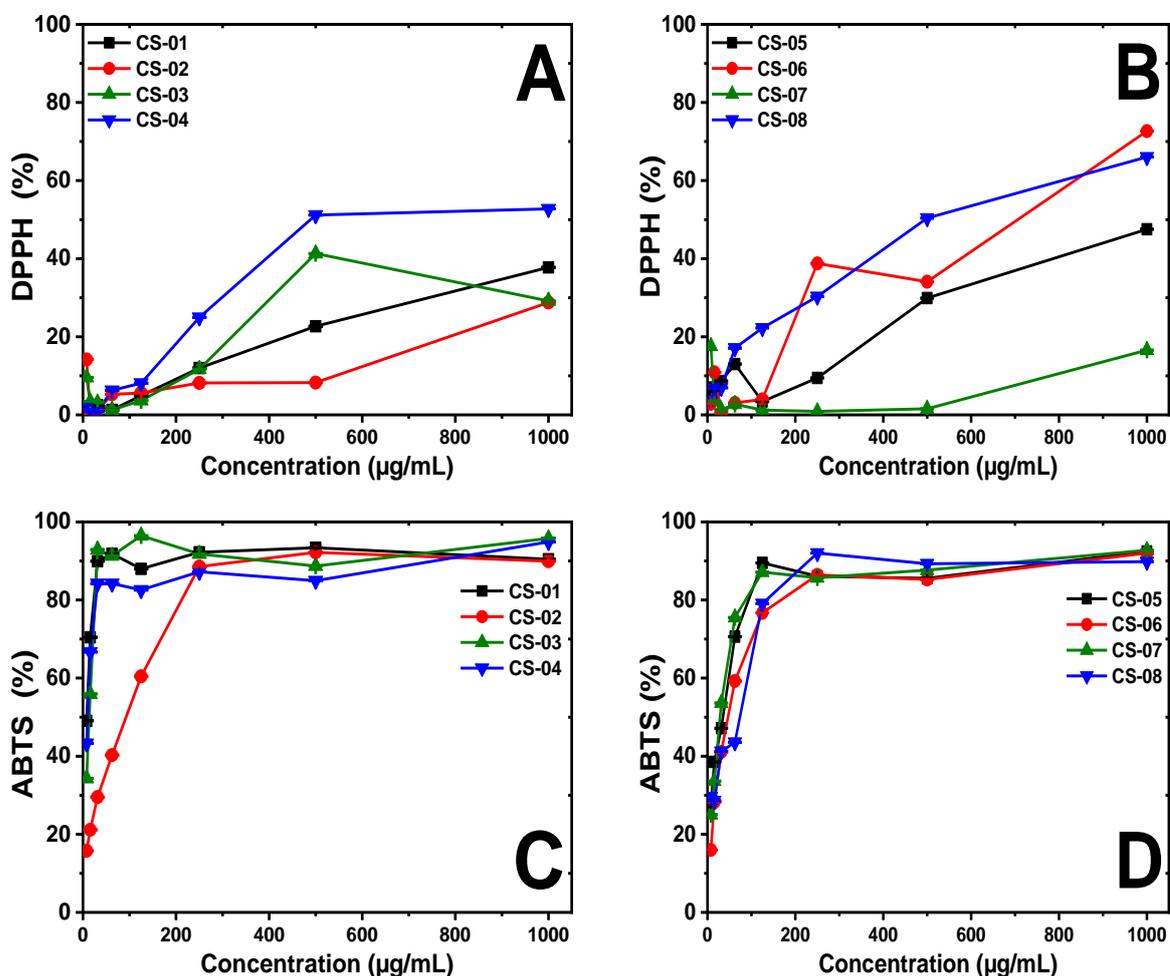
Tabela 17. Resultados de atividade antioxidante in vitro promovido pelos derivados indol-tiazólicos.

Compostos	$EC_{50}$ (DPPH•)			$EC_{50}$ (ABTS +)		
	% Captura do radical em 1000 $\mu\text{g/mL}$	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	% Captura do radical em 1000 $\mu\text{g/mL}$	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
CS 01	$37.8 \pm 0.04$	nd	nd	$90.44 \pm 0.0$	$6.4 \pm 1.0$	15.01
CS 02	$28.77 \pm 0.01$	nd	nd	$89.9 \pm 0.04$	$93.5 \pm 2.9$	211.49
CS 03	$29.2 \pm 0.0$	nd	nd	$95.77 \pm 0.0$	$13.8 \pm 0.6$	30.45
CS 04	$52.8 \pm 0.01$	$486.8 \pm 27.5$		$94.9 \pm 0.01$	$10.4 \pm 0.0$	21.39
CS 05	$47.5 \pm 0.02$	nd	nd	$92.4 \pm 0.0$	$34.5 \pm 3.3$	84.52
CS 06	$72.7 \pm 0.01$	$708.4 \pm 0.0$		$92.3 \pm 0.0$	$47.8 \pm 0.5$	98.72

CS 07	16.6 ± 0.0	nd	nd	92.8 ± 0.04	36.6 ± 1.5	76.87
CS 08	66.05 ± 0.0	637.7 ± 26.1		89.8 ± 0.04	73.8 ± 0.3	168.30
Ácido ascórbico	99.8	7.75 ± 0.01		99.0	13.4± 0.01	76.08
(BHT)	99.1	18.9 ± 0.03		100	5,24± 0,02	23.78

Nd: não determinado nas concentrações estudadas. BHT: Hidroxitolueno butilado. Fonte: O autor, 2022.

Figura 30. Avaliação da atividade in vitro dos compostos da série CS com o radical DPPH.



Fonte: O autor, 2022

Ainda analisando a figura 30 nos quadrantes C e D pode-se observar um perfil de resposta totalmente diferente do primeiro teste antioxidante. É possível notar um aumento do percentual de captura do ABTS com o aumento da concentração para todos os compostos. O EC<sub>50</sub> em µM dos compostos apresentaram valores bem mais

próximos aos controles utilizados, que foram o ácido ascórbico e o Hidroxitolueno butilado (BHT), tendo um destaque maior para o CS-01(*p*-Flúor) e 04 (*p*-Bromo), que apresentaram valores inferiores aos dois controles utilizados.

A monohalogenação com o átomo de Flúor mostrou-se mais eficaz quanto ao efeito antioxidante, no entanto, ainda assim o CS-07 substituído com o grupo trifluorometil mostrou bons resultados, enquanto a substituição com *p*-OCH<sub>3</sub> (CS-08) ou *p*-Cl (CS-02) diminuiu a atividade de captura do ABTS (Yakan *et al.*,2021).

Rafique e colaboradores (2020) realizaram substituições em compostos heterocíclicos nitrogenados e verificaram valores antioxidantes semelhantes ao controle utilizado que foi o ácido ascórbico, quando utilizaram os substituintes nitro (CS-03) e trifluorometil (CS-07), corroborando com os resultados obtidos.

### **6.3.3 Avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade in vitro dos novos derivados sintetizados**

O resultado de citotoxicidade é uma etapa inicial e de extrema importância para continuidade de testes com novas moléculas candidatas à fármaco (Gouveia *et al.*,2022). O controle negativo, que foi considerado como o 100% de viabilidade dos macrófagos, consiste em células não tratadas, enquanto o controle positivo foi a doxorrubicina. Os resultados de CC<sub>50</sub> dispostos na tabela 18 permitem notar que todos os compostos são menos tóxicos que a doxorrubicina, utilizada como padrão.

Na avaliação da citotoxicidade dos compostos da série LQIT/CS, o controle negativo consistiu nas células não tratadas e foram utilizados três controles positivos: a doxorrubicina, a amsacrina e a asulacrina. Após análise foi possível calcular o IC<sub>50</sub> para as linhagens MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), T-47D (carcinoma ductal infiltrante de mama), DU-145 (Carcinoma prostático) e Jurkat (Células T de leucemia aguda). Cada uma dessas linhagens foi analisada separadamente tendo seus respectivos gráficos.

Além de realizar o cálculo de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> é possível correlacionar esses valores para encontrar o índice de seletividade (IS) (Tabela 18) que indica quantas vezes determinado composto é mais eficaz que tóxico, correlacionando dessa forma que altos valores de IS sugerem uma margem maior entre a dose efetiva e dose tóxica, quanto maior essa distância mais segura a utilização da substância em análise.

Os compostos menos tóxicos foram o CS-03 e CS-05, com valores de  $84,12 \pm 1,67 \mu\text{M}$  e  $66,81 \pm 2,62 \mu\text{M}$ , respectivamente, sendo o primeiro substituído com o

grupo nitro, enquanto o segundo é o composto sem substituição, o que leva a perceber que a substituição nitro foi a única que favoreceu uma menor toxicidade para macrófagos.

Tabela 18. Resultados de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e IS promovidos pelos compostos LQIT/CS.

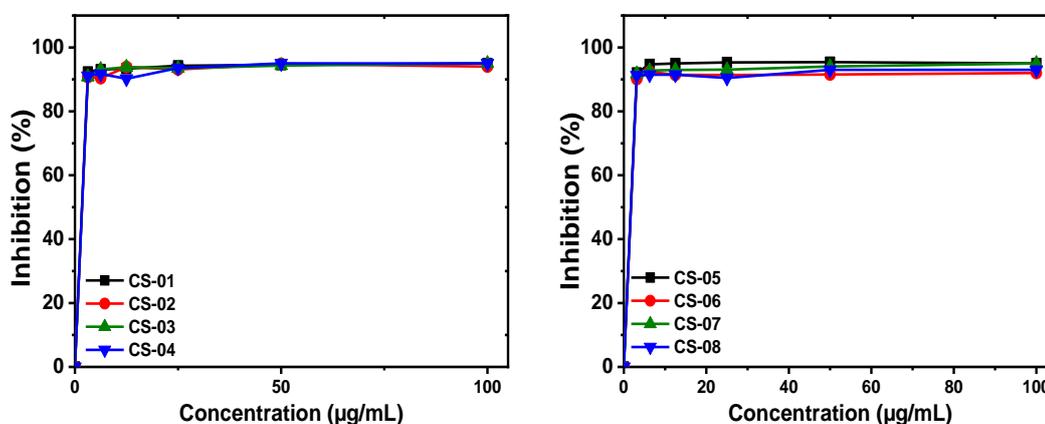
Compostos		J774-A1	MCF-7		T-47D		DU-145		JURKAT	
	R	CC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IS	IC <sub>50</sub> (μM)	IS	IC <sub>50</sub> (μM)	IS	IC <sub>50</sub> (μM)	IS
<b>CS 01</b>	F	14,76 ± 0,16	0.98±0.09	15,1	1.43±0.09	10,3	0.25±0.77	59,0	1.10±0.05	13,4
<b>CS 02</b>	Cl	33,91 ± 1,81	1.22±0.05	27,8	1.32±0.03	27,8	1.21±0.02	28,0	1.37±0.06	24,8
<b>CS 03</b>	NO <sub>2</sub>	84,12 ± 1,67	0.74±0.09	113,7	0.93±0.04	90,5	1.28±0.05	65,7	1.24±0.12	67,8
<b>CS 04</b>	Br	28,85 ± 3,01	1.07±0.21	27,0	1.03±0.06	27,0	1.51±0.09	19,1	1.64±0.74	17,6
<b>CS 05</b>	H	66,81 ± 2,62	0.86±0.02	77,7	1.31±0.03	51,0	1.22±0.07	54,8	1.31±0.06	51,0
<b>CS 06</b>	Ph	31,90 ± 0,99	1.27±0.13	25,1	1.10±0.07	25,1	1.38±0.04	23,1	1.46±0.08	21,8
<b>CS 07</b>	CF <sub>3</sub>	10,49 ± 0,14	0.81±0.47	13,0	1.44±0.07	7,3	1.21±0.12	8,7	1.62±0.04	6,5
<b>CS 08</b>	OCH <sub>3</sub>	10,49 ± 0,14	0.89±0.18	11,8	1.27±0.08	11,8	1.34±0.04	7,8	1.69±0.32	6,2
<b>DOXORRUBICINA</b>	-	1,09	1.11±0.86	1,0	1.03±0.27	1,1	1.12±0.06	1,0	0.74±0.03	1,5
<b>m-AMSACRINA</b>	-	-	1.14±0.09	-	1.25±0.38	-	0.80±0.03	-	1.41±0.11	-
<b>ASULACRINA</b>	-	-	1.18±0.07	-	1.26±0.43	-	0.66±0.20	-	1.33±0.08	-

Fonte: O autor, 2022

A análise *in vitro* frente a linhagem MCF-7 (Figura 31) trouxe resultados promissores, pois seis dos oito compostos testados apresentaram  $IC_{50}$  inferior aos três controles utilizados, e os outros dois compostos que alcançaram valores acima do controle ainda assim mostraram valores bem próximos. O maior destaque para essa linhagem celular foi o composto CS-03 (*p*-Nitro) que apresentou um  $IC_{50}$  de  $0,74 \pm 0,09 \mu M$ , sendo assim o mais efetivo para combater essa linhagem, apresentando um IS de 113, o que reflete uma grande distância entre a dose efetiva e tóxica para esse composto.

Os valores de  $IC_{50}$  e IS pode estar relacionada a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN's), como o óxido nítrico ( $NO^+$ ), o dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) e o ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que acabam por desempenhar efeitos semelhantes as ERO's, ativando assim vias de morte celular através de mecanismos como, por exemplo, ativação do processo de apoptose intrínseco dependente de caspases (Paula; Serrano; Tavares, 2009).

Figura 31. Resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* promovida pelos compostos frente as células tumorais MCF-7.



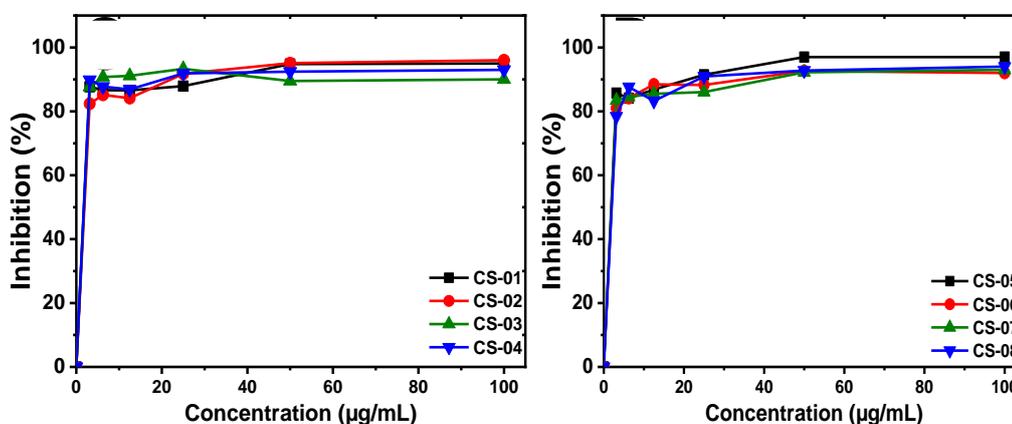
Fonte: O autor, 2022.

Ainda para essa linhagem celular destaca-se os valores de  $IC_{50}$  obtidos pelo grupo contendo o forte retirador de elétrons trifluorometil (CS-07), que por sua vez mostrou resultados superiores ao composto monohalogenado com flúor (CS-01), mostrando que a inserção de mais de um átomo de halogênio pode favorecer a atividade contra células MCF-7, no entanto esse aumento de atividade também reflete-se no teste feito com macrófagos, sendo a toxicidade um fator importante a ser observado (Al-Jameel; Youssef, 2018; Santana et al., 2018; Elkamhawy et al., 2019).

O composto não substituído (CS-05) mostrou-se mais eficaz que os demais compostos testados, de maneira geral os substituintes doadores de elétrons *p*-fenil (CS-06) e *p*-metóxi (CS-08) apresentaram resultados moderados, corroborando com os dados obtidos na literatura (Arafa et al., 2013; Li et al., 2013; Rakesh et al., 2019), o mesmo também foi observado nos compostos substituídos com grupos retiradores de elétrons moderados *p*-cloro (CS-02) e *p*-bromo (CS-04).

Para análise da atividade antiproliferativa na linhagem T-47D (Figura 32), o composto CS-03 (*p*-Nitro) apresentou um  $IC_{50}$  de  $0,93 \pm 0,04$ , mais uma vez menor que os controles utilizados, com valor de IS de 90, destacando a importância e influência do substituinte dessa parte da molécula (Paula; Serrano; Tavares, 2009). Além desse composto o CS-04 (*p*-Bromo) apresentou o mesmo  $IC_{50}$  da Doxorubicina, com um desvio padrão menor, somado ao fato de ainda ter mostrado um valor inferior aos demais controles utilizados, o que destaca a essencialidade do átomo de bromo para desempenho da atividade antiproliferativa (Nasr; Bondock; Touns et al., 2014).

Figura 32. Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais T-47D.



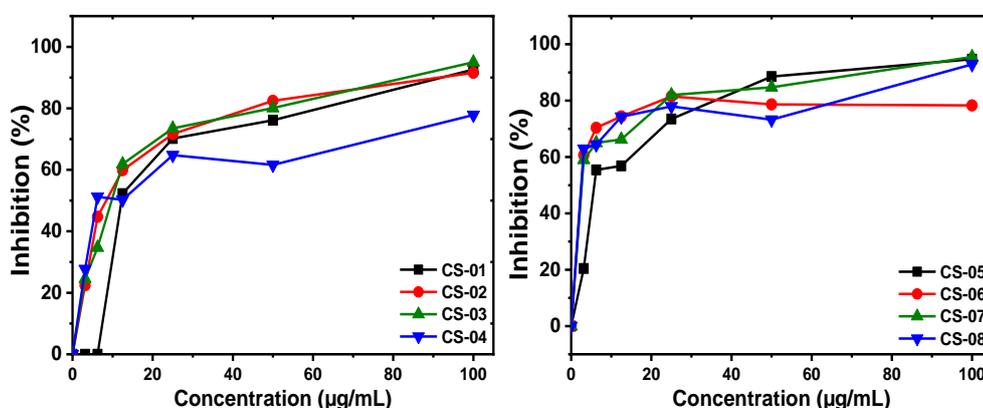
Fonte: O autor, 2022.

Analisando os compostos halogenados é possível notar que a diminuição da eletronegatividade e aumento do impedimento estérico favoreceu a atividade antiproliferativa, pois é possível notar valores decrescentes de  $IC_{50}$  para o CS-01 (*p*-Flúor), CS-02 (*p*-Cloro) e CS-04 (*p*-Bromo) (Siegal; Schultz, 2007; Hernandez et al., 2010).

A linhagem DU-145 mostrou valores muito próximos entre os compostos (Figura 33), no entanto o composto CS-01(*p*-Flúor) apresentou valor de  $IC_{50}$  de

0,25±0.77, valor que é 4,5 vezes menor que o IC<sub>50</sub> da doxorrubicina (1.12±0.06) e no mínimo 2,5 vezes menor que os demais controles (Tabela 18). Vale destacar ainda que apesar da alta toxicidade relatada a compostos que apresentam átomos de flúor em sua composição, o composto CS-01(*p*-Flúor) apresentou um IS de 59, sendo muito distante da dose tóxica, o que é muito promissor para esse candidato à fármaco, e este substituinte é encontrado em medicamentos amplamente utilizados para o combate do câncer como o Fluororacila (5-FU) e a enzalutamida (Akhtar et al., 2017).

Figura 33. Resultados da atividade antiproliferativa in vitro promovida pelos compostos frente as células tumorais DU-145.



Fonte: O autor, 2022.

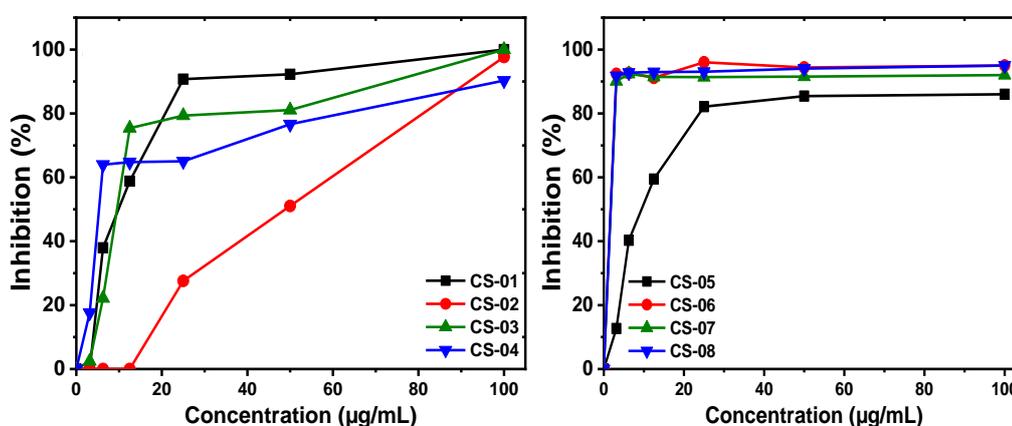
A influência do grupo nitro na pesquisa realizada por Lingala e colaboradores (2022) mostrou que esse substituinte não tem uma atividade muito promissora frente a linhagem DU-145, no entanto, nota-se que apesar desse substituinte favorecer um aumento o valor do IC<sub>50</sub> quando comparado ao composto CS-05 (não substituído), considerando-se o desvio padrão é possível notar uma proximidade dos valores o que caracteriza um valor moderado para este composto.

Nas células da linhagem Jurkat (Figura 34), os compostos que se destacaram foram o CS-01(*p*-Flúor) e o CS-03 (*p*-Nitro), apesar dos valores de IC<sub>50</sub> serem superiores ao apresentado pela Doxorrubicina, ainda assim são menores que os demais controles (Tabela 18).

No entanto também se faz importante observar a correlação entre os valores obtidos nos macrófagos e nesta linhagem, pois analisando a Doxorrubicina observa-se maior proximidade entre a dose tóxica para macrófagos e a dose tóxica para Jurkat, sendo uma diferença de 1,47 vezes para o controle citado, enquanto para o CS-01(*p*-

Flúor), a dose de IC<sub>50</sub> para os macrófagos é 13 vezes maior, e para o CS-03 (*p*-Nitro) a diferença entre os valores de IC<sub>50</sub> em µM na citotoxicidade J774 e em Jurkat é de 68 vezes. Levando-se em consideração ainda que o CS-05 apesar de apresentar um valor de IC<sub>50</sub> quase duas vezes maior que a Doxorubicina, também apresenta um IS de 51, o que também o torna promissor para essa linhagem. O que ressalta os bons resultados nos testes de citotoxicidade para esses dois compostos de modo geral.

Figura 34. Resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* promovida pelos compostos frente as células tumorais Jurkat.



Fonte: O autor, 2022.

#### 6.3.4 Validação do método de quantificação em HPLC UV para os compostos da série

A validação do método de quantificação por HPLC-UV foi realizada para o CS-03 e CS-08, sendo determinada a partir da análise de estabilidade da molécula em diferentes pHs simulados e do encapsulamento em dois modelos de nanopartículas de etil cianoacrilato (ETCA) revestidas com dextrana ou fucana. A proposta foi entender o comportamento das moléculas em estudos *in vivo* e verificar a possibilidade do encapsulamento em nanopartículas na promoção da preservação das características físico-químicas das moléculas utilizadas. O desenvolvimento do método analítico em HPLC permitiu avaliar o comportamento desta molécula em uma matriz farmacêutica complexa, com alta reprodutibilidade e sensibilidade, através de uma técnica simples e rápida.

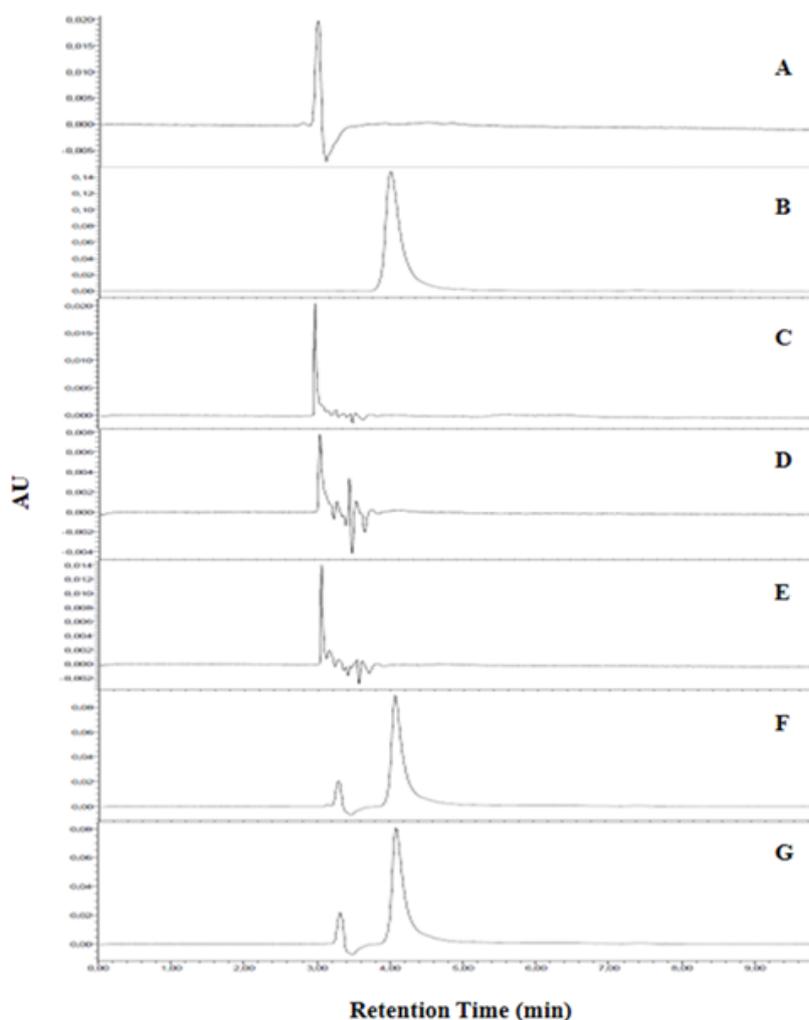
##### 6.3.4.1 Seletividade

A análise de seletividade do método utilizando cromatografia de fase reversa com eluição isocrática na concentração de CS-03 e CS-08 de 10 µg.mL<sup>-1</sup> em diferentes

soluções de pH (pH= 7,6, 6,8 e 1,2) e em contato com os constituintes das nanopartículas de dextrana ou fucana, confirma que o método utilizado permite a análise dos novos derivados analisados. Os cromatogramas mostram uma boa resolução do pico CS-03 (Figura 35), e do CS-08 (Figura 36) separando-os dos demais constituintes da matriz utilizada. O tempo de retenção de pico de CS-03 foi de  $4,21 \pm 0,07$  min e do CS-08 foi de  $6,30 \pm 0,09$  min.

A seletividade refere-se à capacidade do método de identificar o analito em uma mistura complexa sem interferir no pico da molécula e em outros componentes da mistura (Verbic; Dorkó; Horvai, 2013; Moosavi; Ghassabian, 2018).

Figura 35 - Cromatogramas representativos de CS-03 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com diferentes meios enriquecidos.

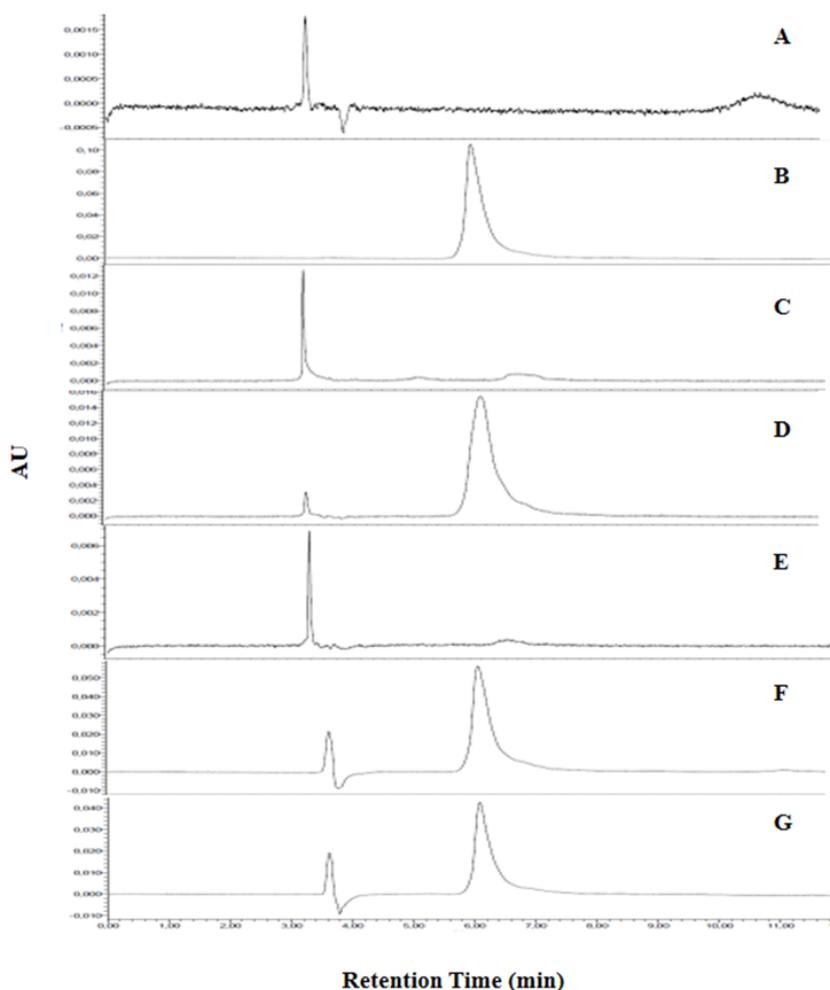


Fase móvel (A); CS-03 na fase móvel (B); solução tampão fosfato pH 7,6 (C), pH gástrico simulado (D); pH intestinal simulado (E); constituintes de nanopartículas de dextrana (F); e na presença de constituintes de nanopartículas de fucana (G). Fonte: O autor, 2022.

Os dados de seletividade obtidos também esclarecem que CS-03 sofre alguma modificação na presença de diferentes pHs, mostrando que quando tentamos quantificar CS-03 em soluções simuladas de pH (7,4, 1,2 e 6,8) (Figura 35C, 35D, e 35E) observamos que o pico de CS-03 é deslocado, além da redução na intensidade do pico (Piekarski et al., 2014; Jangid; Pooja; Kulhari, 2018). Esses resultados são importantes, pois mostram a necessidade de desenvolver uma forma farmacêutica que proteja o CS-03 para futuras aplicações terapêuticas.

. Foi possível notar que o método escolhido para quantificar CS-08 é seletivo. No entanto existem limitações quanto à identificação do CS-08 quando em contato com pH sanguíneo e intestinal (Figura 36C e 36E), aparecendo um pico de baixa intensidade no tempo de retenção do CS-08, mas foi possível identificá-lo no pH gástrico (Figura 36D).

Figura 36 - Cromatogramas representativos de CS-08 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com diferentes matrizes.

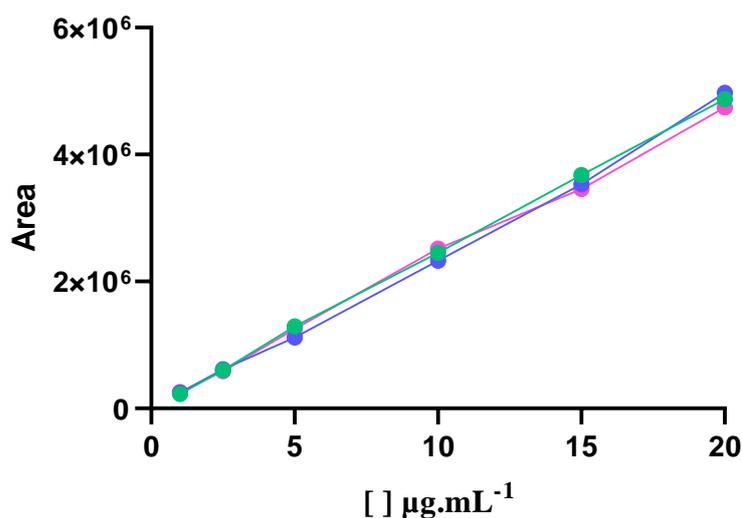


Fase móvel (A); CS-08 na fase móvel (B); solução tampão fosfato pH 7,6 (C), pH gástrico simulado (D); pH intestinal simulado (E); constituintes de nanopartículas de dextrana (F); e na presença de constituintes de nanopartículas de fucana (G). Fonte: O autor, 2022.

### 6.3.4.2 Linearidade

A linearidade está relacionada à capacidade do método de obter resultados de concentração proporcional do analito na amostra (Moosavi; Ghassabian, 2018). A regressão linear de foi obtida a partir da curva padrão para o CS-03 (Figura 37) com seis concentrações (1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtendo-se a equação da curva  $y = 243753x + 15505$  com valor de  $r^2 = 0,9997$ , onde a concentração de CS-03 foi calculado pela equação  $[\text{CS03}] = (\text{Abs} + 15505) / 243753$ , onde  $[\text{CS-03}]$  foi a concentração de CS-03 em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e Abs foi a área do pico em  $\mu\text{V s}$ . A inclinação da curva padrão linear foi 234164-245552, sendo estatisticamente diferente de 0.

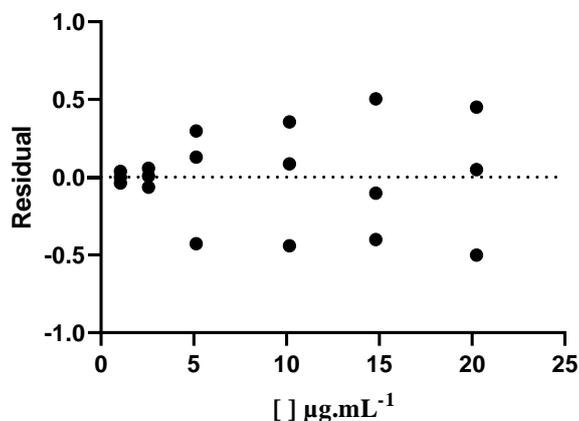
Figura 37 – Curva padrão do CS-03. Curva 1 (-●-), Curva 2 (-●-) e Curva 3 (-●-).



Fonte: O autor, 2022.

Após a análise estatística dos dados de linearidade usando ANOVA (FDA, 2015), podemos ver na figura 38 que o método apresentou homocedasticidade dos resíduos, indicando assim que as variações são iguais à distribuição normal dos valores identificados na regressão linear modelo. Os resultados do teste F mostraram que a comparação das variâncias não foi significativamente diferente com  $F_{\text{calculado}} = 1342 > F_{\text{tabulado}} = 3,11$  com valor de  $P < 0,0001$  (Mahbobi; Tiemann, 2015). Assim, o método proposto é considerado adequado para descrever a regressão linear na faixa de concentrações de CS-03 de 1 a 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

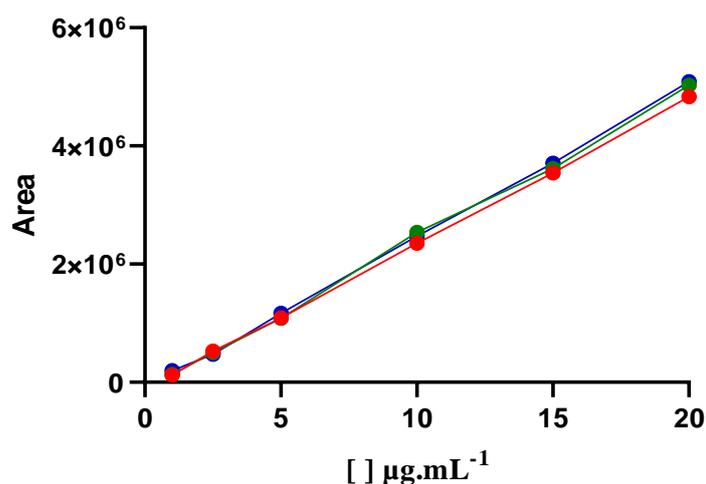
Figura 38 - Homocedasticidade dos resíduos obtidos a partir de três curvas padrão independentes com seis concentrações do CS-03 variando de 1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



Fonte: O autor, 2022

Para obter a regressão linear de CS-08 (Figura 39), fizemos uma curva padrão com as mesmas concentrações utilizadas para o outro composto (1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), obtendo-se a seguinte equação da curva:  $y=246346x-118872$  com valor de  $r^2= 0,9998$ . A concentração de CS-08 foi calculada usando a equação  $[\text{CS-08}] = (\text{Abs}+118872)/246346$ , onde  $[\text{CS-08}]$  foi a concentração de CS-08 e Abs a área do pico em  $\mu\text{V s}$ .

Figura 39 – Curva padrão do CS-08. Curva 1 (-●-), Curva 2 (-●-) e Curva 3 (-●-).

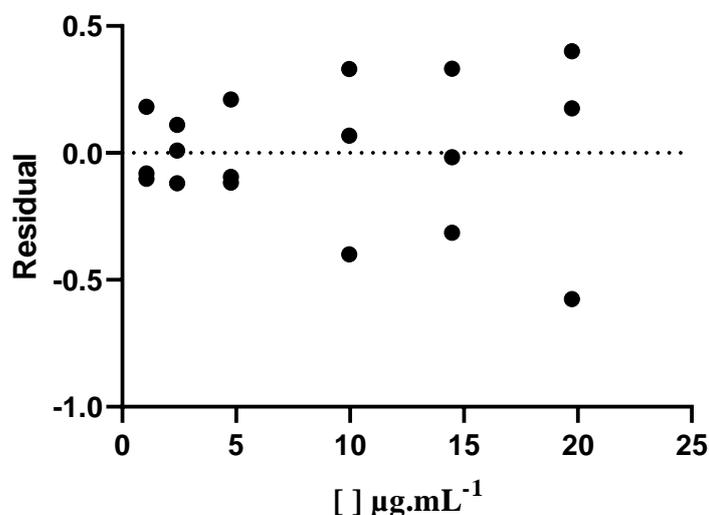


Fonte: O autor, 2022

Conforme a figura 40, observamos que o método se mostrou homocedástico dos resíduos, após análise estatística dos dados de linearidade por meio de ANOVA, conforme recomendado pelo FDA (2015). Esses resultados indicam que a variância é igual à distribuição normal dos valores indicados na regressão linear.

Em relação à análise estatística do teste F, observamos que as comparações das variâncias não foram significativamente diferentes, pois o valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi maior que o valor de  $F_{\text{tabulado}}$  (Mahbobi; Tiemann, 2015) ( $F_{\text{calculado}}=4175 > F_{\text{tabulado}}=4,10$ ) com  $P \text{ valor}=0,0481$ . Assim, o método é adequado para descrever a regressão linear na faixa de concentração avaliada de CS-08, que foi de 1 a 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Figura 40 - Homocedasticidade dos resíduos obtida a partir de três curvas padrão independentes da análise de seis concentrações de CS08 (variando de 1-20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



Fonte: O autor, 2022.

#### 6.3.4.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) está relacionado à menor concentração do analito na amostra de teste que é facilmente detectada, enquanto o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito na amostra de controle, que pode ser determinada com precisão (Armbruster; Pry, 2008; Saadati et al., 2013; Pum, 2019).

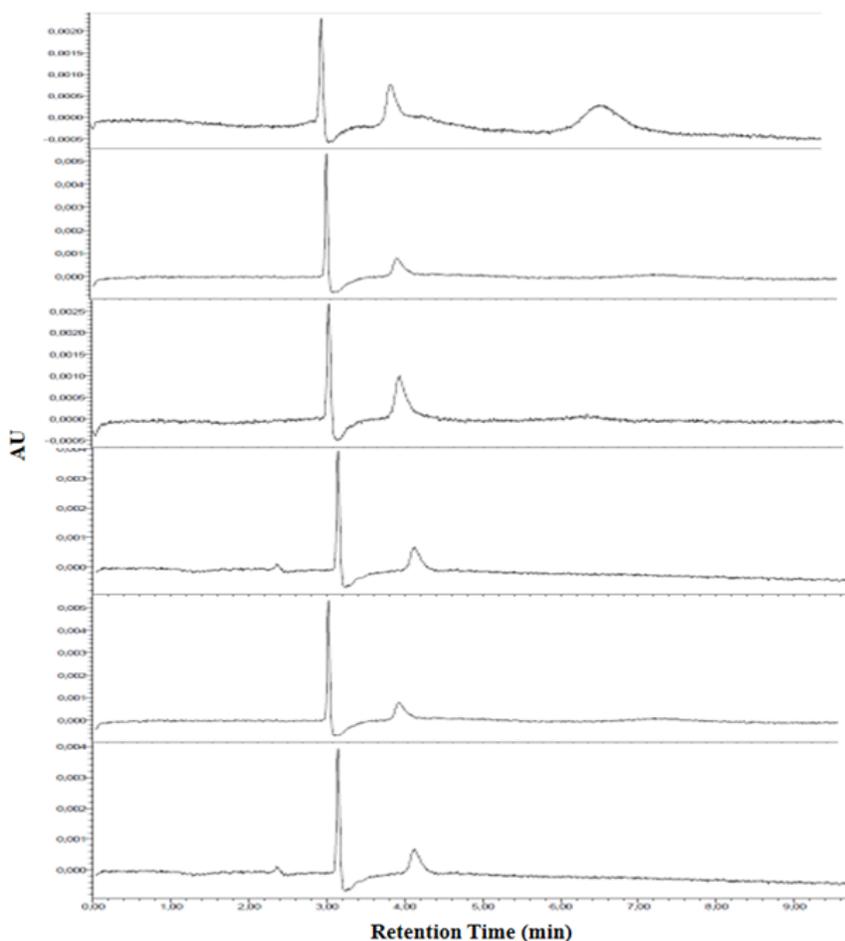
Para o CS-03 os valores LOD e LOQ deste método foram 0,21 e 0,66  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente, e para o CS-08 foram obtidos, LOD= 0,18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e LOQ= 0,36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo dados importantes para a precisão e exatidão de um método, permitindo a análise desses compostos em formulações farmacêuticas com segurança, mostrando que as concentrações em escala de microgramas podem ser quantificadas de forma confiável pela técnica de HPLC-UV (Armbruster; Pry, 2008; Taleuzzaman, 2018).

#### 6.3.4.4 Carry-over

. O carry-over é definido como a contaminação de uma amostra pela anterior, após a eluição da maior concentração da curva. A presença de resíduos pode influenciar na diminuição da exatidão e precisão nas análises de HPLC, afetando análises posteriores. As características químicas do analito contribuirão para a presença ou ausência de resíduos, pois estão relacionadas à afinidade do analito pela fase estacionária e/ou afinidade com o eluente após as análises realizadas (Buszewski; Noga, 2012; Moein; El Beqqali; Abdel-Rehim 2017).

Nos resultados de carry-over mostrados na figura 41 nota-se a presença de resíduo após a eluição do branco no tempo de retenção do CS-03. A taxa de resíduos identificada foi de 0,47%. Este resultado está de acordo com as recomendações das diretrizes do ICH (2020) que determinam que a resposta da amostra em branco deve ser inferior a 20% da resposta de pico do LOQ, o que foi encontrado em nosso estudo foi um percentual de 14,27%.

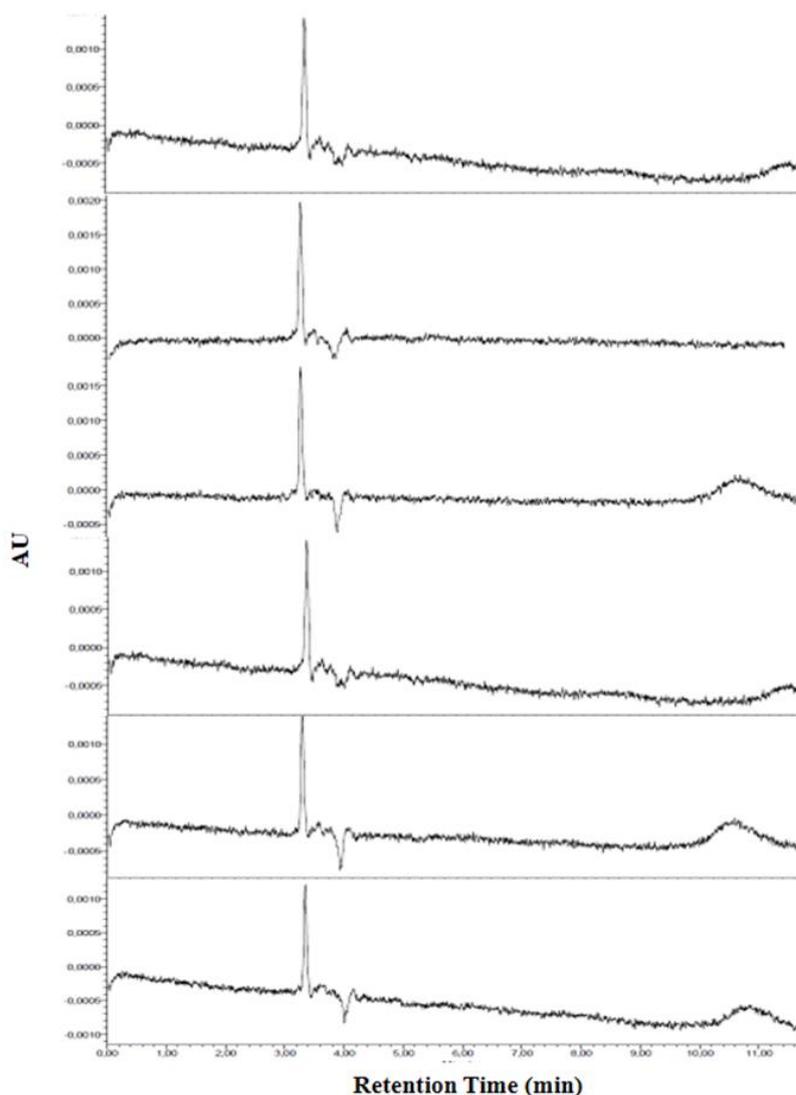
Figura 41 - Resíduo de CS-03 após corrida de concentração máxima de 20 µg.mL-1.



Fonte: O autor, 2022.

Analisando o carry-over para o CS-08, foi possível verificar (Figura 42) que após a eluição da fase móvel, que não há resíduo do composto analisado. Diante desses resultados, a proporção da fase móvel parece ser adequada para a análise com o CS-08.

Figura 42 - Resíduo de CS-08 após corrida de concentração máxima de 20 µg.mL<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor, 2022.

#### 6.3.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico está relacionada à capacidade do método de obter dados quantitativos sobre a concentração do analito o mais próximo do valor teórico (ICH, 2020). Em nosso estudo, avaliamos a exatidão do método HPLC-UV por meio de três níveis de concentração (1, 10 e 20 µg.mL<sup>-1</sup>).

A exatidão obtida entre as concentrações de CS-03 variou de 103 a 105% (Tabela 19), de acordo com as recomendações do FDA (2020), que recomenda valores que variam de 95 a 105%. Os valores de RSD ficaram entre 1,69 a 3,39%. De acordo com os resultados obtidos, o método validado é considerado exato, seguindo as recomendações do ICH (2020) quanto aos requisitos de pesquisa de qualidade de medicamentos.

Tabela 19 – Exatidão do método de quantificação por HPLC para o CS-03.

CS-03 concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CS-03 concentração observada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	SD	Exatidão (%)	RSD (%)
1	1.03	0.02	104.9	3.39
10	10.47	0.15	105.2	2.62
20	20.65	0.24	103.3	1.69

SD: Desvio padrão, RSD: Desvio padrão relativo. Fonte: O autor, 2022.

Para o CS-08, os dados apresentados na tabela 20 mostram que o método foi exato, com valores de exatidão nas três concentrações (1, 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) testadas em torno de 97,8 a 100,7%, seguindo as recomendações do FDA (2020). Os valores obtidos do RSD também foram de acordo com os recomendados pelo ICH (2020), com valores entre 2,58 e 4,71%.

Tabela 20 – Exatidão do método de quantificação por HPLC para o CS-08.

CS-08 concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CS-08 concentração observada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	SD	Exatidão (%)	RSD(%)
1	0.94	0.03	97.8	4.71
10	10.03	0.61	100.3	3.70
20	20.14	0.38	100.7	2.58

SD: Desvio padrão, RSD: Desvio padrão relativo. Fonte: O autor, 2022

#### 6.3.4.6 Precisão

A precisão de um método refere-se ao grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é realizado repetidamente,

podendo ser interdias ou intradias, do mesmo analista ou com analistas diferentes (Thompson, 2012; Sheetal, 2013).

A avaliação da precisão do método foi realizada a partir da quantificação do CS-03 em três concentrações (1, 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por repetibilidade e precisão intermediária em dias diferentes (inter-dia), evidenciando os dados apresentados na tabela 21. Os valores obtidos para RSD após repetibilidade (intra-dia) variaram de 2,36 a 3,99%, enquanto os dados inter-dia apresentaram variação de RSD entre 0,75 a 3,51%. Os dados também atendem às recomendações das diretrizes ICH (2020), que afirmam que a precisão do RSD inter-dia e intra-dia não deve exceder 15%.

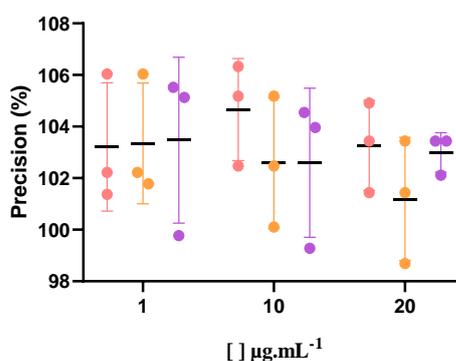
Tabela 21 – Precisão intra-dia e e inter-dia nalaisadas pelo método de HPLC para quantificação do CS-03.

Parâmetros de validação	CS-03 Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CS03 Concentração observada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	SD	RSD (%)
Precisão Intra-dia	1	1.05	0.02	3.38
	10	10.16	0.29	3.99
	20	20.24	0.33	2.36
Precisão Inter-dia	1	1.03	0.02	3.11
	10	10.12	0.26	3.51
	20	20.60	0.12	0.75

SD: Desvio padrão, RSD: Desvio padrão relativo. Fonte: O autor, 2022

Os resultados de precisão do RSD mostram que houve um baixo número de mudanças significativas entre as concentrações encontradas com o método utilizado. Além disso, na figura 43, podemos observar uma baixa variação em termos de troca de analista, com coeficiente de variação abaixo de 15% conforme recomendado pelo ICH (2020). Diante dos resultados obtidos, o método apresentou baixos erros aleatórios em termos de repetibilidade e precisões intermediárias.

Figura 43 – Precisão intermediária do método por HPLC para quantificação do CS-03. Analista 1 (-●-), Analista 2 (-●-) e Analista 3 (-●-).



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados obtidos para o CS-08 após o estudo de precisão (Tabela 22) mostraram que o método é preciso após avaliação intradia e interdias com variação de RSD em torno de 2,63 a 4,98% e 3,96 a 5,35% respectivamente. Atendendo assim a diretriz ICH (2020).

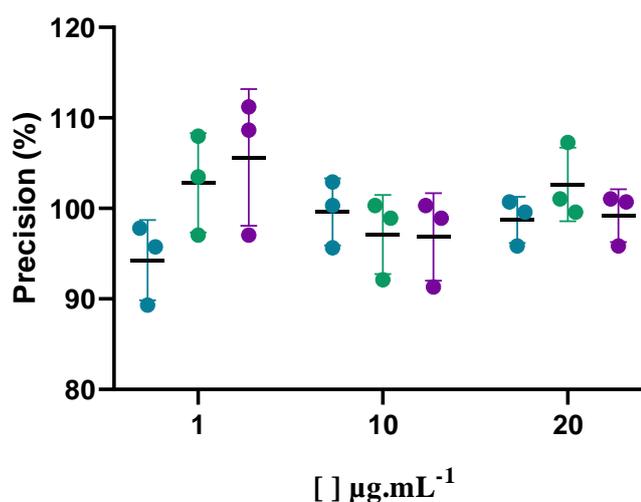
Tabela 22 – Precisão intra-dia e inter-dia realizadas pelo método de HPLC para quantificação do CS-08.

Parâmetros de validação	CS-08 Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CS-08 Concentração observada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	SD	RSD (%)
Precisão Intra-dia	1	1.06	0.04	2.63
	10	9.68	0.33	4.98
	20	19.84	0.61	2.94
Precisão Inter-dia	1	1.02	0.05	5.35
	10	9.71	0.33	4.50
	20	20.52	0.61	3.96

SD: Desvio padrão, RSD: Desvio padrão relativo. Fonte: O autor, 2022

Na figura 44, semelhante aos dados obtidos para o CS-03, é possível verificar que a mudança do analista manteve uma baixa variação das concentrações obtidas, evidenciando que o método também apresenta baixos erros aleatórios em relação à repetibilidade e precisão intermediária para quantificação do CS-08, atendendo ao que é recomendado pelo ICH (2020).

Figura 44 – Precisão intermediária do método por HPLC para quantificação do CS-08. Analista 1 (---), Analista 2 (---) and Analista 3 (---).



Fonte: O autor, 2022.

#### 6.3.4.7 Robustez

A robustez do método está relacionada à capacidade do método analítico de resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos (César, Pianetti, 2009; Ferreira et al., 2017). Para as análises de robustez, foi considerada a concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de CS-03.

Os dados obtidos em nosso estudo (Tabela 23) mostraram que a variação dos parâmetros da fase móvel e da razão de fluxo impactaram diretamente no resultado da concentração de CS-03. Portanto, mostramos que os parâmetros definidos para a validação são os mais adequados para a análise do CS-03 e que variações nos parâmetros de fluxo e proposição da fase móvel podem ser críticas para a análise e apresentar resultados que não condizem com o valor real da molécula.

Tabela 23 – Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, concentração teórica e conteúdo de CS-03.

Referência	CS-03 Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CS-03 Concentração observada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Conteúdo (%)	Rt (min)
R1	10	11.84	118.42	4.48
R2	10	11.94	119.40	4.48
R3	10	11.66	116.62	4.48
R4	10	11.38	113.80	4.28
R5	10	8.75	87.59	4.10
R6	10	11.42	114.23	4.28
R7	10	8.86	88.65	4.13
R8	10	11.27	112.70	4.26
R9	10	8.72	87.28	4.18
R10	10	0.16	1.66	4.29
R11	10	0.17	1.70	4.30
R12	10	0.17	1.75	4.28
R13	10	10.24	102.47	4.10
R14	10	0.52	5.26	4.28
R15	10	10.01	100.15	4.10
R16	10	0.53	5.32	4.28

R17	10	10.38	103.84	4.10
R18	10	0.55	5.54	4.28
R19	10	0.45	4.53	4.66
R20	10	0.27	2.70	4.61
R21	10	0.30	3.02	4.64
R22	10	0.26	2.66	4.36
R23	10	0.28	2.84	4.18
R24	10	0.28	2.81	4.37
R25	10	0.28	2.84	4.22
R26	10	0.27	2.79	4.37
R27	10	0.27	2.75	4.21

Rn: Referência às variações dos parâmetros descritos no item 5.5.5.1.7 da metodologia. Rt: Tempo de retenção. Fonte: O autor, 2022.

Analisando a variação dos parâmetros na proporção de fase móvel, temperatura e vazão em 5% sobre o método validado para quantificação do CS-08, notou-se (Tabela 24) que o aumento do fluxo para 0,74 mL.min<sup>-1</sup> e diminuição da proporção de acetonitrila na fase móvel para 66,5%, e aumento da água acidificada para 33,5%, atuam como fatores limitantes do método. Há também uma variação no tempo de retenção após pequenas mudanças no fluxo e na fase móvel. Portanto, é importante atentar para as pequenas modificações do método para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos após a análise do CS-08 em HPLC-UV.

Tabela 24 - Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, concentração teórica e conteúdo de CS-08.

Referência	CS-08 Concentração teórica (µg.mL <sup>-1</sup> )	CS-08 Concentração observada (µg.mL <sup>-1</sup> )	Conteúdo (%)	Rt (min)
R1	10	9.63	96.34	7.04
R2	10	10.26	102.69	7.03
R3	10	9.88	98.89	7.02
R4	10	9.15	91.55	6.44
R5	10	1.28	12.87	6.38

R6	10	10.22	102.20	6.53
R7	10	3.42	34.21	6.35
R8	10	9.75	97.55	6.61
R9	10	4.58	45.81	6.33
R10	10	10.39	103.92	6.30
R11	10	9.68	98.42	6.30
R12	10	9.84	96.76	6.30
R13	10	10.29	102.93	6.20
R14	10	9.60	96.09	5.61
R15	10	10.24	102.47	6.20
R16	10	8.74	87.44	5.62
R17	10	9.72	97.20	6.20
R18	10	9.29	92.98	5.61
R19	10	10.04	100.47	5.73
R20	10	9.45	94.53	5.73
R21	10	9.56	95.60	5.73
R22	10	9.09	90.98	5.68
R23	10	0.95	9.50	5.27
R24	10	8.82	88.25	5.45
R25	10	1.31	13.16	6.54
R26	10	9.86	98.62	5.39
R27	10	1.79	17.94	6.72

Rn: Referência às variações dos parâmetros descritos no item 5.5.5.1.7 da metodologia. Rt: Tempo de retenção. Fonte: O autor, 2022.

### **6.3.5 Desenvolvimento de nanopartículas de ETCA revestidas com fucana ou dextrana contendo os compostos e suas caracterizações**

Para o desenvolvimento das nanopartículas, foi utilizado o monômero biodegradável, Etil cianoacrilato (ETCA) que é derivado do isobutil cianoacrilato (IBCA) que tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas (Lira et al., 2011; Cavalcanti et al., 2021).

De acordo com os resultados obtidos pelo zetasizer (Tabela 25), foi possível desenvolver as nanopartículas usando ETCA como monômero, obtendo valores de diâmetro menores para as nanopartículas com dextran (450,7 nm para NP-Dex-ETCA, 169,7 nm para CS-03 -NP-Dex-ETCA e 232.7 nm para CS-08 -NP-Dex-ETCA) e superior para nanopartículas com fucana (679,6 nm para NP-Fuc-ETCA, 441,6 nm para CS-03-NP-Fuc-ETCA e 389.2 nm para CS-08-NP-Fuc-ETCA). A dispersão das nanopartículas foi homogênea com valores de PDI abaixo de 0,2 (Danaei et al., 2018).

Essa variação no tamanho das nanopartículas está relacionada ao tamanho da cadeia polissacarídica, uma vez que a fucana possui uma estrutura química maior que a dextrana. Essa diferença de tamanho também foi observada nos estudos de Lira-Nogueira et al. 2022 e Cavalcanti et al. 2021, ambos desenvolveram nanopartículas utilizando os polissacarídeos dextrana e fucana.

Tabela 25 - Tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação do ETCA nanopartículas com CS-03 e com CS-08.

Formulações	Concentração (CS-03) mg.mL <sup>-1</sup>	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	ER%
NP-Dex-ETCA	-	450.7 ± 6.26	0.042	-16.7 ± 0.37	-
CS-03-NP-Dex-ETCA	1	169.7 ± 2.12	0.175	5.5 ± 0.2	68.70 ± 2.23
CS-08-NP-Dex-ETCA	1	232.7 ± 0.55	0,193	+15.6 ± 0.45	67.88 ± 0.12
NP-Fuc-ETCA	-	679.6 ± 22.51	0.134	-61.7 ± 0.55	-
CS-03-NP-Fuc-ETCA	1	441.6 ± 15.53	0.059	-62.9 ± 0.89	68.29 ± 0.26
CS-08-NP-Fuc-ETCA	1	389.2 ± 19.97	0,086	-63.9 ± 1.13	67.54 ± 0.11

PDI: Índice de polidispersão, ER: Taxa de encapsulação. Fonte: O autor,2022.

Para obter a taxa de encapsulamento dos compostos, foi utilizado o método de HPLC-UV validado anteriormente. Observamos uma taxa de encapsulamento de 67-68% para ambas as nanopartículas, sem diferença significativa ao trocar o polissacarídeo utilizado.

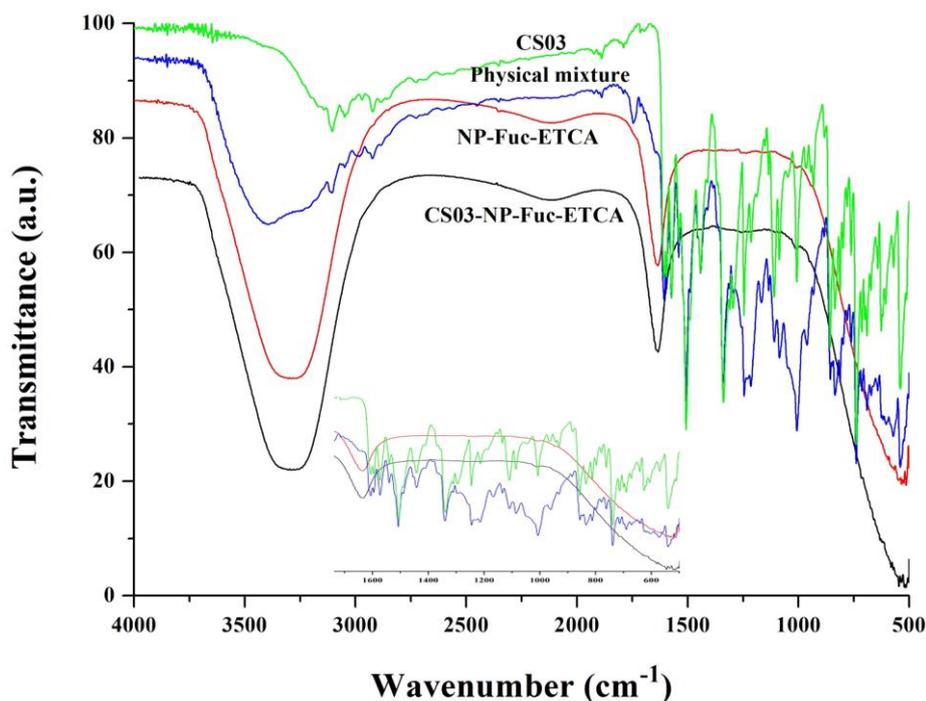
A taxa de encapsulamento pode variar de acordo com a molécula a ser encapsulada, Alhareth et al. (2010) obtiveram uma taxa de encapsulamento de 74% de doxorrubina em nanopartículas de poli(alquil cianoacrilato) contendo dextrana, enquanto Soma et al. (2000) obtiveram na co-encapsulação de ciclosporina A e doxorubicina um total de 99 e 80% respectivamente em nanopartículas de poli(alquil cianoacrilato) com dextrana, e Cavalcanti et al. (2021) mostraram uma taxa de encapsulamento de onocalixona A de 100% para nanopartículas de IBCA com fucana e 67% para nanopartículas de IBCA com dextrana. Esses resultados mostram a capacidade dessas nanopartículas de encapsular medicamentos e moléculas candidatas à fármaco.

#### 6.3.5.1 Caracterização das NP's com a técnica de infra-vermelho por transformada de Fourier

A técnica de infravermelho foi utilizada para caracterizar as nanopartículas, onde observa-se as bandas de absorção das amostras, para CS-03 ocorre uma banda de média intensidade em torno de  $3125\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo indol N-H, outra banda em torno de  $1545\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=N do azometino e em torno de  $1500\text{ cm}^{-1}$  outra banda referente à ligação exocíclica C=N. Também é possível observar em torno de  $1200\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  bandas de absorção referentes à ligação N-N=C e em  $1325\text{ cm}^{-1}$  uma banda referente à ligação N=C-S, corroborando assim os resultados anteriores obtidos na caracterização do composto.

Em relação às nanopartículas de fucana (NP-Fuc-ETCA e CS03-NP-Fuc-ETCA) (Figura 45), podemos observar uma banda de absorção de alta intensidade na região em torno de  $3250\text{ cm}^{-1}$ , que se refere à presença de grupos OH e outra banda de absorção em  $1625\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C=O, em linha com o estudo de Cavalcanti et al. (2021). Na mistura física podemos observar a superposição das bandas de absorção de CS-03 livre e NP-Fuc-ETCA, sugerindo assim que na amostra de CS-03-NP-Fuc-ETCA houve o encapsulamento do composto nas nanopartículas.

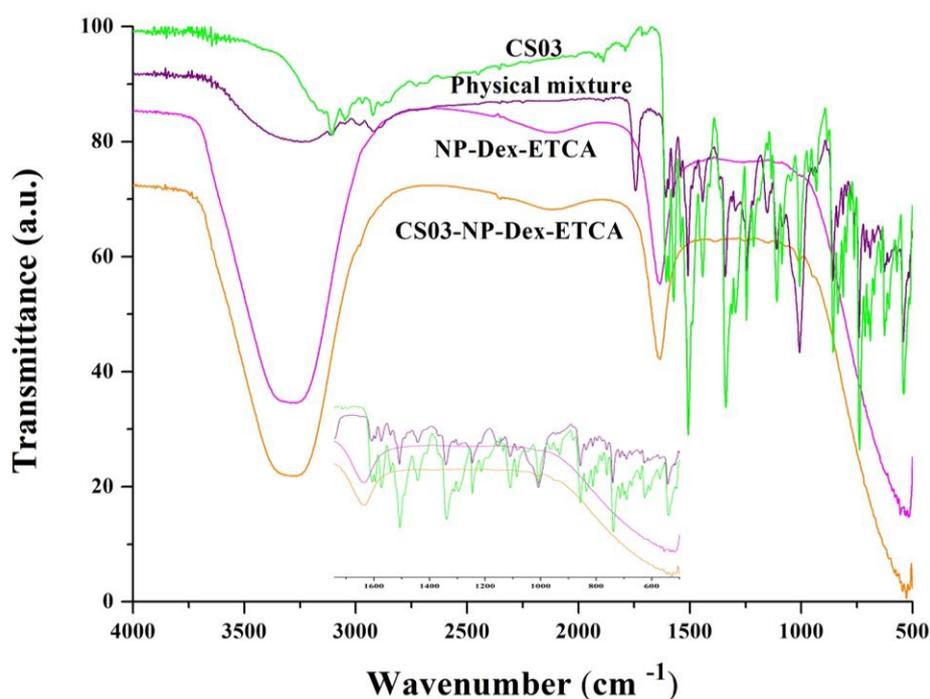
Figura 45 – Espectro do CS-03 (linha verde), Mistura física CS-03 e NP-Fuc-ETCA (linha azul), NP-Fuc-ETCA (linha vermelha), e CS03-NP-Fuc-ETCA (linha preta).



Fonte: O autor, 2022.

Os resultados das nanopartículas de dextrana (NP-Dex-ETCA e CS03-NP-Dex-ETCA) (Figura 46) também foram semelhantes aos das nanopartículas de fucana, mostrando uma banda de absorção de alta intensidade em torno de 3200-3400 cm<sup>-1</sup> referente ao OH alongamento e outra banda de absorção em torno de 1654 cm<sup>-1</sup> referente à ligação C=O, corroborando com o estudo de Abdurrahmanoglu e Firat (2007). A mistura física também mostra a sobreposição dos picos do CS-03 com os do NP-Dex-ETCA, evidenciando que houve o encapsulamento do composto formando as nanopartículas do CS-03-NP-Dex-ETCA.

Figura 46 – Espectro do CS-03 (linha verde), Mistura física com dextrana (linha roxa), NP-Dex-ETCA (linha rosa), e CS-03-NP-Dex-ETCA (linha laranja).

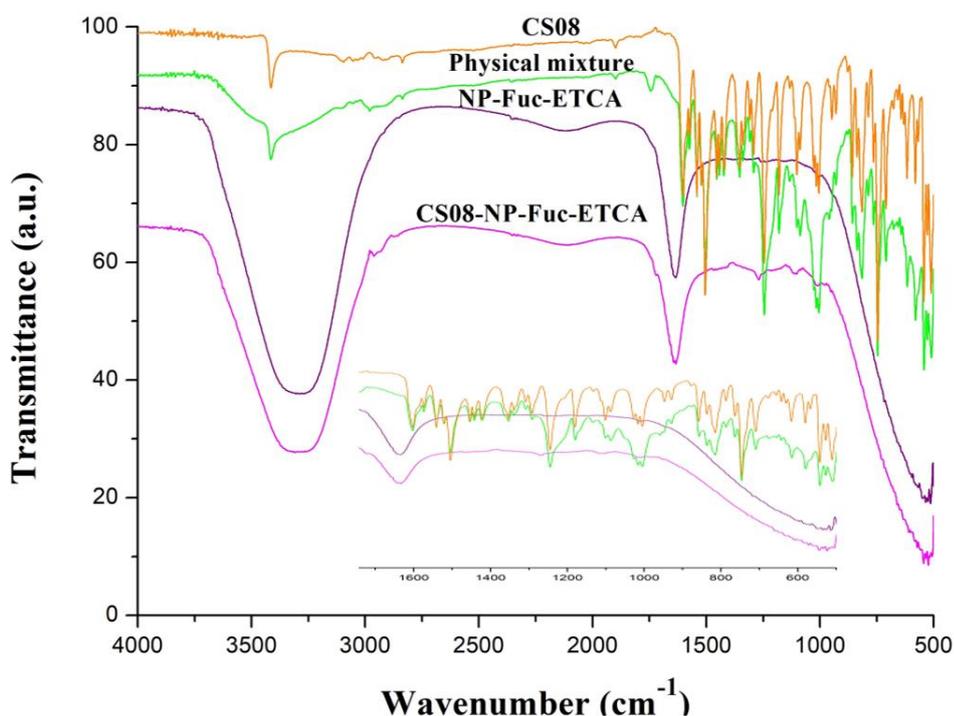


Fonte: O autor, 2022.

Em relação ao CS-08 (Figuras 47 e 48), podemos observar uma banda na região de  $3330\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação N-H do indol, outra banda em torno de  $1570\text{ cm}^{-1}$  que se refere à ligação C=N do azometino, e uma banda de média intensidade em torno de  $1250\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação N-N=C, corroborando com a análise de infravermelho realizada inicialmente.

Quando avaliamos o perfil das nanopartículas de fucana (Figura 47), observamos uma banda de absorção intensa em torno de  $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  referente aos grupos OH e outra banda de absorção de média intensidade na região em torno de  $1600\text{ cm}^{-1}$  ao qual se refere a ligação C=O, esses resultados estão de acordo com os apresentados por Cavalcanti et al. (2021). Podemos observar que na mistura física também há uma sobreposição das bandas de absorção das nanopartículas com a do CS-08, mostrando assim que a molécula estava encapsulada nas nanopartículas.

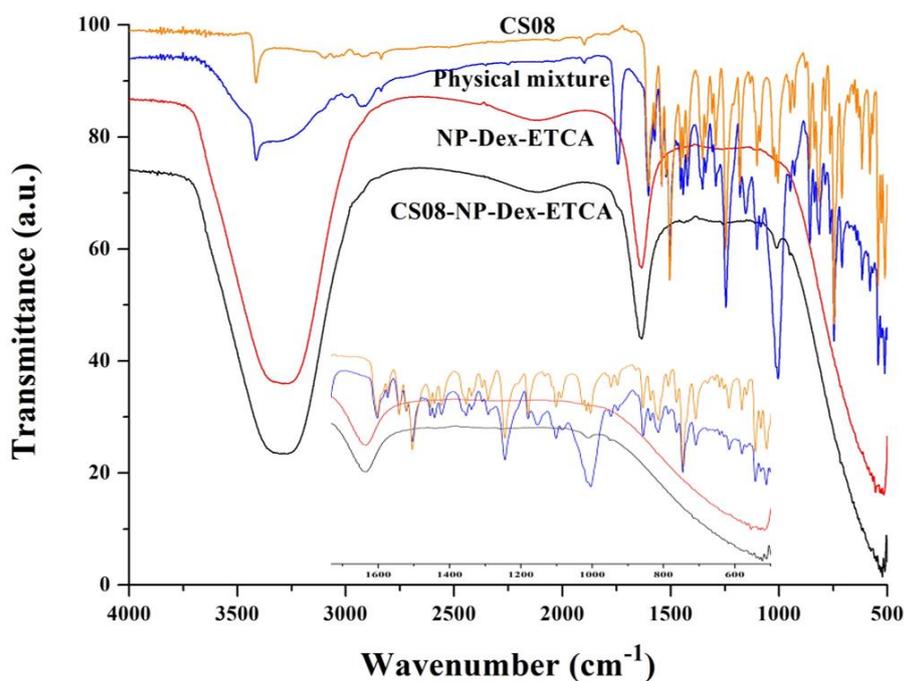
Figura 47 – Espectro do CS-08 (linha laranja), Mistura física com fucana (linha verde), NP-Fuc-ETCA (linha roxa), and CS-08-NP-Fuc-ETCA (linha rosa).



Fonte: O autor, 2022.

Sobre as nanopartículas de dextrana (Figura 48), o perfil das bandas de absorção se assemelha ao das nanopartículas de fucana. Podemos observar a banda de alta intensidade na região entre 3000-3500 cm<sup>-1</sup> referente a OH e outra banda de média intensidade em torno de 1600 cm<sup>-1</sup> relacionada à ligação C=O, corroborando os resultados obtidos no estudo de Abdurrahmanoglu e Firate (2007). Assim como também é possível identificar a sobreposição das bandas características de CS-08 e nanopartículas na mistura física, mostrando que CS-08 também foi encapsulado em nanopartículas de dextrana.

Figura 48– Espectro do CS-08 (linha laranja), Mistura física com dextrana (linha azul), NP-Fuc-ETCA (linha vermelha), and CS-08-NP-Fuc-ETCA (linha preta).

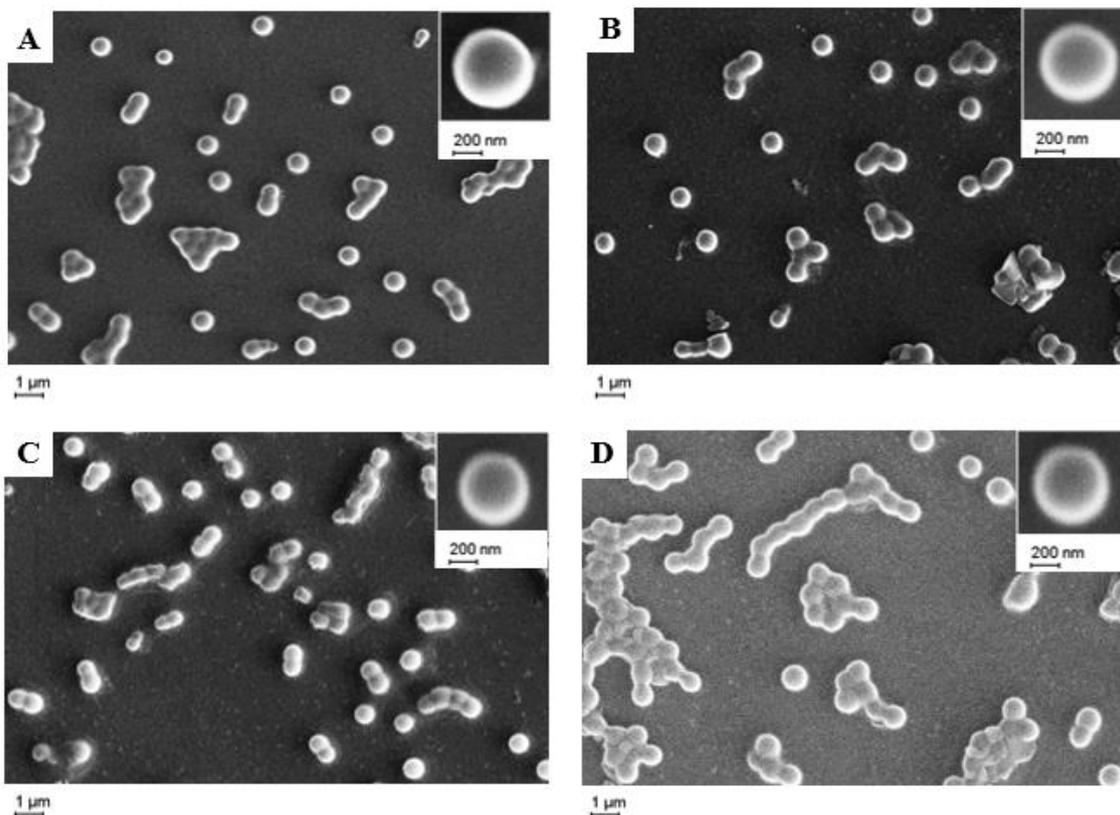


Fonte: O autor, 2022.

#### 6.3.5.2 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise microscópica possibilitou avaliar a morfologia das nanopartículas contendo CS-03 (Figura 49), que apresentaram forma esférica e distribuição homogênea, corroborando os resultados do índice de polidispersão (PDI) obtidos no zetasizer (Tabela 25). Esses resultados estão de acordo com os artigos de Lira et al. (2011), Cavalcanti et al. (2021), Lira-Nogueira et al. (2022), e Cavalcanti et al. (2022) que mostraram as mesmas características microscópicas com nanopartículas de IBCA.

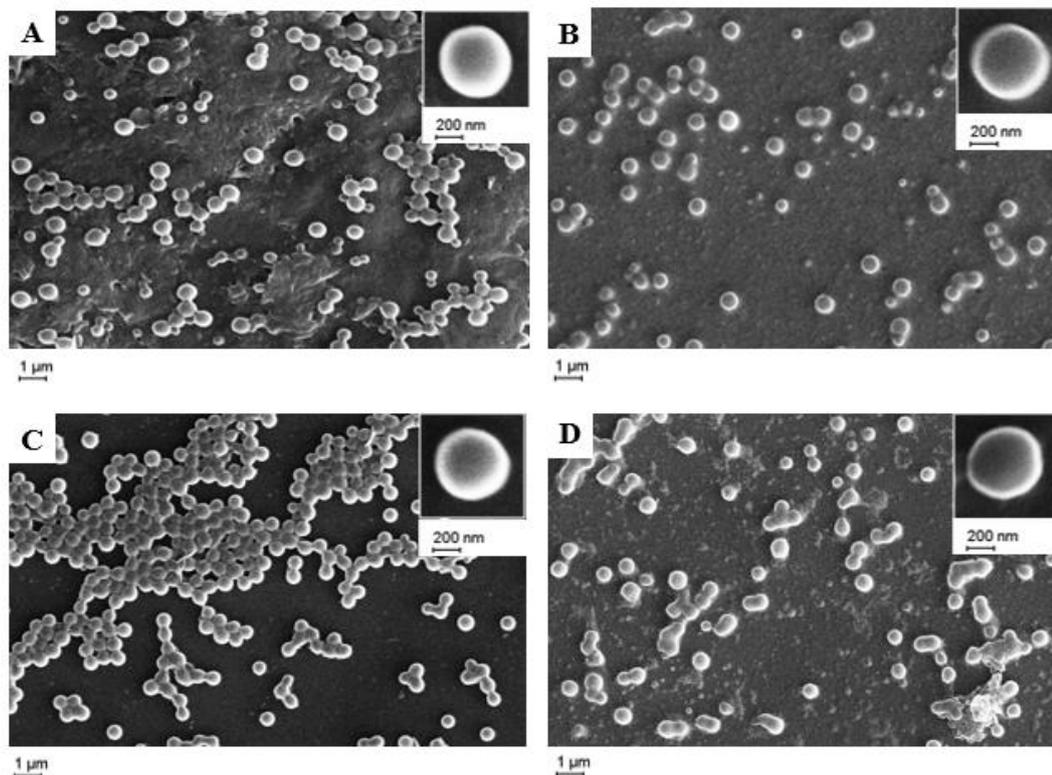
Figura 49 – Estrutura morfológica da NP-Dex-ETCA (A), CS03-NP-Dex-ETCA (B), NP-Fuc-ETCA (C) e CS03-NP-Fuc-ETCA (D) obtidas por MEV.



Fonte: O autor, 2022.

As imagens obtidas no MEV mostraram nanopartículas que contém o CS-08 (Figura 50) também apresentaram morfologia esférica e distribuição homogênea, corroborando com os resultados obtidos do PDI (Tabela 25), mostrando uma monodispersidade nanopartículas revestidas com fucana ou dextrana. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Lira et al., 2011; Cavalcanti et al., 2021; Lira-Nogueira et al., 2022; Cavalcanti et al., 2022).

Figura 50 – Estrutura morfológica da NP-Dex-ETCA (A), CS-08-NP-Dex-ETCA (B), NP-Fuc-ETCA (C) e CS-08-NP-Fuc-ETCA (D) obtidas por MEV.



Fonte: O autor, 2022.

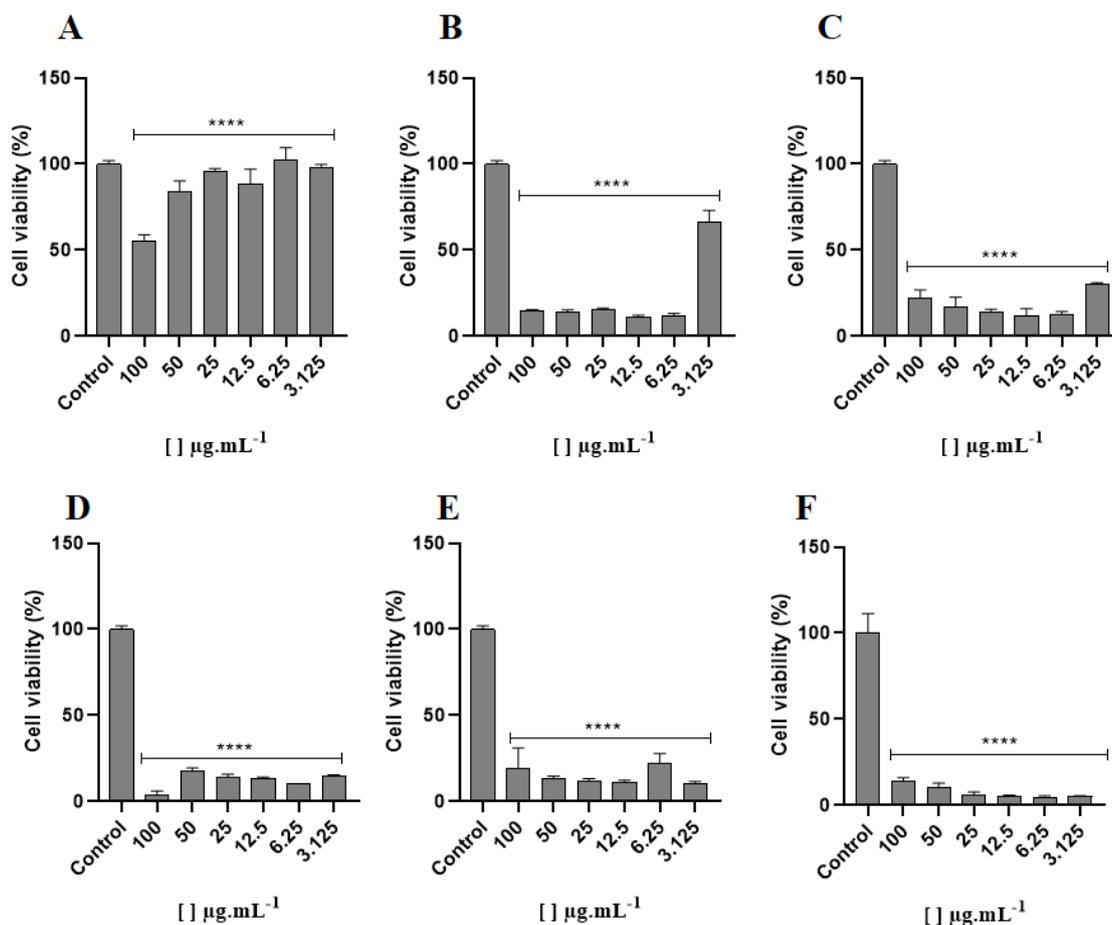
Conforme evidenciado por Cavalcanti et al. (2021), também podemos observar a característica core-corona dessas nanopartículas contendo CS-03 ou CS-08, causada pelo revestimento de polissacarídeos na superfície das nanopartículas.

### 6.3.6 Citotoxicidade em macrófagos J774A.1 dos novos derivados indol-tiazólicos encapsulados nas nanopartículas poliméricas

#### 6.3.6.1 Nanopartículas com CS-03

Os resultados de citotoxicidade mostraram que o composto CS-03 apresentou baixa toxicidade na linhagem de macrófagos J774A.1 nas concentrações testadas, apenas na concentração mais elevada que apresentou taxa de viabilidade celular em torno de 50% (Figura 51). Em contrapartida, todos os grupos referentes às nanopartículas pareceram tóxicos pelos resultados obtidos através do metabolismo do MTT (Figura 51) apresentando resultados semelhantes ao grupo da doxorrubicina.

Figura 51- Citotoxicidade do CS-03 livre e encapsulado.



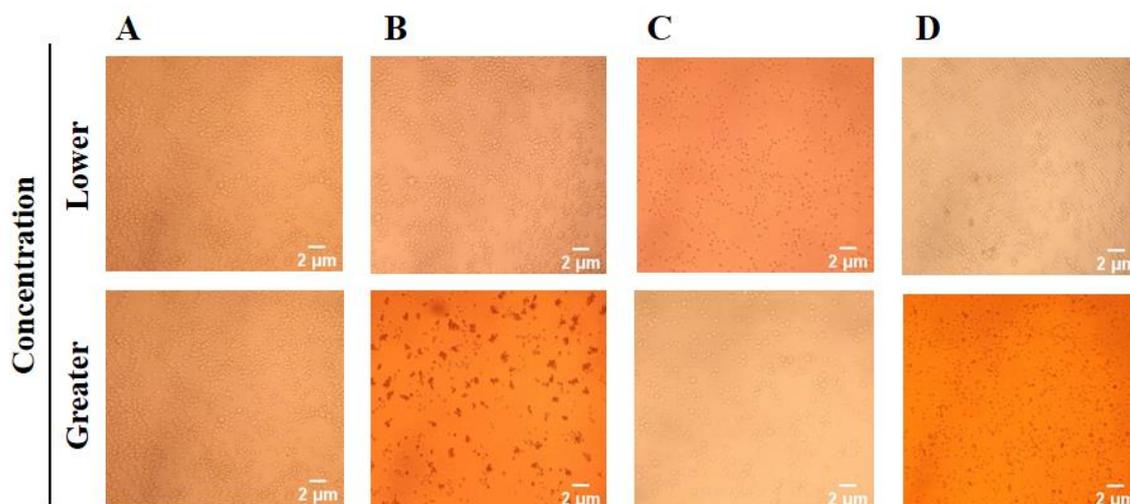
CS-03 livre(A), CS-03-NP-Dex-ETCA (B), CS-03-NP-Fuc-ETCA (C), NP-Dex-ETCA (D), NP-Fuc-ETCA (E), e doxorubicina (F) em macrófagos J774A.1. Fonte: O autor, 2023

Porém, podemos observar nas figuras 52 e 53 que os aspectos morfológicos dos macrófagos foram conservados em todos os grupos de nanopartículas após exposição às menores e maiores concentrações, o que nos leva a sugerir que o monômero ETCA ou os polissacarídeos (dextrana e fucoidan) podem estar interferindo no metabolismo do MTT nas células macrófagos e, assim, induzindo resultados errôneos.

Na Figura 52B podemos observar que na menor concentração de CS-03 as células se mostram viáveis enquanto na maior concentração perdem sua estrutura e ficam mais escuras, evidenciando danos celulares e corroborando os resultados apresentados pelo MTT. Ao comparar as imagens do CS-03 com as imagens do NP-Dex-ETCA (Figura 52C) e CS-03-NP-Dex-ETCA (Figura 52D), em ambas as concentrações as células não apresentam sinais de dano celular, corroborando os resultados obtido por Lira et al. (2011). Quando comparamos as imagens de maior

concentração de CS-03 livre com CS-03-NP-Dex-ETCA, parece que o encapsulamento do composto protege os macrófagos da toxicidade do CS-03 em altas concentrações, o que vai contra os resultados apresentado após a leitura do metabolismo do MTT.

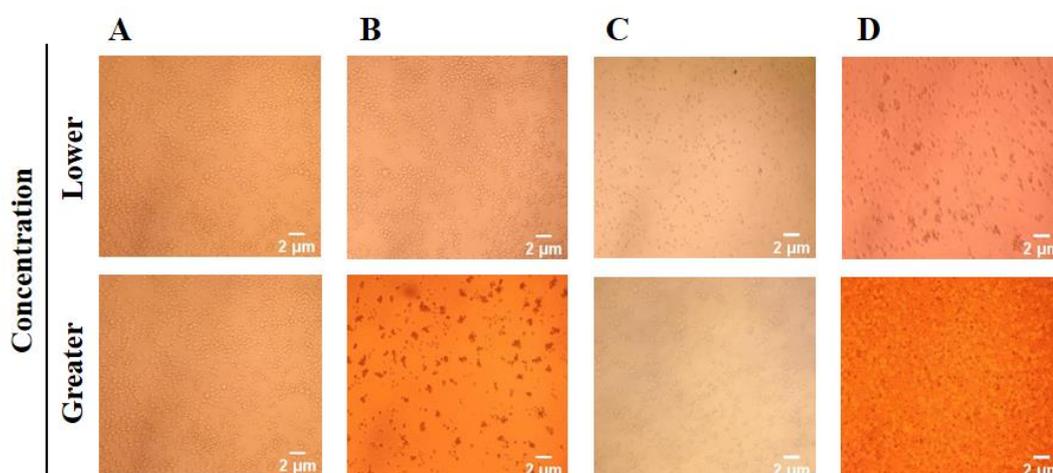
Figura 52 - Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-03 livre e encapsulados em nanopartículas com dextrana.



Controle negativo macrófagos J774 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-03 (coluna B), NP-Dex-ETCA (coluna C), CS-03-NP-Dex-ETCA (coluna D) em concentrações mais baixas (linha 1) e mais altas (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

Resultados semelhantes são apresentados no grupo de nanopartículas com fucana, mostrando que o NP-Fuc (Figura 53C) não parece ser tóxico, corroborando os estudos de Lira et al. (2011) e Cavalcanti et al. (2021) que identificaram que nanopartículas de IBCA revestidas com fucana não são tóxicas para células de macrófagos J774A.1. Porém, as nanopartículas CS-03-NP-Fuc-ETCA (Figura 53D) foram tóxicas na concentração mais alta, provavelmente por favorecer a internalização de CS-03 dentro dos macrófagos. Muitos estudos têm destacado as limitações dos ensaios MTT na mensuração dos resultados de viabilidade celular, uma vez que o ensaio MTT se baseia na redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan por células metabolicamente ativas, não estando diretamente associado a células que sofreram apoptose, o que limita a interpretação do ensaio e leva a resultados não-conclusivos (Surin et al., 2017; Rai et al., 2018; Ghasemi et al., 2021).

Figura 53 - Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-03 livre e encapsulados em nanopartículas com fucana.

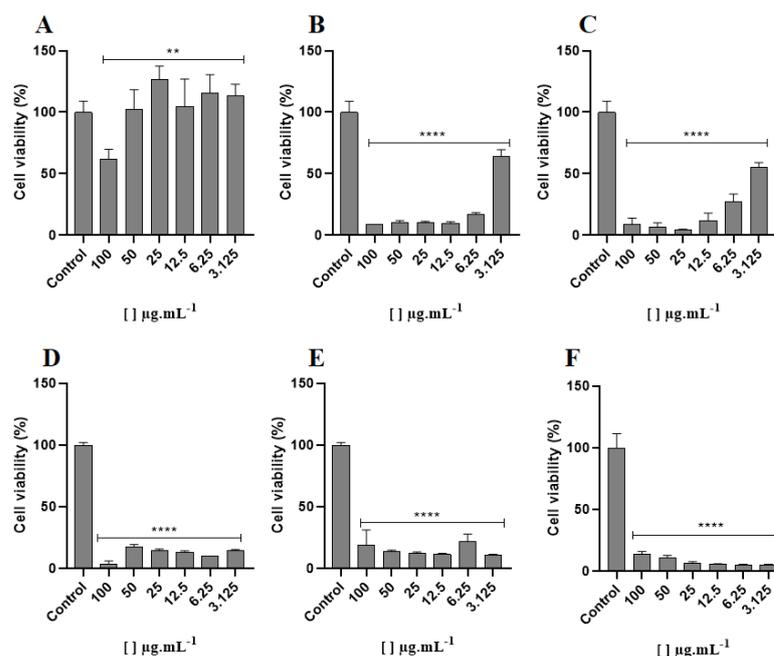


Controle negativo macrófagos J774 (coluna A), sob microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-03 (coluna B), NP-Fuc-ETCA (coluna C) e CS-03-NP-Fuc-ETCA (coluna D) em concentrações mais baixas (linha 1) e mais altas (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

#### 6.3.6.2 Nanopartículas com CS-08

Para o estudo da citotoxicidade das nanopartículas com CS-08 (Figura 54), os resultados foram muito semelhantes aos encontrados para o CS-03. O CS-08 livre apresentou baixa toxicidade para macrófagos. Por outro lado, as nanopartículas (CS-08-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Fuc-ETCA) eram tóxicas, assim como as nanopartículas brancas (NP-Dex-ETCA e NP-Fuc-ETCA). Esses resultados não corroboram com o que encontramos na literatura, uma vez que Lira et al. (2011), Cavalcanti et al. (2021) e Lira-Nogueira et al. (2022) relataram que nanopartículas revestidas com fucana ou dextrana não eram tóxicas para macrófagos ou fibroblastos.

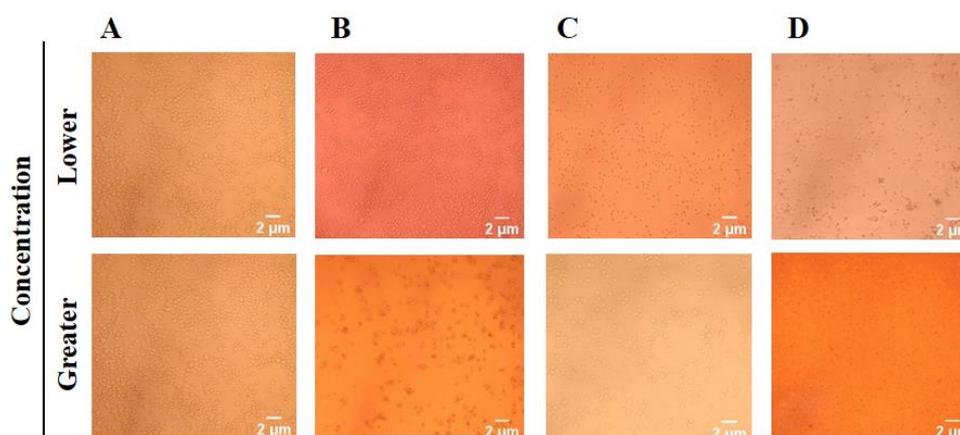
Figura 54- Citotoxicidade do CS-08 livre e encapsulado.



CS-08 livre (A), CS-08-NP-Dex-ETCA (B), CS-08-NP-Fuc-ETCA (C), NP-Dex-ETCA (D), NP-Fuc-ETCA (E), e doxorubicina (F) contra macrófagos J774. Fonte: O autor, 2023.

Quando avaliamos as imagens de macrófagos no microscópio óptico (Figuras 55 e 56), observamos que nas nanopartículas (NP-Dex-ETCA) (Figura 55) em ambas as concentrações (maior e menor) as células permaneceram viáveis, como parece no controle. Acreditamos que a dextrana provavelmente possa inibir a ação do MTT, retardar sua metabolização nas células e/ou impedir sua internalização, proporcionando resultados inconclusivos.

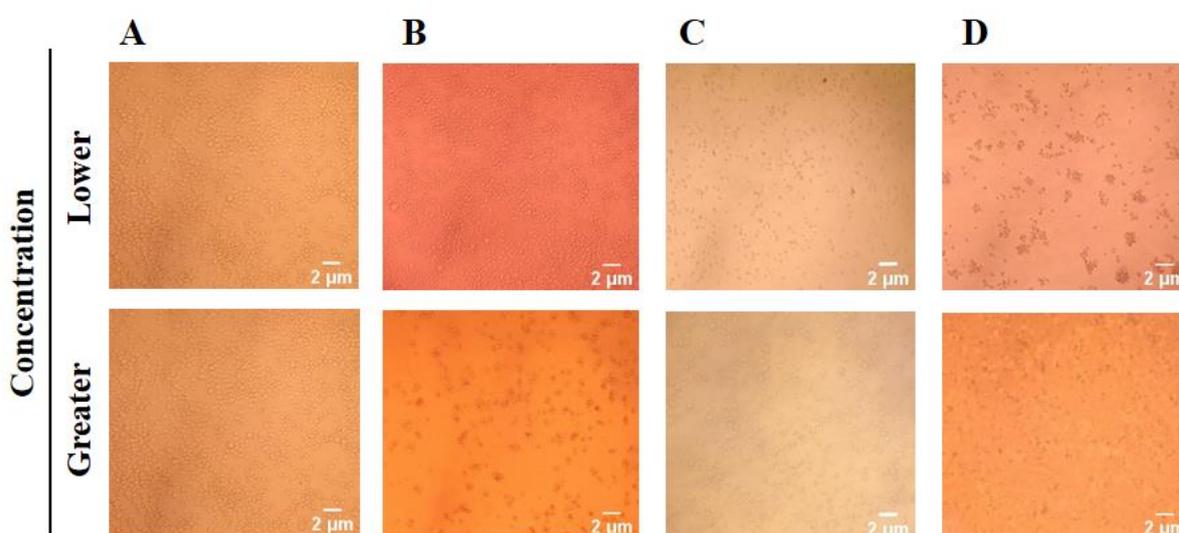
Figura 55 - Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-08 livre e encapsulados em nanopartículas com dextrana.



Controle negativo macrófagos J774 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-08 (coluna B), NP-Dex-ETCA (coluna C), CS-08-NP-Dex-ETCA (coluna D) em concentrações mais baixas (linha 1) e maiores (linha 2). Fonte: O autor, 2023

Os resultados com NP-Fuc-ETCA (Figura 56) são semelhantes aos do NP-Dex-ETCA, mostrando que em ambas as concentrações as nanopartículas sem o fármaco não foram tóxicas. De acordo com Han et al. (2019), a fucana parece ter influência na disfunção mitocondrial, atuando como molécula protetora contra a disfunção mitocondrial. Segundo Shiau et al. (2022), a fucana também parece aumentar os níveis de superóxido mitocondrial. Essa ação da fucana sobre a mitocôndria pode ser um dos fatores que inibem a ação de redução do MTT sem causar danos celulares.

Figura 56 - Aspectos morfológicos das células pós-tratamento com CS-08 livre e encapsulados em nanopartículas com fucana.



Controle negativo macrófagos J774 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS08 (coluna B), NP-Fuc-ETCA (coluna C) e CS08-NP-Fuc-ETCA (coluna D) em concentrações mais baixas (linha 1) e maiores (linha 2). Fonte: O autor, 2023

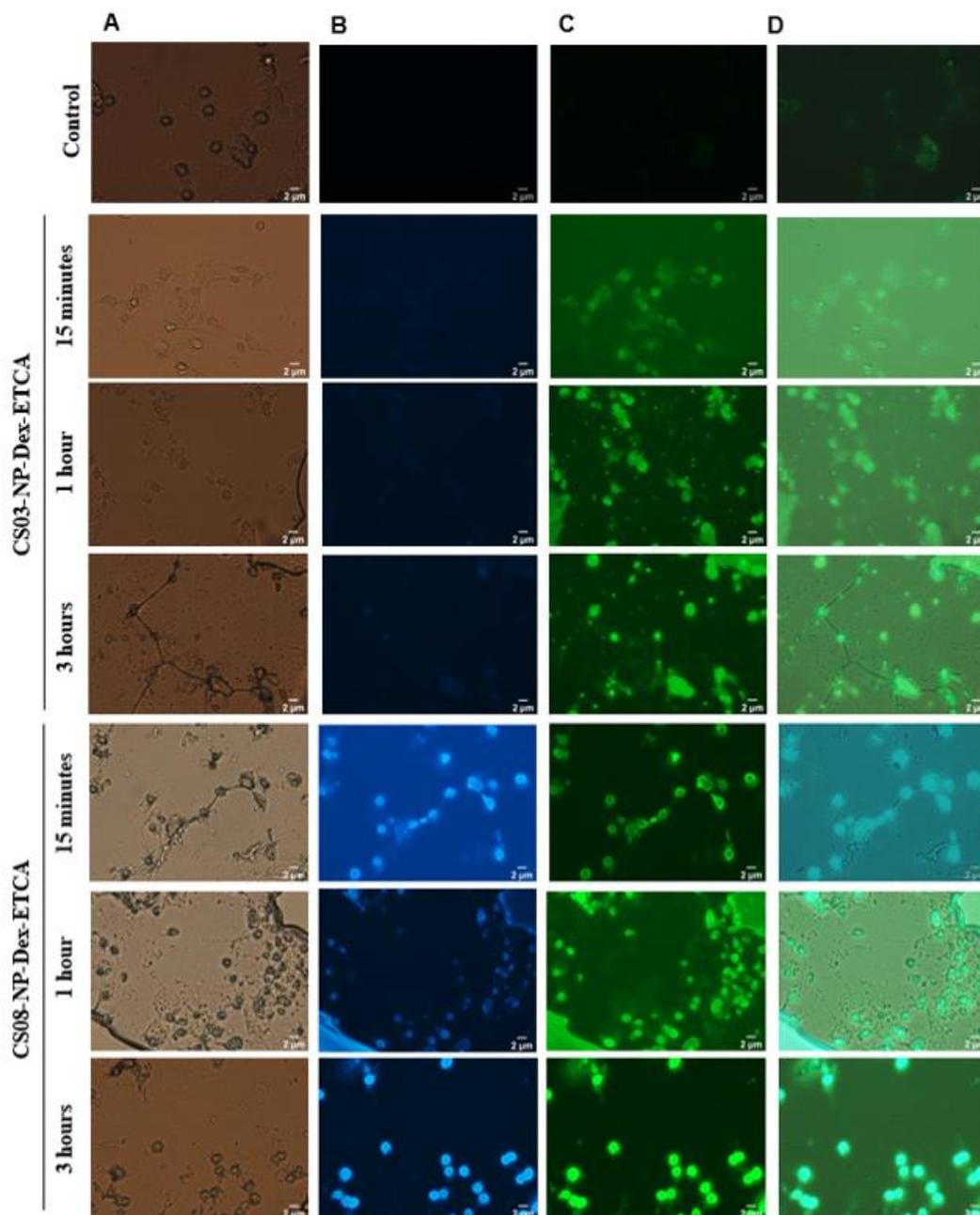
### 6.3.7 Captura celular em macrófagos J774A.1 dos novos derivados indol-tiazólicos encapsulados nas nanopartículas poliméricas

Para os estudos de captação celular utilizamos CS-03 e CS-08 como marcador fluorescente, sabe-se que os derivados de indóis são conhecidos como sondas fluorescentes que podem emitir fluorescência em diferentes regiões, conforme demonstrado no estudo de Younis et al. (2020) que demonstraram que os derivados de indol exibem emissão induzida por agregação com luminescência branca, verde ou azul. Além disso, no estudo de You et al. (2019), os autores demonstram que indóis derivados de aldeídos podem apresentar fluorescência na região verde. Os dados da

literatura corroboram os resultados apresentados, nos quais podemos observar a fluorescência do composto CS-03 e CS-08 (Figuras 57 e 58) na região verde e uma leve fluorescência na região azul. Os resultados do estudo de captação celular de macrófagos mostraram que CS-03-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Dex-ETCA são capturados por macrófagos nos primeiros 15 minutos, com captação aumentando após 1 e 3 horas de exposição ao nanopartículas (Figura 57).

De acordo com o estudo de Lira et al. 2011 e Lira-Nogueira et al. 2022, nanopartículas contendo apenas dextrana em sua superfície são capturadas pelos macrófagos J774A.1, e assim como nossos resultados, essa captura não é imediata e pode ser evidenciada após 1 hora de exposição às nanopartículas. Segundo Lira-Nogueira et al. (2022), a captação celular de nanopartículas de dextrana parece estar relacionada preferencialmente à via de endocitose mediada por clatrina, mas também pode ser internalizada através de vias independentes de caveolina e clatrina-caveolina.

Figura 57 - Células J774 antes e depois da incubação em diferentes tempos com sistema CS-03-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Dex-ETCA.

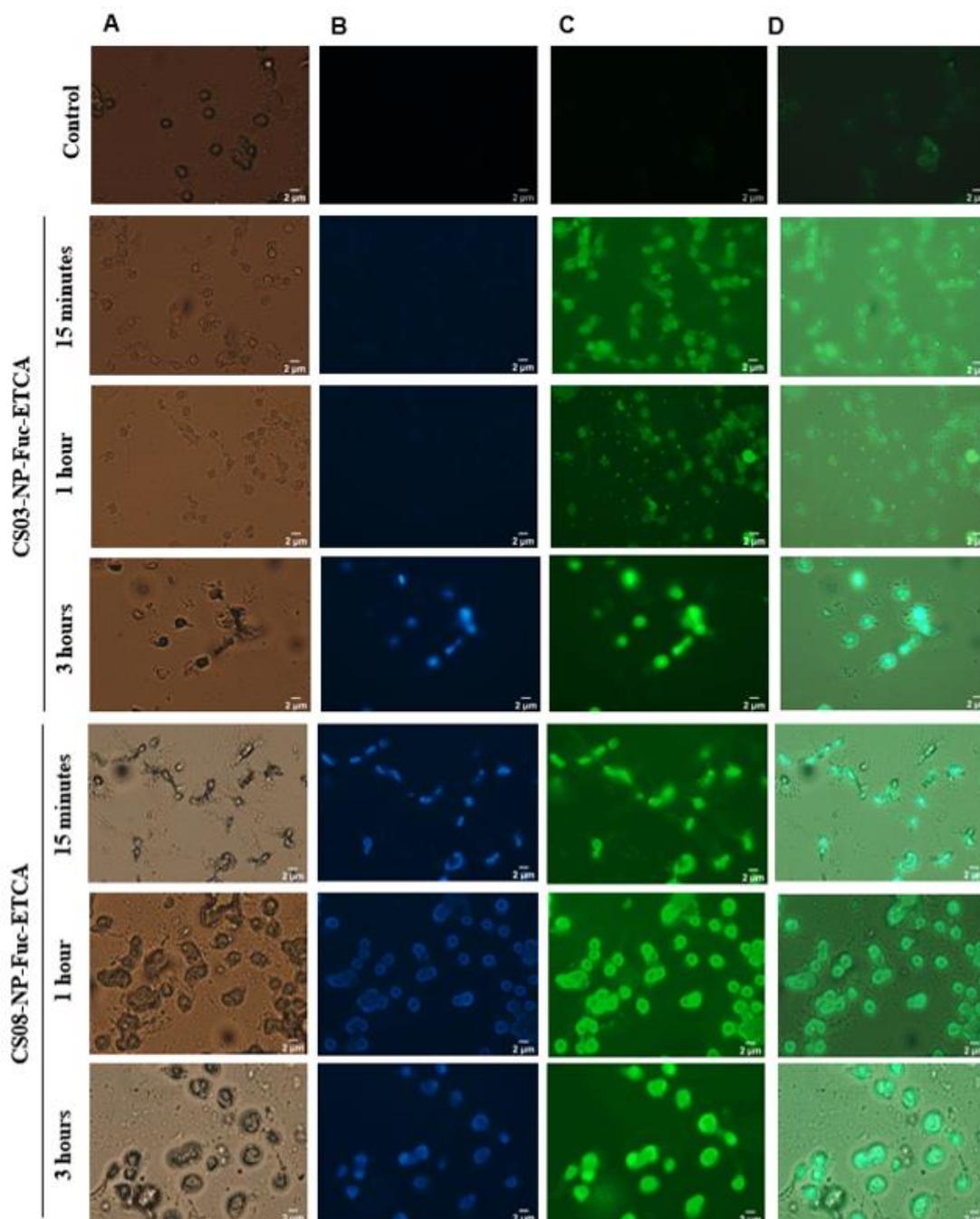


Coluna A: Filtro branco; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: filtro de fluor Alexa; Coluna D: sobreposição das imagens A, B e C. Linha 1: células controle em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-03-NP-Dex-ETCA, respectivamente e linha 5,6 e 7: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-08-NP-Dex-ETCA, respectivamente. Barra de escala: 2 µm. Fonte: O autor, 2023.

Quanto aos resultados obtidos da captação celular de CS-03-NP-Fuc-ETCA e CS-08-NP-Fuc-ETCA, observamos que nos primeiros 15 minutos já é possível identificar uma alta intensidade de fluorescência de CS-03 e CS-08, indicando que as nanopartículas de fucana são rapidamente capturadas pelos macrófagos (Figura 58).

Com 3 horas de incubação é possível identificar uma maior intensidade de fluorescência no verde, bem como identificar fluorescência na região azul, provavelmente devido a uma maior internalização de CS-03 e CS-08 nesta linhagem celular. Esses resultados também estão de acordo com os estudos de Lira et al. (2011) e Lira-Nogueira et al. (2022), que mostraram que nanopartículas de IBCA revestidas com fucana são internalizadas por macrófagos. Segundo Lira-Nogueira et al. (2022), a captação celular de nanopartículas de fucana em macrófagos parece ocorrer exclusivamente por vias não endocíticas, e a captação celular pode estar relacionada a vias fagocíticas.

Figura 58 – Células J774 antes e depois da incubação em tempos diferentes com sistema CS-03-NP-Fuc-ETCA e CS-08-NP-Fuc-ETCA.

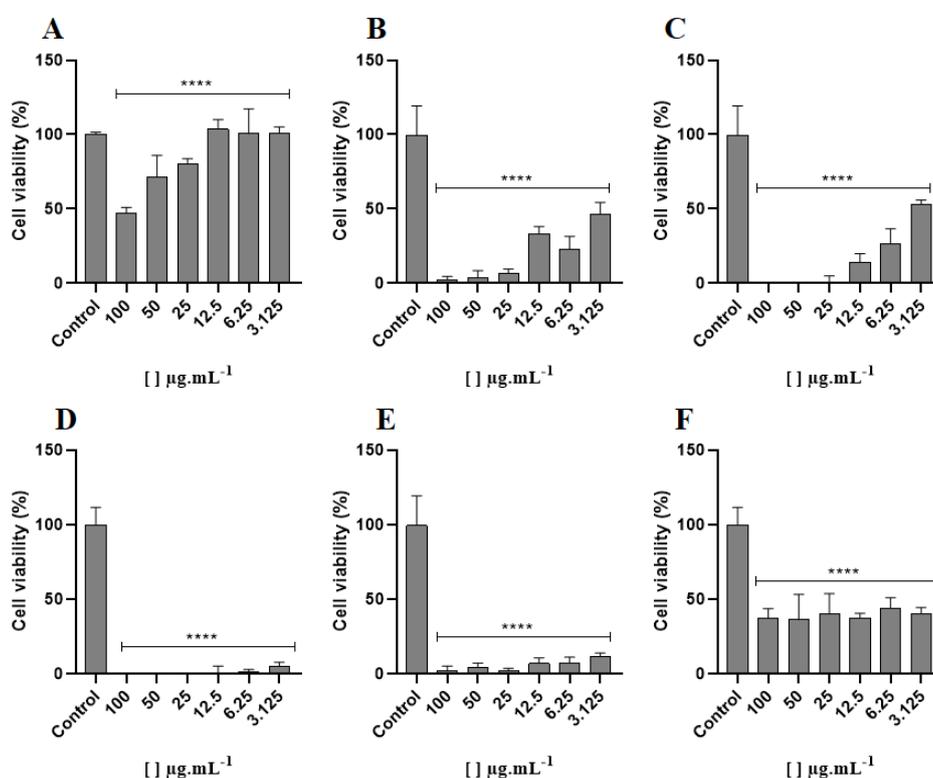


Coluna A: Filtro branco; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: filtro de fluor Alexa; Coluna D: sobreposição das imagens A, B e C. Linha 1: células controle em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-03-NP-Fuc-ETCA, respectivamente: 2 µm. respectivamente e linha 5,6 e 7: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-08-NP-Fuc-ETCA, respectivamente. Barra de escala: 2 µm. Fonte: O autor, 2023.

### 6.3.8 Atividade antiproliferativa dos compostos encapsulados nas nanopartículas poliméricas

Quanto aos resultados de atividade antiproliferativa contra a linhagem MDA-MB-231 (Figura 59), podemos observar que CS-03 (Figura 59A) apresentou atividade contra essas células de câncer de mama em concentrações mais elevadas (100 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtendo um valor de IC<sub>50</sub> de 61,23  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo uma atividade inferior à da doxorrubicina que apresentou um IC<sub>50</sub> de 22,34  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Quando comparamos os resultados com as nanopartículas CS-03-NP-Dex-ETCA (Figura 59B) e CS-03-NP-Fuc-ETCA (Figura 59C), notamos que ambas potencializaram o efeito do CS-03 com valores de IC<sub>50</sub> de 23,09 e 2,13  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente, em que CS-03-NP-Fuc-ETCA apresentou perfil de atividade muito superior ao apresentado pela doxorrubicina. O aumento da atividade do CS-03 encapsulado em NP-Fuc-ETCA pode estar relacionado à liberação intracelular do composto e potencialização do seu efeito terapêutico, conforme evidenciado no estudo de Cavalcanti et al. (2021) e Cavalcanti et al. (2022). Além disso, a fucana possui atividade antitumoral e pode estar agindo sinergicamente com CS-03 (Atashrazm et al., 2015; van Weelden et al., 2019; Chung et al., 2020).

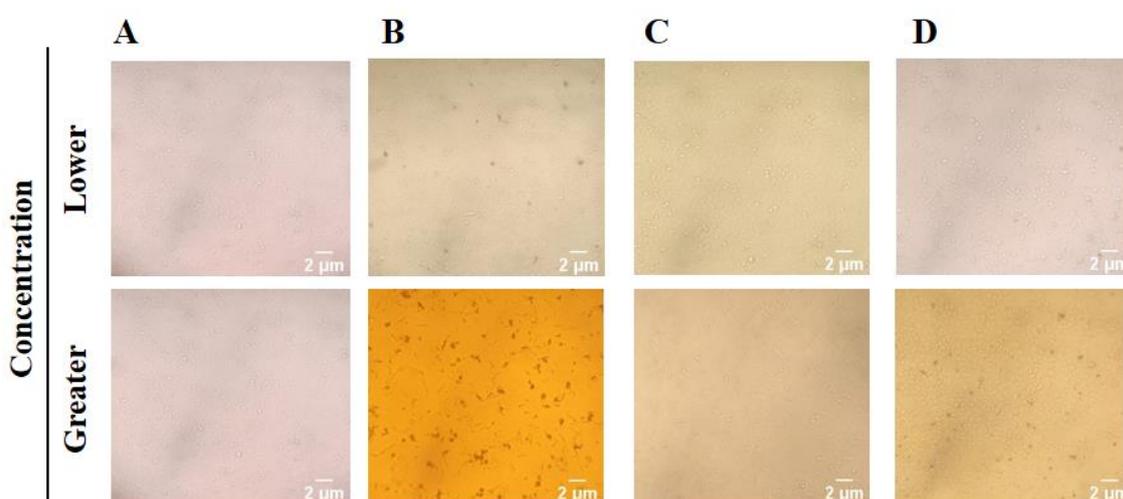
Figura 59 - Atividade antiproliferativa de CS-03 livre e encapsulado.



CS-03 (A), CS-03-NP-Dex-ETCA (B), CS-03-NP-Fuc-ETCA (C), NP-Dex-ETCA (D), NP-Fuc-ETCA (E) e doxorrubicina (F) contra a cepa MDA-MB-231. Fonte: O autor, 2023.

De acordo com as imagens obtidas das células após exposição ao NP-Dex-ETCA (Figura 60C), observamos que as nanopartículas não parecem ter atividade contra células MDA-MB-231, mas sim CS-03-NP-Dex-ETCA (Figura 60D) parecem causar danos celulares quando em concentração mais elevada. Apesar de aparentemente não apresentar efeito pronunciado contra células MDA-MB-231, as nanopartículas de dextrana podem ser um sistema promissor, conforme demonstrado no estudo de Li et al. (2014) que encapsularam cisplatina em nanopartículas de dextrana conjugadas com hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) como agente direcionador para o tratamento do câncer de mama.

Figura 60 - Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-03 livre e encapsulado em nanopartículas com dextrana.



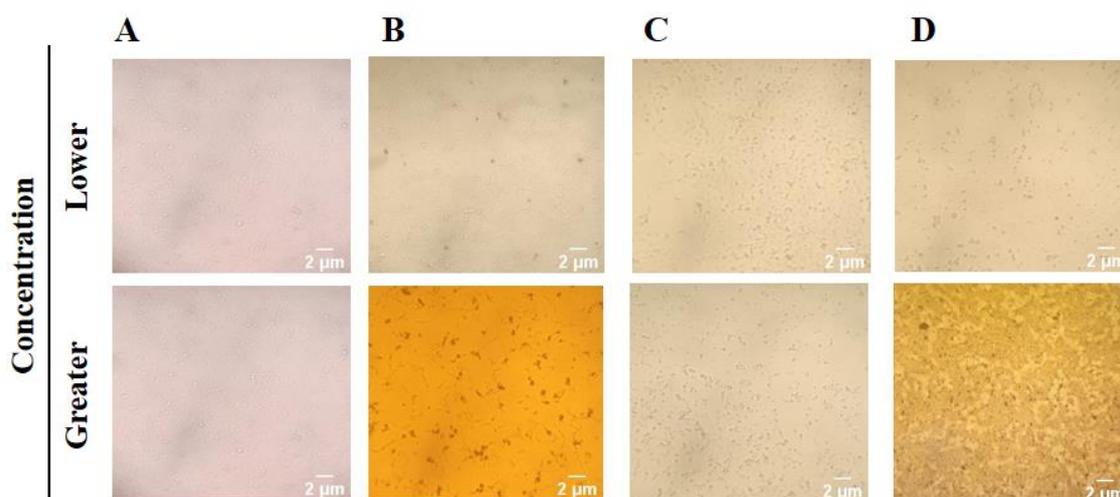
Controle negativo MDA-MB-231 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-03 (coluna B), NP-Dex-ETCA (coluna C), CS-03- NP-Dex-ETCA (coluna D) em concentração inferior (linha 1) e superior (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

Por outro lado, NP-Fuc-ETCA (Figura 61C) parece causar danos ao MDA-MB-231 com alteração na estrutura e aspecto celular mais escuro, o que pode ser indicador de estresse celular (Mullen et al., 2014; Scientific, 2015; Segeritz, Vallier, 2017). A atividade apresentada pelo NP-Fuc-ETCA está relacionada à presença da fucana, que é uma molécula ativa contra células cancerígenas (Lin et al., 2020; Cavalcanti et al., 2021; Jin et al., 2022). De acordo com Chen et al. (2014), a fucana modula as cascatas de estresse do retículo endoplasmático e, assim, induz a apoptose nas células cancerígenas.

Quando comparado com CS-03-NP-Fuc-ETCA (Figura 61D), observamos que em baixas concentrações há redução na população de células MDA-MB-231 e que na maior concentração não há células viáveis, mostrando que o encapsulamento do CS-

03 em nanopartículas de NP-Fuc-ETCA favorece a atividade antiproliferativa do composto, provavelmente devido à sua liberação intracelular, associada também a um possível efeito sinérgico entre fucana e CS-03. Estes resultados mostram que as nanopartículas CS-03-NP-Fuc-ETCA podem ser um sistema promissor para o tratamento do câncer de mama metastático.

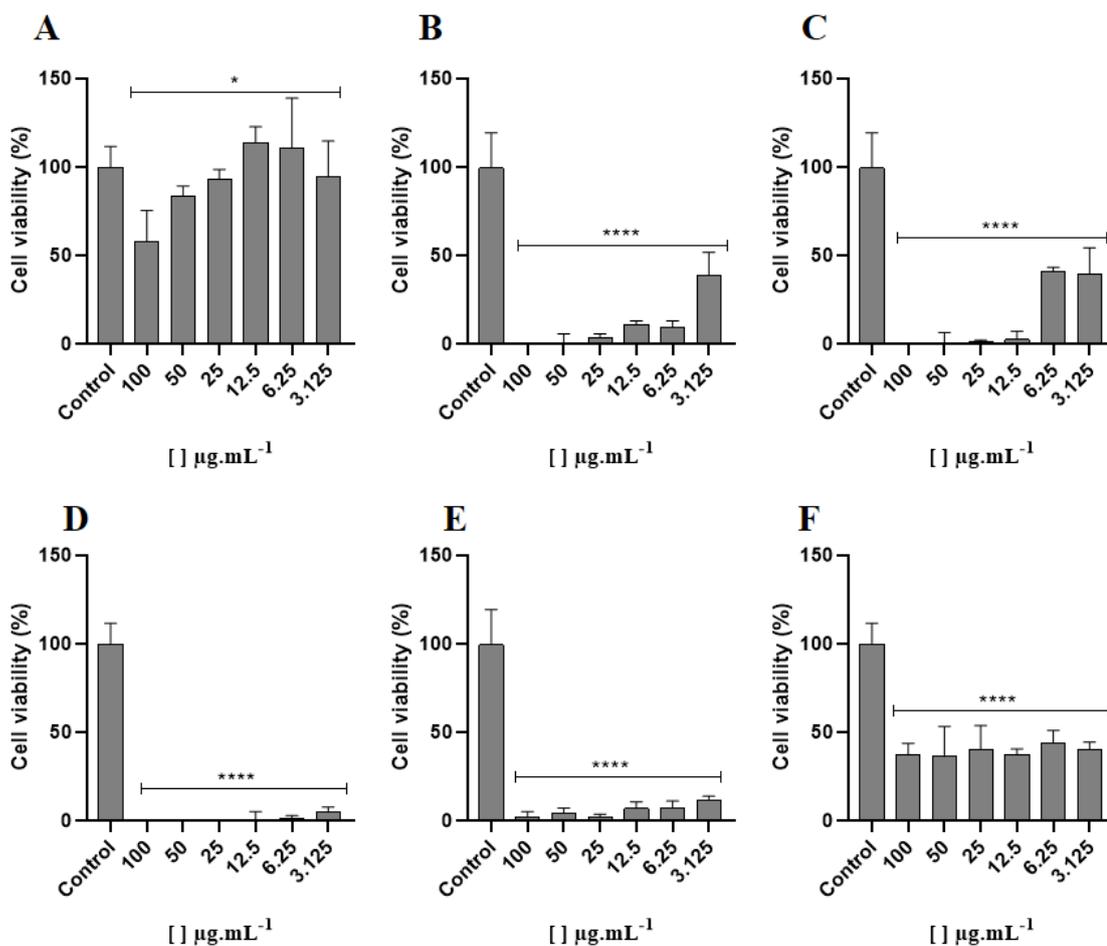
Figura 61 - Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-03 livre e encapsulado em nanopartículas com fucana.



Controle negativo MDA-MB-231 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-03 (coluna B), NP-Fuc-ETCA (coluna C), CS-03- NP-Fuc-ETCA (coluna D) em concentração inferior (linha 1) e superior (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

Para o CS-08 (Figura 62A) observamos que não foi tão ativo contra células MDA-MB-231, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> de 49,79 µg.mL<sup>-1</sup>. Quando comparamos os resultados com o da doxorrubicina (Figura 62F) que foi utilizada como controle positivo, obtivemos um valor de IC<sub>50</sub> em torno de 22,34 µg.mL<sup>-1</sup>. Apesar de não apresentar atividade contra essas células cancerosas, quando encapsulado em nanopartículas, o CS-08 apresenta sua atividade com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 3,125 µg.mL<sup>-1</sup> para CS-08-NP-Dex-ETCA (Figura 62B) e IC<sub>50</sub> em torno de 8,13 µg. .mL<sup>-1</sup> para CS-08-NP-Fuc-ETCA (Figura 62C), apresentando resultados superiores aos da doxorrubicina, provavelmente pelo fato das nanopartículas facilitarem a internalização do CS-08.

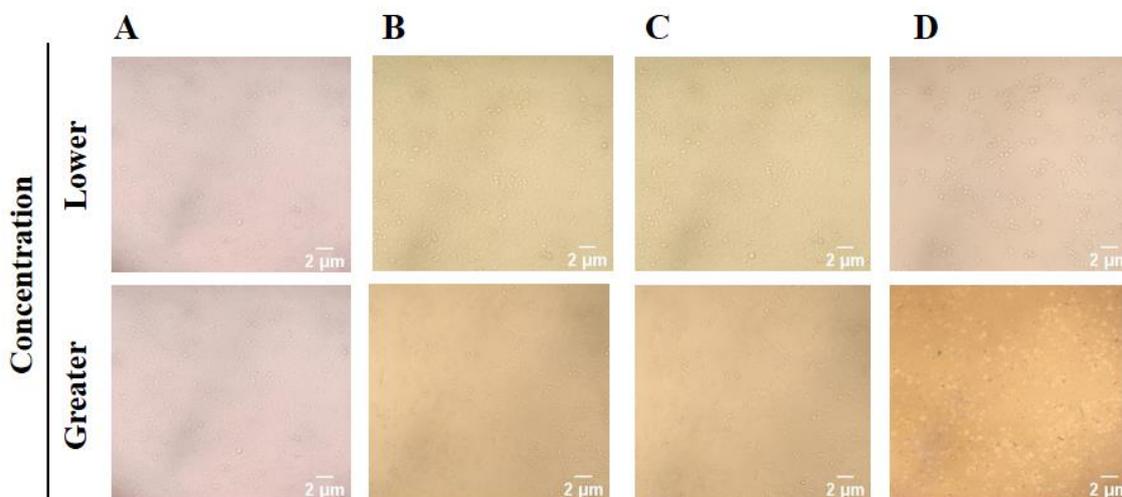
Figura 62 - Atividade antiproliferativa de CS-08 livre e encapsulado



CS-08 livre (A), CS08-NP-Dex-ETCA (B), CS08-NP-Fuc-ETCA (C), NP-Dex-ETCA (D), NP-Fuc-ETCA (E) e doxorubicina (F) contra a cepa MDA-MB-231. Fonte: O autor, 2023.

De acordo com os dados apresentados na Figura 62, as nanopartículas brancas (NP-Dex-ETCA e NP-Fuc-ETCA) pareceram apresentar melhores resultados que as demais nanopartículas. Portanto, quando avaliamos as características microscópicas das células, após visualização em microscópio óptico (Figuras 63 e 64), observamos que as características celulares do MDA-MB-231 foram preservadas quando expostas ao NP-Dex-ETCA em ambas concentrações (Figura 63C). Quando avaliamos a maior concentração de CS-08-NP-Dex-ETCA (Figura 63D) notamos que houve morte celular, mostrando que as nanopartículas de dextrana potencializaram a atividade de CS-08 provavelmente devido à internalização celular.

Figura 63 - Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-08 livre e encapsulado em nanopartículas com dextrana.

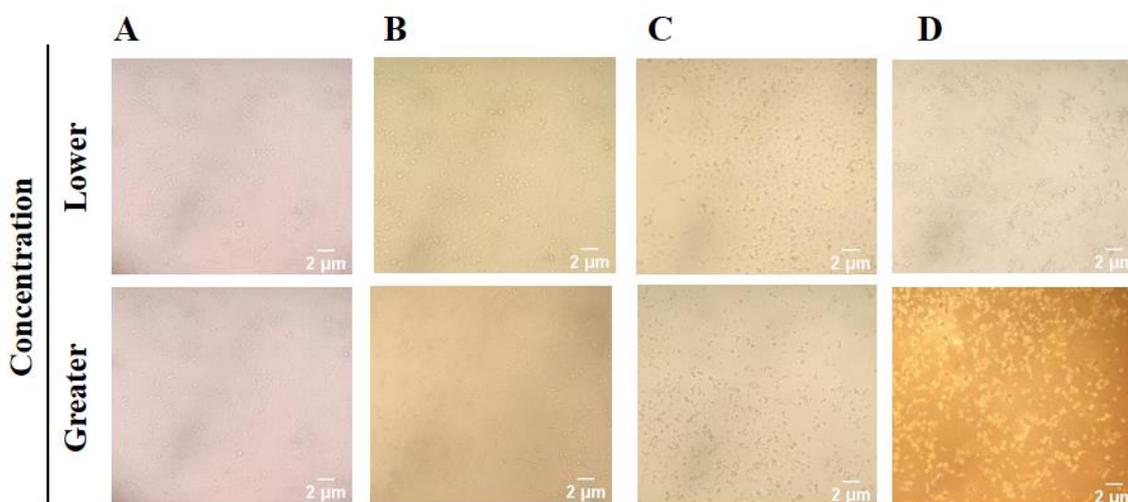


Controle negativo MDA-MB-231 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-08 (coluna B), NP-Dex-ETCA (coluna C), CS-08- NP-Dex-ETCA (coluna D) em concentração inferior (linha 1) e superior (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

Quanto ao NP-Fuc-ETCA (Figura 64C), eles parecem ser tóxicos contra células MDA-MB-231, mostrando que as células são mais escuras e em concentrações mais altas podemos observar que elas perdem seu formato mais alongado. Estas alterações na estrutura celular indicam estresse celular e são provavelmente causadas pela fucana. Em vários estudos, a fucana demonstrou a sua atividade contra células de câncer da mama (Zhang et al., 2013a; Zhang et al., 2013b; Wu et al., 2016). De acordo com Zhang et al. (2013b) a fucana atua induzindo a apoptose em células MDA-MB-231 através de vias mitocondriais dependentes de cálcio e caspases.

Quanto ao CS-08-NP-Fuc-ETCA (Figura 64D), podemos observar que as nanopartículas revestidas com fucana também potencializaram o efeito do CS-08, provavelmente devido à liberação intracelular da molécula e a fucana pode estar agindo sinergicamente, potencializando o efeito do CS-08. Esses resultados são consistentes com o estudo de Cavalcanti et al. (2021) que também desenvolveram nanopartículas revestidas com fucana contendo o composto natural onocalixona A e viram que o encapsulamento do composto parece ter potencializado o efeito da molécula livre e da nanopartícula branca, provavelmente com um sinergismo entre a fucana e o composto encapsulado.

Figura 64 - Aspectos morfológicos das células MDA-MB-231 após tratamento com CS-08 livre e encapsulado em nanopartículas com fucana.



Controle negativo MDA-MB-231 (coluna A), em microscópio óptico com objetiva de 10x, após tratamento com CS-08 (coluna B), NP-Fuc-ETCA (coluna C) e CS-08 -NP-Fuc-ETCA (coluna D) em concentração inferior (linha 1) e superior (linha 2). Fonte: O autor, 2023.

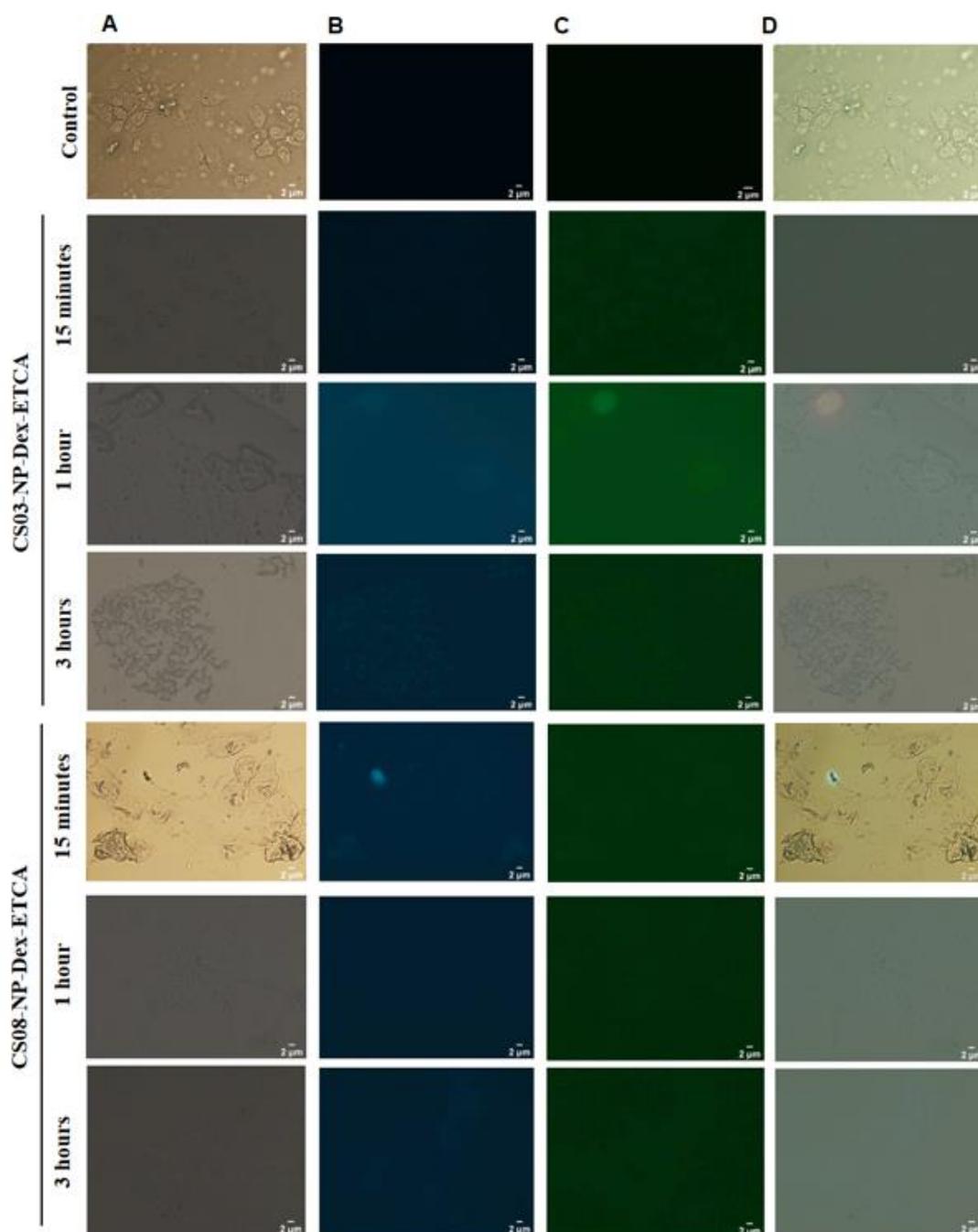
### 6.3.9 Captura celular dos compostos encapsulados nas nanopartículas poliméricas em células MDA-MB-231

O estudo de captação celular utilizando células MDA-MB-231 seguiu caminho semelhante aos estudos na linhagem de macrófagos, mas não foi possível identificar a captação celular nos tempos determinados em nenhum dos experimentos com as nanopartículas (Figuras 65 e 66). Acreditamos que a ausência de fluorescência pode estar relacionada à baixa concentração de CS-03 ou CS-08, pois como as nanopartículas eram muito tóxicas para as células MDA-MB-231, foi necessário utilizar uma concentração menor de compostos, o que pode ter impactado os resultados de fluorescência. Segundo estudos de Choi e Sawada (2023) e Itagaki (2000), a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração.

Estes resultados são contraditórios aos apresentados no estudo de atividade antiproliferativa, no qual vimos que as nanopartículas potencializam a atividade de CS-03 e CS-08, provavelmente devido à sua internalização. Esses resultados também não corroboram com outros estudos, segundo Alharbi et al. (2021) a dextrana é absorvida pelas células MDA-MB-231 através de micropinocitose e vias de endocitose dependentes de clatrina. Acreditamos que a captação celular ocorre devido a estudos que indicam a internalização de partículas contendo dextrana na superfície, como é o

caso de estudos como o de Curcio et al. (2021) e Siddharth et al. (2017) que desenvolveram nanopartículas contendo revestimento de dextrana e observaram a absorção celular.

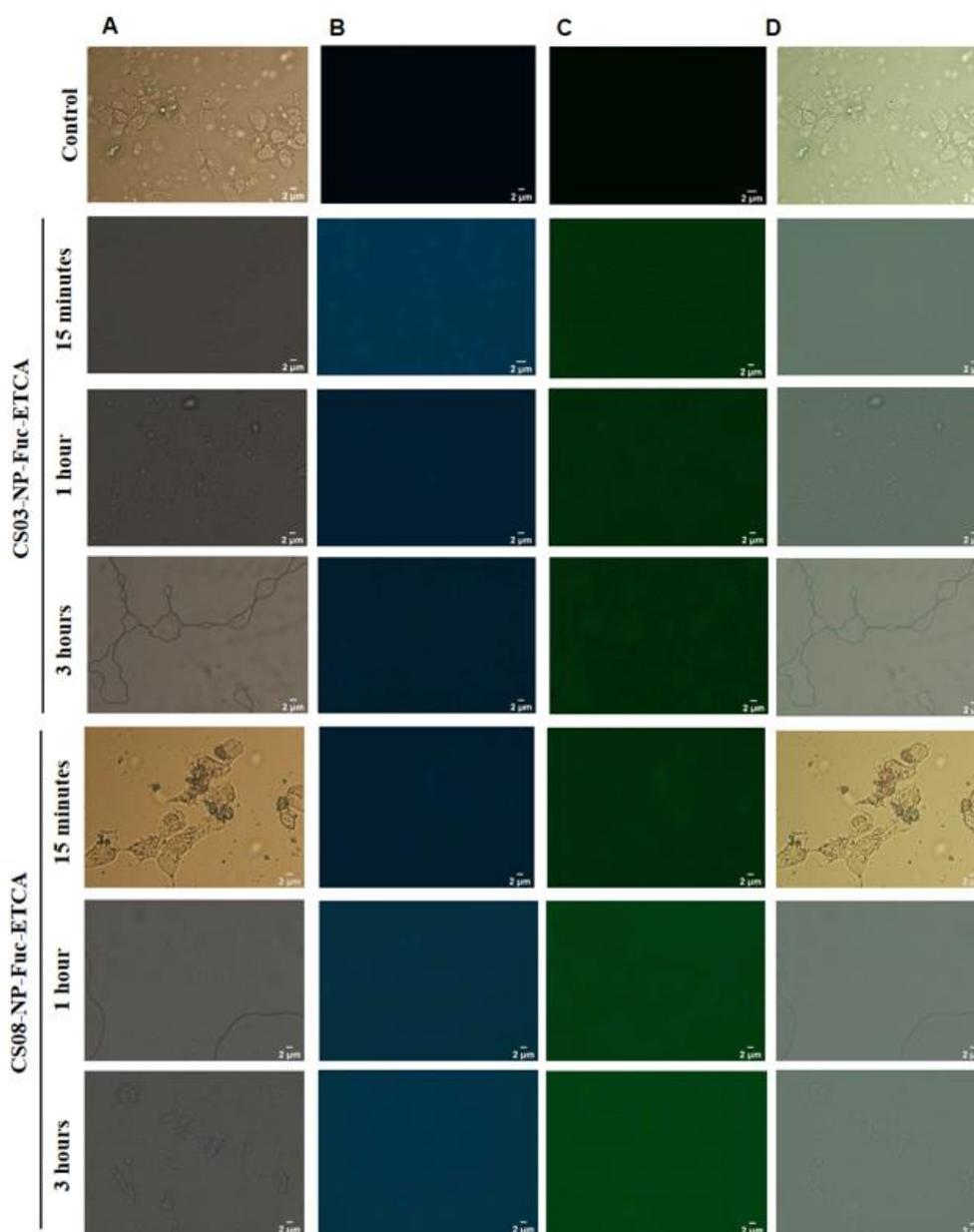
Figura 65 – Células MDA-MB-231 antes e depois da incubação em tempos diferentes com sistema CS-03-NP-Dex-ETCA e CS-08-NP-Dex-ETCA.



Coluna A: Filtro branco; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: filtro de fluor Alexa; Coluna D: sobreposição das imagens A, B e C. Linha 1: células controle em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-03-NP-Dex-ETCA, respectivamente e linha 5, 6 e 7: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-08-NP-Dex-ETCA, respectivamente. Barra de escala: 2 µm. Fonte: O autor, 2023.

Perfil semelhante foi apresentado pelas nanopartículas de fucana (Figura 66), mas sabe-se que já em outros estudos, como Cavalcanti et al. (2022) é possível observar que as nanopartículas IBCA revestidas com fucana são capturadas por células MDA-MD-231. Lu et al. (2017) e Chung et al. (2020) acreditam que a fucana é internalizado em células MDA-MB-231 devido à presença de receptores de p-selectina.

Figura 66 – Células MDA-MB-231 antes e depois da incubação em tempos diferentes com sistema CS-03-NP-Fuc-ETCA e CS-08-NP-Fuc-ETCA



Coluna A: Filtro branco; Coluna B: filtro DAPI; Coluna C: filtro de fluor Alexa; Coluna D: sobreposição das imagens A, B e C. Linha 1: células controle em meio de cultura; linha 2, 3 e 4: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-03-NP-Fuc-ETCA, respectivamente e linha 5, 6 e 7: após 15 min, 1 e 3 h de incubação com CS-08-NP-Fuc-ETCA, respectivamente. Barra de escala: 2 µm. Fonte: O autor, 2023.

## 7. CONCLUSÃO

Foram sintetizados e caracterizados 8 novos compostos indol-tiazólicos inéditos, com diferentes substituições na posição *p*-fenil. Nos estudos *in silico* foi possível verificar que as moléculas possuem características satisfatórias como candidatos à fármaco, contudo alguns compostos apresentam limitações específicas intrinsecamente correlacionadas às respectivas estruturas químicas.

Após os testes de interação com o DNA, verificamos que os compostos intercalam com essa biomolécula, entretanto o mecanismo pelo qual ocorre ainda não foi totalmente esclarecido, necessitando da realização de testes mais conclusivos, além disso os novos derivados indol-tiazólicos interagem moderadamente com a BSA, fator importante para o desenvolvimento do ciclo farmacocinético da substância no organismo, tal característica havia sido apontada nos testes *in silico* e foi confirmada nos testes *in vitro*.

A verificação da atividade antioxidante *in vitro* identificou que dois dos compostos (CS-03 e CS-04) apresentam atividade igual ou até superior aos controles utilizados, destacando que o método ABTS forneceu dados mais conclusivos levando-se em consideração as características dos compostos.

A avaliação de toxicidade e atividade antiproliferativa realizada *in vitro* demonstrou excelentes resultados para a série sintetizada como um todo, o que sugere que a junção dos dois núcleos heterocíclicos favorece um melhor desempenho para atividade antiproliferativa, correlacionando os dados foi possível obter índices de seletividade promissores para as linhagens tumorais testadas, com destaque para o CS-03 que apresentou índices de seletividade (IS) superiores a 65 em todas as linhagens celulares, chegando a um IS de 113,7 para MCF-7.

Além disso o método de validação permitiu o estudo analítico detalhado dos compostos, possibilitando a obtenção de dados exatos e precisos na avaliação da implementação da nanotecnologia com objetivo de otimizar as características já observadas nas moléculas da série CS.

Quanto à implementação da nanotecnologia ao estudo, foi possível desenvolver os dois tipos de nanopartículas com tamanhos adequados e com dispersão homogênea o que permitiu a utilização dessas nanopartículas nos experimentos *in vitro*, permitindo comparar o efeito da molécula isolada com a molécula encapsulada, onde foi verificado que o método de MTT apresentou limitações de interpretação dos resultados, no entanto ao analisarmos as células de

macrófagos em microscópio verificamos que não houveram alterações celulares significativas, somando com os resultados de captação celular foi possível verificar que encapsulamento aumentou a internalização nessa linhagem celular.

Analisando a atividade citotóxica na linhagem MDA-MB-23, verificamos que a estratégia de utilização das nanopartículas aumentaram a atividade quando comparadas ao CS-03 e CS-08 livres, possivelmente devido a internalização das nanopartículas nessas células, porém ao tentarmos foram encontradas limitações de visualização da internalização utilizando a técnica de microscopia de fluorescência, provavelmente pela baixa concentração utilizada no ensaio.

De modo geral os resultados mostram que os *scaffolds* indol e tiazol são promissores quando condensados em uma única molécula, destacando-se na série sintetizada o composto CS-03 (*p*-NO<sub>2</sub>) e o CS-08 (*p*-OCH<sub>3</sub>) que foram encapsulados nas nanopartículas propostas, o que pode contribuir para otimização de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, otimizando a atividade antiproliferativa investigada, permitindo a continuidade de ensaios em pesquisas futuras para o desenvolvimento de novos medicamentos para terapia oncológica.

## REFERÊNCIAS

- ABDURRAHMANOGLU, S.; FIRAT Y. Synthesis and characterization of new dextran-acrylamide gels. **Journal of Applied Polymer**, v.106, n.6, p.3565-3570, 2007.
- AJANI, O.O. et al. Functionalized benzimidazole scaffolds: privileged heterocycle for drug design in therapeutic medicine. **Archiv der Pharmazie**, v.349, p.1-32, 2016.
- AKHTAR, J. et al. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 125, p. 143-189, 2017.
- ALBINO, S. L. et al. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation. **Pharmaceuticals**, v.16, p. 1-28, 2023.
- ALFI, A. A. et al. Molecular modeling and docking studies of new antioxidant pyrazole-thiazole hybrids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1267, 133582, 2022.
- ALHARBI, B. F. et al. Roles of Endocytic Processes and Early Endosomes on Focal Adhesion Dynamics in MDA-MB-231 Cells. **Rep Biochem Mol Biol.**, v.10, n.2, p.145-155, 2021.
- ALHARETH, K. et al. Doxorubicin loading and in vitro release from poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles produced by redox radical emulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.119, p.816-822, 2010.
- AL-JAMEEL, S.S.; YOUSSEF, T.E. Investigations on the antitumor activity of classical trifluoro-substituted zinc phthalocyanines derivatives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p.34-52, 2018.
- ALMAKI, S. A. et al. Synthesis and characterization of new thiazole-based Co(II) and Cu(II) complexes; therapeutic function of thiazole towards COVID-19 in comparing to current antivirals in treatment protocol. **Journal of Molecular Structure**, v. 1244, 130961, 2021.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, 2015.
- 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-JÚNIOR, A. S. A. et al. In vitro activity, ultrastructural studies and in silico pharmacokinetic properties of indol-3-yl-thiosemicarbazones derivatives and

analogues against juvenile and adult worms of *S. mansoni*. *European Journal of Pharmaceuticals Sciences*, v.138, p.104985, 2019.

ALTINTOP, M. D.; SEVER, B.; ÇİFTÇİ, G. A.; ÖZDEMİR, A. Design, Synthesis, and Evaluation of a New Series of Thiazole-Based Anticancer Agents as Potent Akt Inhibitors. *Molecules*, v.23, p.2-17, 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.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

ARAF, R.K. et al. Synthesis and in vitro antiproliferative effect of novel quinolone-based potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.63, p.826-832, 2013.

ARJMAND, F.; JAMSHEERA, A. DNA binding studies of new valine derived chiral complexes of tin(IV) and zirconium(IV). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.78, n.1, p.45-51, 2011.

ARMBRUSTER, D. A., PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantification. *The Clinical Biochemist Reviews*, v.29, n.1, p.49-52, 2008.

ARSHAD, N. et al. Spectroscopic, molecular docking and structural activity studies of (E)-N'-(substituted benzylidene/methylene) isonicotinohydrazide derivatives for DNA binding and their biological screening. *Journal of Molecular Structure*, v. 1139, p. 371-380, 2017.

ASADI, Z. et al. A novel Cu(II) distorted cubane complex containing Cu<sub>4</sub>O<sub>4</sub> core as the first tetranuclear catalyst for temperature dependent oxidation of 3,5-di-tert-butyl catechol and in interaction with DNA & protein (BSA). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.277, 2020.

ATASHRAZM, F. et al. Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine Drugs*, v.13, n.4, p.2327-2346, 2015.

AYATI, A. et al. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug Discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.97, p. 699-718, 2015.

BALTAZAR, C. J. et al. Spectroscopic studies on the interaction of mimosine with BSA and DNA. *Journal of Molecular Structure*, v. 1161, p. 273-278, 2018.

BALUPURI, A. et al. Design, synthesis, docking and biological evaluation of 4-phenyl-thiazole derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 27, n. 17, p. 4156-4164, 2017.

BARLUENGA, J.; VALD'ES, C. Five-membered heterocycles: indole and related systems. *Modern Heterocyclic Chemistry*, p.377-531, 2011.

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.

BELATIK, A. et al. Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. **Eur. J. Med. Chem.** v. 48, p.114-123, 2012.

BIGAJ-JÓZEFOWSKA, M. J.; GRZESKOWIAK, B. F. Polymeric nanoparticles wrapped in biological membranes for targeted anticancer treatment. **European Polymer Journal**, v.176, 111427, 2022.

BINGUL, M. et al. Synthesis, photophysical and antioxidant properties of carbazole-based bis-thiosemicarbazones. **Res. Chem. Intermed.**, v.45, n.9, p. 4487-4499. 2019.

BIRMANN, P. T et al. 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 126-133, 2019.

BJÖRNSSON, E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 118, n. 5, p. 281-290, 2008.

BOECHAT, N., PINTO, A. C.; BASTOS, M. M. Métodos seletivos de fluoração de moléculas orgânicas. **Quim. Nova**, v. 38, n. 10, p.1323-1338, 2015.

BONDOCK, S.; FOU DA, A. M. Synthesis and evaluation of some new 5-(hetaryl) thiazoles as potential antimicrobial agents. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 5, p. 561-573, 2018.

BRAGA, S. F. P. et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52, p.299-307, 2016.

BRANDAL, G.; YAO, Y. L.; NAVEED, S. Biocompatibility and corrosion response of laser joined NiTi to stainless steel wires. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v.137, n.3, 2015.

BROGDON, C. F.; LEE, F. Y.; CANETTA, R. M. Development of other microtubule-stabilizer families: the epothilones and their derivatives. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n.5, p. 599-609, 2014.

BUDDANAVAR, A. T.; NANDIBEWOOR, S. T. Multi-spectroscopic characterization of bovine serum albumin upon interaction with atomoxetine. **J. Pharm. Anal.** v.7, n.3, p.148-155, 2017.

BURSAVICH, M. G. et al. 2-Anilino-4-aryl-1, 3-thiazole inhibitors of valosin-containing protein (VCP or p97). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 5, p. 1677-1679, 2010.

BUSZEWSKI, B., NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.402, n.1, p.231-247, 2012.

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.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J. et al. Antifungal agentes: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v.19, n.2, p. 130-139, 2006.

CARDOSO, M. V. O.; SIQUEIRA, L. R. P.; SILVA, E. B. et al. 2-pyridil thiazoles as novel anti-trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.86, p.48-59, 2014.

CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v.45, p.153-203, 1994.

CAVALCANTI, I.D.L.; et al. Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.65, n.102698, 2021.

CAVALCANTI, I. D. L. et al. Does oncocalyxone A (oncoA) have intrinsic fluorescence? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.39, 102869, 2022.

CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantification of lumefantrine using youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2, p.235-240, 2009.

CHATURVEDI, S.K. et al. Elucidating the interaction of limonene with bovine serum albumin: a multi-technique approach. **Molecular BioSystems**, v.11, n.1, p.307-316, 2015.

CHEN, S. et al. Fucoidan induces cancer cell apoptosis by modulating the endoplasmic reticulum stress cascades. **PLOS ONE**, v.9, n.9, e108157, 2014.

CHEN, Y. Nanotechnology for next-generation cancer immunotherapy: State of the art and future perspectives, **Journal of Controlled Release**, v. 356, p.14-25, 2023,

CHHABRIA, M.T. et al. Thiazole: A Review on Chemistry, Synthesis and Therapeutic Importance of its Derivatives. **Current topics in Medicinal Chemistry**, v.16, p.2841-2862, 2016.

CHOI, Y. J., SAWADA, K. Physical sensors: fluorescence sensors. **Encyclopedia of Sensors and Biosensors**, v.1, p.1-19, 2023.

CHOPRA, S.; DAVIES, E. L. Breast Cancer. Medicine. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.009>. Acesso em: 09 Jan 2020.

CHUNG, C. H. et al. Fucoidan-based, tumor-activated nanoplatform for overcoming hypoxia and enhancing photodynamic therapy and antitumor immunity. **Biomaterials**, v.257, 120227, 2020.

CRUCHO, C.I.C.; BARROS, M.T. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering**, v.80, p.771-784, 2017.

CUI, X.Y. et al. Advances in in vitro methods to evaluate oral bioaccessibility of PAHs and PBDEs in environmental matrices. **Chemosphere**, v.150, p.378-389, 2016.

CURCIO, M. et al. Combining dextran conjugates with stimuli-responsive and folate-targeting activity: a new class of multifunctional nanoparticles for cancer therapy. **Nanomaterials**, v.11,1108, 2021.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DANAEI, M. et al. Impacto f particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v.10, n.2, p.57, 2018.

DAS, D.; SIKDAR, P.; BAIRAGI, M. Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.109, p. 89-98, 2016.

DATUSALIA, A.K.; KHATIK, G.L. Thiazole heterocycle: a privileged scaffold for drug design and discovery. **Current Drug Discovery Technologies**, v.13, n.3, 2018.

DEMARCHI, C. A. et al. Synthesis of Ag@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite based on O-carboxymethylchitosan with antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p.42-51, 2018.

DESAI, N.C.; MAKWANA, A. H.; RAJPARA, K.M. Synthesis ans study of 1,3,5-triazine based thiazole derivatives as antimicrobial agents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p.334-341, 2016.

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, n. 7, p. 3006-3027, 2022.

DOMÍNGUEZ-VILLA, F. X. et al.. Synthesis, molecular docking, and in silico ADME/Tox profiling studies of new 1-aryl-5-(3-azidopropyl) indol-4-ones: Potential inhibitors of SARS CoV-2 main protease. **Bioorganic chemistry**, v. 106, p. 104497, 2021.

EJAZ, S.A. et al. Distinctive inhibition of alkaline phosphatase isozymes by thiazol-2-ylidene-benzamide derivatives: functional insights into their anticancer role. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.119, n.8, p.6501-6513, 2018.

ELDEHNA, W.M. et al. Tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX and XII inhibitory properties of certain isatin-bearing sulfonamides endowed with in vitro antitumor activity towards colon cancer. **Bioorganic Chemistry**, v.81, p.425-432, 2018.

ELKAMHAWY, A. et al. EGFR inhibitors from cancer to inflammation: discovery of 4-fluoro-N-(4-(3-(trifluoromethyl)phenoxy)pyrimidin-5-yl)benzamide as a novel anti-inflammatory EGFR inhibitor. **Bioorganic Chemistry**, v.86, p.112-118, 2019.

EL-SAY, K.M.; EL-SAWY, H.S. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.528, n.1-2, p.675-691, 2017.

ERMAKOVA, E.A.; DANILOVA, A.G.; KHAIRUTDINOV, B. I. Interaction of ceftriaxone and rutin with human sérum albumin. WaterLOGSY-NMR and molecular docking study. **Journal of Molecular Structure**, v.1203, 2020.

FAULHABER, K. et al. Studies of the fluorescence light-up effect of amino-substituted benzo [b] quinolizinium derivatives in the presence of biomacromolecules. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, p. 1535-1545, 2011.

FERNANDES, Q. et al. Shrinking the battlefield in cancer therapy: Nanotechnology against cancer stem cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 191,106586, 2023,

FERREIRA, R. J. et al. Nitrogen-containing naringenin derivatives for reversing multidrug resistance in câncer. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 28, p. 115798, 2020.

FERREIRA, S. L. C. et al. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*, v.131, p.163-169, 2017.

FESSART, D.; ROBERT, JACQUES. Mécanismes de résistance aux traitements des cancers. **Bulletin du Cancer**, 2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: guidance for industry, 2015. Available on: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>. Accessed on: 26 Aug 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Methods, Method Verification and Validation, 2020. Available on: <https://www.fda.gov/media/73920/download>. Accessed on: 28 Aug 2022.

GABA, M.; SINGH, S.; MOHAN, C. Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 76, p. 494-505, 2014.

GALDINO-PITTA, M.R. et al. Synthesis of Thiazacridine Derivatives as Anticancer Agents against Breast and Hematopoietic Neoplastic cells. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.36, p.59-67, 2017.

GALLANT, J.E. et al. Cobistat versus Ritonavir as a Pharmacoenhancer of Atazanavir plus Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate in Treatment-Naive HIV Type 1-Infected Patients: Week 48 Results. **The Journal of Infectious Diseases**, v.208, n.1, p. 32-39, 2013.

GARRIDO, A. et al. hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.195, 112290, 2020.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.23, 12827, 2021.

GOMHA, S. M. et al. A facile access and evaluation of some novel thiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives incorporating thiazole moiety as potent anticancer agents. **Chemistry Central Journal**, v.11, p. 1-8, 2017.

GORABI, A. M. et al. Immune checkpoint blockade in melanoma: Advantages, shortcomings and emerging roles of the nanoparticles. **International Immunopharmacology**, v. 113, 109300, 2022.

GHOSH, K.; RATHI, S; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v.175, p.135-140, 2016.

GOUVEIA, A.L.A et al. Thiazolidine derivatives: In vitro toxicity assessment against promastigote and amastigote forms of *Leishmania infantum* and ultrastructural study. **Experimental Parasitology**, v.236-237, p. 108253, 2022.

GOUVEIA, R.G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.339, p.1-32, 2018.

GOVINDARAO, K. et al. Quinoline conjugated 2-azetidinone derivatives as prospective anti-breast cancer agents: In vitro antiproliferative and anti-EGFR activities, molecular docking and in-silico drug likeness studies. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 3, 101471, 2022.

GRIFFIN, S. Natural Nanoparticles: A Particular Matter Inspired by Nature. **Antioxidants**, v.7, n.1, 2018.

GUERRERO-PEPINOSA, N. Y. et al. Antiproliferative activity of thiazole and oxazole derivatives: A systematic review of in vitro and in vivo studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, 111495, 2021.

GUGGILAPU, S.D. et al. Synthesis of thiazole linked indolyl-3-glyoxylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.138, p. 83-95, 2017.

GUHATHAKURTA, B. et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of human serum albumin with copper(II) complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.173, p.740-748, 2017.

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v.164, p. 678-688, 2019.

GUO, K.; XIAO, N.; LIU, Y.; WANG, Z.; TÓTH, J.; GYENIS, J. et al. Engineering polymer nanoparticles using cell membrane coating technology and their application in cancer treatments: Opportunities and challenges. **Nano Materials Science**, v.4, n. 4, p.295-321, 2022.

GUO, Z. et al. Design, synthesis and evaluation of novel (S)-tryptamine derivatives containing an allyl group and an aryl sulfonamide unit as anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.29, p.1133-1137, 2019.

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

HALIMEHJANI, A. Z. et al. Dithiocarbamates as as efficient intermediate for the synthesis of 2-(alkylsulfanyl)thiazoles in water. **Tetrahedron Letters**, v.57, p.883-886, 2016.

HAMDY, R. et al. Synthesis and evaluation of 5-(1H-indol-3-yl)-N-aryl-1,3,4-oxadiazol-2-amines as Bcl-2 inhibitory anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p.1037-1040, 2017.

HAN, Y. S. et al. Fucoïdan suppresses mitochondrial dysfunction and cell death against 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced neuronal cytotoxicity via regulation of PGC-1 $\alpha$  expression. **Marine Drugs**, v.17, n.9, 518, 2019.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: **New Dimensions. Cancer Discov.**, v.12, n.1, p.31-46, 2022.

HE, R. et al. Recent advances of nanotechnology application in autoimmune diseases– A bibliometric analysis. **Nano Today**, v. 48, p. 101694, 2023.

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

HUANG, L. et al. Pentacyclic triterpene derivatives possessing polyhydroxyl ring A inhibit Gram-positive bacteria growth by regulating metabolism and virulence genes expression. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 95, p. 64-75, 2015.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível : <https://www.iarc.who.int/>. Acesso em: 16 Jun. 2022.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA--general principles and recent developments. **Supramolecular dye chemistry**, p. 161-204, 2005.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <https://antigo.inca.gov.br/>. Acesso em: 16 Jun. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Q2 (R1): validation of analytical procedures: text and methodology, November 2005. Available on: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf). Acesso em: 26 Aug 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. European Medicines Agency, July 2022. Available on: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf). Acesso em: 27 Aug 2022.

IRAJI, A. et al. Design, synthesis, spectroscopic characterization, in vitro tyrosinase inhibition, antioxidant evaluation, in silico and kinetic studies of substituted indole-carbohydrazides. **Bioorganic Chemistry**, v. 129, 106140, 2022.

ITAGAKI H. Chapter 3 – Fluorescence spectroscopy. **Experimental Methods in Polymer Science**, 155-260, 2000.

JACOB, I. T. et al. Interaction study with DNA/HSA, anti-topoisomerase II $\alpha$ , cytotoxicity and in vitro antiproliferative evaluations and molecular docking of indole-thiosemicarbazone compounds. **International Journal of biological macromolecules**, v.234, p.123606, 2023.

JACOB, R. G. et al. Sequential one-pot synthesis and antioxidant evaluation of 5-amino-4-(arylselanyl)-1H-pyrazoles. **Tetrahedron Letters**, v.103, p.153992, 2022.

JADHAV, P. M. et al. A review on biological and medicinal significance of thiazoles. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 196, n. 10, 879-895, 2021.

JAFARI, F. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzo-ad tetrahydrobenzeno-[h]quinolone derivatives as potential DNA-intercalating antitumor agents. **European Journal of Medicinal chemistry**, v. 164, p. 292-303, 2019.

JANGID, A. K.; POOJA, D.; KULHARI, H. Determination of solubility, stability and degradation kinetics of morin hydrate in physiological solutions. **RSC Advances**, v.8, p.28836-28842, 2018.

JIANG, X. et al. Spectrometric and voltammetric investigation of interaction of neutral red with calf thymus DNA: pH effect. **Biophysical Chemistry**, v.118, n.1, p.42-50, 2005.

JIANG, C.; SHEN, C.; NI, M.; HUANG, L.; HU, H.; DAI, Q. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer. **Genes & Diseases**, 2023.

JIN, J. O. et al. Seaweeds in the oncology arena: anti-cancer potential of fucoidan as a drug-A review. **Molecules**, v.27, 6032, 2022.

JURJ, A. et al. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. **Drug design, development and therapy**, p. 2871-2890, 2017.

KABIR, E; UZZAMAN, M. A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds, **Results in Chemistry**, v. 4, 100606, 2022.

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

KARYPIDOU, K. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of a novel series of fused 1,2,3-triazoles as potential anti-coronavirus agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, 28, p. 3472-3476, 2018.

KASHYAP, S.J. et al. Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v.21, n.8, p. 2123-2132, 2012.

KAUSHIK, N.K. et al. Biomedical Importance of Indoles. **Molecules**, v.18, n.6, p.6620-6662, 2013.

KANTARIJAN H. et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.24, p.2260-2270, 2010.

KHAN, S. et al. A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. **Journal of Molecular Liquids**, v. 348, 118008, 2022.

KOCH-WESER, J.; SELLERS, E.M. Binding of drugs to serum albumin (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v.294, n.6, p.311-316, 1976.

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, p. 133168, 2022.

KUMAR, H. M. S.; HERRMANN, L.; TSOGOEVA, S. B. Structural hybridization as a facile approach to new drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.30, n.23, 127514, 2020.

KUMAR, M.; MASRAM, D.T. Evaluation of DNA, BSA, and HSA binding propensity of copper (II) complex with N-donor ligand 2,2'-dipyridylamine. **Polyhedron**, v.157, p.511-520, 2019.

KUMAR, M. et al. Structure, DNA/proteins binding, docking and cytotoxicity studies of copper(II) complexes with the first quinolone drug nalidixic acid and 2,2'-dipyridylamine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.212, p.94-104, 2019.

KUMAR, S.; SHARMA, R.; ROYCHOWDHURY, A. Modulation of Cytochrome-P450 Inhibition (CYP) in Drug Discovery: A Medicinal Chemistry Perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3605-3621, 2012.

KUMARI, A.; SINGH, R. K. Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic prospectives. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, 2019.

KUTHYALA, S. et al. Crystal, Hirshfeld, ADMET, drug-like and anticâncer study of some newly synthesized imidazopyridine containing pyrazoline derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v.1197, p.65-72, 2019.

ŁACZKOWSKI, K. Z. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high antifungal activity against *Candida* spp. **Journal of Molecular Structure**, v. 1108, p.427-437, 2016.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.136, p.511-522, 2017.

LAMBERTUCCI, Catia et al. New potent and selective A1 adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 199-213, 2018.

LARIK, F. A. et al. Investigation on the effect of alkyl chain linked mono-thioureas as Jack bean urease inhibitors, SAR, pharmacokinetics ADMET parameters and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v.86, p. 473-481, 2019.

LESO, V.; FONTANA, L.; LAVICOLI, I. Biomedical nanotechnology: Occupational views. **Nanotoday**, v.24, p.10-14, 2019.

LI, M. J. et al. Synthesis, characterization, DNA binding, cleavage activity and cytotoxicity of copper(II) complexes. **Dalton Transactions**, v.43, n.7, p.2789-2798, 2014.

LI, S. et al. Design, synthesis and antitumor activity of bisquinoline derivatives connected by 4-oxy-3-fluoroaniline moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.64, p.62-73, 2013.

LIARAS, K.; FESATIDOU, M.; GERONIKAKI, M. Thiazoles and thiazolidinones as COX/LOX inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 685, 2018.

LIN, Y. et al. The anti-cancer effects of fucoidan: a review of both in vivo and in vitro investigations. **Cancer Cell International**, v.20, p.154, 2020.

LINGALA, A. K. et al. Design, synthesis and anticancer evaluation of isoxazole fused thiazole-oxazole derivatives. **Chemical Data Collections**, v. 41, 100907, 2022.

LIPINSKI, Christopher A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug discovery today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIRA, M. C. B. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, n.1, p.162-170, 2011.

LIRA-NOGUEIRA, M. C. B. et al. Defining endocytic pathways of fucoidan-coated PIBCA nanoparticles from the design of their surface architecture. **Pharmaceutical Research**, v. 39, p.1135-1150, 2022.

LIU, C. et al. Differential recognition and quantification of HSA and BSA based on two red-NIR fluorescent probes. **Journal of Luminescence**, v.197, p.193-199, 2018.

LIU, X.Y. et al. Docking and molecular dynamics simulations of peroximose proliferator activated receptors interacting with pan agonist sodeliglitazar. **Protein & Peptide Letters**, v.18, n.10, p. 1027-1027, 2011.

LIU, Z. et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of 2-(thiazol-2-amino)-4-arylamino-pyrimidines as potent anaplastic lymphomakinase (ALK) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.86, p.438-448, 2014.

LU, K. Y. et al. Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v.165, p.410-420, 2017.

LU, L et al. Met1-specific motifs conserved in OTUB subfamily of green plants enable rice OTUB1 to hydrolyse Met1 ubiquitin chains. **Nat. Commun.**, v.13, n.1, p. 4672, 2022.

MA, F.F. et al. Synthesis, photophysical properties, and DNA-binding of novel A- $\pi$ -D- $\pi$ -A' two-photon absorption chromophores. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, v.364, p.705-714, 2018.

MA, J. et al. Discovery of novel indole and indoline derivatives against *Candida albicans* as potent antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 71, 128826, 2022.

MANN, T. et al. Structure-Activity Relationships of Thiazolyl Resorcinols, Potent and Selective Inhibitors of Human Tyrosinase. **Molecular Sciences**, v. 19, p.690, 2018.

MACÍAS-HERNÁNDEZ, C.E et al. Synthesis and characterization of new monothiooxalamides containing pyridine nuclei with promising antiproliferative and antioxidant activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1265, p.133360, 2022.

MAHBOBI, M., TIEMAN, T. K. F-test and one-way ANOVA. Introduction business statistics with interactive spreadsheets-1st Canadian Edition. 2015

MARQUES, K.M.R. et al. 5-Nitro-Thiophene-Thiosemicarbazone Derivatives Present Antitumor Activity Mediated by Apoptosis and DNA Intercalation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.19, n.13, p.1075-1091, 2019.

MATIAS, M. et al. Screening of pharmacokinetic properties of fifty dihydropyrimidin(thi)one derivatives using a combo of in vitro and in silico assays. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 334-346, 2017.

MCGHEE, James D.; VON HIPPEL, Peter H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of molecular biology**, v. 86, n. 2, p. 469-489, 1974.

MEDJEDOVIĆ, M. et al. Dinuclear Ru(II) polypyridyl complexes: mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. **Polyhedron**, v.178, p. 114334, 2019.

MEHNDIRATTA, S.; NEPALI, K.; SATAPATHY, M.K. Hydroxamic acids as potent antioxidants and their methods of evaluation. In: Oxidative Stress: **Diagnostic Methods and Applications in Medical Science**. Springer, Singapore, p. 97-112, 2017.

MELOUN, B.; MORÁVEK, L.; KOSTKA, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. **FEBS Letters**, v.58, n.1, p.134-137, 1975.

MENEZES, T.M. et al. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.122, p.289-297, 2019.

MERMER, A. et al. Piperazine-azole-fluoroquinolone hybrids: conventional and microwave irradiated synthesis, biological activity screening and molecular docking studies. **Bioorg. Chem.**, v. 85, p. 308-318, 2019.

MERMER, A.; KELES, T.; SIRIN, Y. Recent studies of nitrogen containing heterocyclic compounds as novel antiviral agents: a review. **Bioorg. Chem.**, v. 114, p. 105076, 2021.

MERZOUKI, O. et al. Eco-friendly synthesis, characterization, in-silico ADMET and molecular docking analysis of novel carbazole derivatives as antibacterial and antifungal agents, **Journal of Molecular Structure**, v. 1271, 2023.

MILOSEVIC, N. P. et al. Evaluation of in silico pharmacokinetic properties and in vitro cytotoxic activity of selected newly synthesized N-succinimide derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.137, p. 252-257, 2017.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A., ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, 1043, p. 3-11, 2017.

MOGHADDAM-MANESH, M. et al. Investigation and comparison of biological effects of regioselectively synthesized thiazole derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 1525-1530, 2021.

MOHAMADI, M. et al. In vitro and in silico studies of the interaction of three tetrazoloquinazoline derivatives with DNA and BSA and their cytotoxicity activities against MCF-7, HT-29 and DPSC cell lines. **Int. J. Biol. Macromol.** v.94, p. 85-95, 2017.

MOHAMED, H. A. et al. Design of new hybrids indole/phthalimide/oxadiazole-1,2,3 triazole agents and their anticancer properties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1274, n. 2, 134415, 2023.

MONDAL, M. et al. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. **Journal of Luminescence**, v.192, p.990-998, 2017.

MOOSAVI, S. M.; GHASSABIAN, S. Linearity of calibration curves for analytical methods: a review of criteria for assessment of method reliability. In: Calibration and Validation of Analytical Methods. **Intechopen**, 2018.

MULLEN, C. A. et al. Cell morphology and focal adhesion location alters internal cell stress. **Journal of the Royal Society Interface**, v.11, n.101, p.20140885, 2014.

MUNTEANU, I.; CONSTANTIN, A. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: **A Review. Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.

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

MYZNIKOV, L.V.; HRABALEK, A.; KOLDOBSKII, G.I. Drugs in the tetrazole series. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v.43, n.1, p. 1-9, 2007.

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

NASR, T.; BONDOCK, S.; YOUNS, M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.76, p.539-548, 2014.

NASCIMENTO, I. J. S. **Síntese, caracterização estrutural e relação estrutura-atividade de novos compostos cíclicos tiazolidínicos e tiazínicos derivados de tiossemicarbazonas planejados como portótipo de fármaco leishmanicida.** Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

NAVEN, R. T.; LOUISE-MAY, S.; GREENE, N. The computational prediction of genotoxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 7, p. 797-807, 2010.

NIU, Z. et al. Application and synthesis of thiazole ring in clinically approved drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.250, 115172, 2023.

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.1, p.1-7, 2018.

OLIVEIRA, J.F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones índole-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. International Agency For Research on Cancer. GCO. Global Cancer Observatory. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/>. Acesso em: 12 de Nov. 2022.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Câncer. [OPAS,2020]. Disponível:<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20%C3%A9%20a%20segunda,de%20baixa%20e%20m%C3%A9dia%20renda>. Acesso em: 17 de Jun. 2023.

OTHMAN, I. M. M. et al. Chemical synthesis and molecular docking study of new thiazole, thiophene, and thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives as potential antiproliferative and antimicrobial agentes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1270, 133926, 2022.

OUF, S. A. et al. Efficiency of newly prepared thiazole derivatives against some cutaneous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3287-3295, 2018.

OZDEMIR, A. et al. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.89, p. 304-309, 2015.

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

PACHECO, P.A.F, SANTOS, M.M.M. Recent progress in the development of indole-based compounds active against malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis. **Molecules**, 27(1):319, 2022.

PANDA, S.K. et al. Phyto-pharmacognostical studies and quantitative determination of reserpine in different parts of Rauwolfia (spp.) of Eastern Odisha by UV spectroscopy method. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v.2, n.2, p. 151-162, 2012.

PATIL, P.O.; BARI, S.B. Synthesis, characterization and screening for antidepressant and anticonvulsant activity of 4,5-dihydropyrazole bearing indole derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v.9, n.4, p. 588-595, 2016.

PATIL, S.A.; PATIL, S.A.; PATIL, R. Medicinal applications of (benz) imidazole- and indole-based macrocycles. **Chemical Biology & Drug Design**, v.89, n.4, p.639-649, 2017.

PATIL, P. D. J. et al. Synthesis of naphthalimide derivatives bearing benzothiazole and thiazole moieties: In vitro anticancer and in silico ADMET study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, 133173, 2022.

PARRINO, B. et al. Synthesis, antitumor activity and CDK1 inhibition of new thiazole nortopsentin analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.138, p. 371-383, 2017.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

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.

PEDROSA, S. C. B. L. **Síntese, caracterização estrutural e estudos de mecanismos de ação antitumoral de derivados indólico**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017

PEERZADA, M. N. et al. Synthesis, characterization and Biological evaluation of tertiary sulfonamide derivatives of pyridyl-indole based heteroaryl chalcone as

potential carbonic anhydrase IX inhibitors and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 13-23, 2018.

PIEKARSKI, M. et al. 2014. The influence of pH and temperature on the stability of N-[(Piperidine)methylene]daunorubicin hydrochloride and a comparison of the stability of daunorubicin and its four new amidine derivatives in aqueous solutions. **The Scientific World Journal**, 803789, 2014.

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

PLSIKOVA, Jana et al. 3, 6-Bis (3-alkylguanidino) acridines as DNA-intercalating antitumor agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 57, p. 283-295, 2012.

PUM, J. Chapter six – A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. **Advances in Clinical Chemistry**, v.90, p. 215-281, 2019.

RAFIQUE, R. et al. Synthesis, in vitro  $\alpha$ -amylase inhibitory, and radicals (DPPH & ABTS) scavenging potentials of new N-sulfonohydrazide substituted indazoles. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, 130410, 2020.

RAI, Y. et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, v.8, 1531, 2018.

RÀFOLS, C.P. et al. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.150, p.452-459, 2018.

RAJA, D.S.; BHUVANESH, N. S. P.; NATARAJAN, K. DNA binding, protein interaction, Radical scavenging and cytotoxic activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (20-hydroxybenzoyl) hydrazone and its Cu (II) complexes: a structure activity relationship study. **Inorg. Chim. Acta**, v.385, p.81-93, 2012.

RAKESH, K.P. et al. Anticancer and DNA binding studies of potential amino acids based quinazolinone analogs: synthesis, SAR and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, v.87, p.252-264, 2019.

RANA, R. et al. A comprehensive review on thiazole based conjugates as anti-cancer agents. **Journal of Molecular Structure**, v.1292, 136194, 2023.

RAVEESHA, R. et al. Synthesis and characterization of novel thiazole derivatives as potential anticancer agents: Molecular docking and DFT studies. **Computational Toxicology**, v. 21, 100202, 2022.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiol.**, v.4, n. 3, pp. 482-501, 2018.

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.34, p.111592-49, 2019.

RIBEIRO, A. G. et al. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Med Chem Res**, v. 30, p. 1469–1495, 2021.

ROCHA, R. T. et al. Synthesis, in Vitro Schistosomicidal Activity and Ultrastructural Alterations Caused by Thiosemicarbazones and Thiazolidinones Against Juvenile and Adult Schistosoma Mansoni Worms (Sambon, 1907). **SSRN Electronic Journals: The English & Commonwealth Law Abstracts Journal**, v. 6, p. 1-14, 2022.

RODRIGUES, G.S et al. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. **Quim. Nova**, v. 44, n. 8, p.1036-1044, 2021.

ROUF, A.; TANYELI, C. Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, p.911-927, 2015.

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

RUGO, H.S. et al. CALGB 40502/NCCTG N063H: Randomized phase III trial of weekly paclitaxel (P) compared to weekly nanoparticle albumin bound nab-paclitaxel (NP) or ixabepilone (Ix) with or without bevacizumab (B) as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer (MBC). **Journal of Clinical Oncology**, v.30, Suppl. 15, 2012.

SAADATI, N. et al. Limit of detection and limit of quantification development procedures for organochlorine pesticides analysis in water and sediment matrices. **Chemistry Central Journal**, v.7, 63, 2013.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; HOWDEN, C.W. Review article: the Clinical Pharmacology of Proton Pump Inhibitors. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.23, Suppl. 2, p. 2-8, 2006.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine in Cancer**, p. 775-806, 2017.

SALEM, A.A. et al. Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.20, p.1-13, 2019.

SANNA, G. et al. Synthesis and biological evaluation of novel indole-derived thioureas. **Molecules**, v.23, n.10, p.2554-2571, 2018.

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.

SANTOS, N. F. et al. Synthesis, characterization, antioxidant and antiparasitic activities new naphthyl-thiazole derivatives. **Experimental Parasitology**, v.23, p.108498, 2023.

SCARIM, C. B.; PAVAN, F. R. Thiazole, triazole, thio-and semicarbazone derivatives-Promising moieties for drug development for the treatment of tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 1, p. 100002, 2021.

SCHUMACHER, H.R. et al. Phase II, dose response, safety and efficacy clinical trial of a new oral xanthine oxidase inhibitor TMX-67 (febuxostat) in subjects with gout. American College of Rheumatology **Annual Scientific Meeting, Atlanta**, United States, p.24-29, 2002.

SCIENTIFIC TF. **Cell culture basics handbook**. UK: Gibco, 2015.

SEGERITZ, C. P., VALLIER, L. Cell Culture. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**, v.1, p.151-172, 2017.

SHIAU, J. P. et al. Brown algae-derived fucoidan exerts oxidative stress-dependent antiproliferation on oral cancer cells. **Antioxidants**, v.11, n.5, 841, 2022.

SCUOTTO, M. et al. Discovery of novel multi-target indole-based derivatives as potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, n.1, p. 327-337, 2017.

SECCI, D. et al. 4-(3-Nitrophenyl) thiazol-2-ylhydrazones derivatives as antioxidants and selective hMAO-B inhibitors: synthesis, biological activity and computational analysis. **J. Enzym. Inhib. Med. Chem.**, v. 34, p. 597-612, 2019.

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

SHEETAL, M. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the estimation of docetaxel in bulk drug and formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.3, n.2, p.48-52, 2013.

SHI, J.H. et al. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular docking methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.162, p.14-23, 2016.

SHUAI et al. Recent progress on tubulin inhibitors with dual targeting capabilities for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, 64(12):7963-7990, 2021.

SIDDHARTH, S. et al. Chitosan-dextran sulfate coated doxorubicin loaded PLGA-PVA-nanoparticles caused apoptosis in doxorubicin resistance breast cancer cells through induction of DNA damage. **Scientific Reports**, v.7:2143, 2017.

SIEGAL, G.; AB, E.; SCHULTZ, J. Integration of fragment screening and library design. **Drug Discovery Today**, v.12, n.23-24, p.1032-1039, 2007.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, E. B. **Concepção, síntese e caracterização de novos derivados piridil-1,3-tiazol como agentes antichagásicos**. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, M.M. et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.189, p.165-175, 2018.

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. 239, p.213-223, 2017.

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

SINGHAL, S.; KHANNA, P.; KHANNA, L. Synthesis, DFT studies, molecular docking, antimicrobial screening and UV fluorescence studies on ct-DNA for novel Schiff bases of 2-(1-aminobenzyl) benzimidazole. **Heliyon**, v.5, 2019.

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

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.124, p.1-19, 2013.

SOMA, C. E. et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporine A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. **Biomaterials**, v.21, p.1-7, 2000.

SOUZA, M.V.N. et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.77-84, 2005.

SPECIALE, A. et al. Silibinin as potential tool against SARS-Cov-2: In silico spike receptor-binding domain and main protease molecular docking analysis, and in vitro endothelial protective effects. **Phytotherapy Research**, v.35, n.8, p.4616-4625, 2021.

STANA, A. et al. Antioxidant activity and antibacterial evaluation of new thiazolin-4-one derivatives as potential tryptophanyl-tRNA synthetase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition e Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 898-908,2019.

SUN, Y.; WANG, W. Study on the interaction of bioactive compound S-allyl cysteine from garlic with serum albumin. **Journal of food and drugs analysis**, v. 25, p. 385-390, 2017.

SURIN, A. M. et al. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. **Biochemistry**, v.82, p. 737-749, 2017.

SVIRCEV, M. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of thiazole bioisosteres of goniofufurone through in vitro antiproliferative activity and in vivo toxicity. **Bioorganic Chemistry**, v. 121, 105691, 2022.

TALEUZZAMAN, M. Limit of blank (LOB), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). **Organic and Medicinal Chemistry International Journal**, v.7, n.5, p.1-5, 2018.

TANDON, R. et al. Recent Advances and Developments of in vitro Evaluation of Heterocyclic Moieties on Cancer Cell Lines. **The Chemical Record**, 2018.

TAKARADA, J. E. et al. Ru/Fe bimetallic complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity and study of their interactions with DNA/BSA and human topoisomerase IB. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.636, p.28-41, 2017.

TERMEK, Y.; IBRAHIM, H. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of na anticâncer drug flutamide with DNA and its analytical applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.736, p.1-7, 2015.

THAMILARASAN, V. et al. Cobalt (III) complexes as potential anticancer agents: Physicochemical, structural, cytotoxic activity and DNA/protein interactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 558-569, 2016.

THOMPSON, M. Precision in chemical manalysis: a critical survey of uses and abuses. **Analytical Methods**, v.4, n. 6, p.1598-1611, 2012.

TILEKAR, K.; SHELKE, O.; UPADHYAY, N.; LAVECCHIA, A.; RAMAA, C.S. Current status and future prospects of molecular hybrids with thiazolidinedione (TZD) scaffold in anticancer drug Discovery. **Journal of Molecular Structure**, v.1250, 131767, 2022.

TIZZIANI, Tiago et al. Antitumor screening of crude extracts of ten medicinal plants of Polygala genus from Southern Brazil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p. 079-083, 2017.

TOMCZYK, M.D.; WALCZAK, K.Z. 1,8-Naphthalimide based DNA intercalators and anticancer agents. A systematic review from 2007 to 2017. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.159, p.393-422, 2018.

TURCK, D. et al. Clinical pharmacokinetics of meloxicam. **Arzneimittelforschung**, v.47, n.3, p. 253-258, 1997.

TZVETKOV, N.T. et al. Indazole- and Indole-5-carboxamides: Selective and Reversible Monoamine Oxidase B Inhibitors with Subnanomolar Potency. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, n.15, p. 6679-6703, 2014.

VAN WEELDEN G. et al. Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. **Marine Drugs**, v.17, n.1, 32, 2019.

VARRICA, M.G. et al. DNA intercalators based on (1,10-phenanthrolin-2-yl)isoxazolidin-5-yl core with better growth inhibition and selectivity than cisplatin upon head and neck squamous cells carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.143, p.583-590, 2018.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem.**, v.45, p.2615–23, 2002.

VEENA, K. et al. Design and synthesis of novel benzimidazole linked thiazole derivatives as promising inhibitors of drug-resistant tuberculosis. **Journal of Molecular Structure**, v. 1269, 133822, 2022.

VENTOLA, C. L. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, n. 12, p. 742, 2017.

VERA, L. M.; SILVA, J. E.; ARTUR, M. S. S., Current progress on antioxidants incorporating the pyrazole core. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p.394-429, 2018.

VERBIC, T.; DORKÓ, Z.; HORVAI, G. Selectivity in analytical chemistry. **Revue Roumaine de Chimie**, v.58, p. 569-575, 2013.

VERMA, S. K. et al. Design, synthesis and structure-activity studies of amino acids conjugated quinazolinone-Schiff's bases as potential antioxidant and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v.6, p.100087, 2022.

VITAKU, E.; SMITH, D.T.; NJARDARSON, J.T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, n.24, p. 10257-10274, 2014.

WANG, Y.Q. et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted 11H-benzo[a]carbazole-5-carboxamides as novel antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.12, p.5878-5884, 2011.

WANG, L.H. et al. SYP-5, a novel HIF-1 inhibitor, suppresses tumor cells invasion and angiogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v.791, p.560-568, 2016.

WANG, S. et al. FDA-approved pyrimidine-fused bicyclic heterocycles for cancer therapy: synthesis and clinical application. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 214, p. 1132018, 2021.

WANG, Y. et al. Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.22, p.15980-15987, 2013.

WHITE, C.A. Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agente. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.2, n.1, p. 43-49, 2004.

WOLFE, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. **Biochemistry**, v. 26, n. 20, p. 6392-6396, 1987.

WU, S. Y. et al. Brown seaweed fucoidan inhibits cancer progression by dual regulation of mir-29c/ADAM12 and miR-17-5p/PTEN axes in human breast cancer cells. **Journal of Cancer**, v.7, n.15, p.2408-2419, 2016.

XIANGYAN, L.; CHEN, Y.; HU, P.; HUANG, W. Fatostatin Displays High Antitumor Activity in Prostate Cancer by Blocking SREBP-Regulated Metabolic Pathways and Androgen Receptor Signaling. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.13, p.855-866, 2014.

YADAV, M. et al. Indole-chalcone linked 1,2,3-triazole hybrids: Facile synthesis, antimicrobial evaluation and docking studies as potential antimicrobial agentes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1261, 132867, 2022.

YAKAN, H. et al. A new series of asymmetric bis-isatin derivatives containing urea/thiourea moiety: Preparation, spectroscopic elucidation, antioxidant properties and theoretical calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1239, 130495, 2021.

YAMAKI, S. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of glycine amide derivatives as novel vascular adhesion protein-1 inhibitors without CYP3A4 and CYP2C19 inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 4110-4122, 2017.

YANG, L. et al. Antioxidant properties of camphene-based thiosemicarbazones: Experimental and theoretical evaluation. **Molecules**, v. 25, n.5, 1192, 2020.

YANG, X. et al. Overcoming multidrug resistance in bacteria through antibiotics delivery in surface-engineered nano-cargos: recent developments for future nano-antibiotics. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 9, 2021.

YASREBI, S.A.; TAKJOO, R.; RIAZI, G.H. HSA-interaction studies of uranyl complexes of alkyl substituted isothiosemicarbazone. **Journal of Molecular Structure**, v.1193, p.53-61, 2019.

YOU, M. et al. Aldehyde-derivatized indoles as fluorescent probes for hydration environments. **Chemical Physics**, v. 526, p.110438, 2019.

YOUNIS, O. et al. Aggregation-induced emission with white, green, or blue luminescence from biologically-active indole derivatives. **Optical Materials**, v.100, 109713, 2020.

YOUSSIF, B. G. M. et al. Design, synthesis, mechanistic and histopathological studies of small-molecules of novel indole-2-carboxamides and pyrazino[1,2-a]indol-1(2H)-ones as potential anticancer agents effecting the reactive oxygen species production. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.146, p. 160-273, 2018.

YU, F. et al. A redox-active perylene-anthraquinone donor-acceptor conjugated microporous polymer with an unusual electron delocalization channel for photocatalytic reduction of uranium (VI) in strongly acidic solution. **Appl. Catal. B Environ.**, v. 314, 2022.

ZHANG, I. et al. Comprehensive Review in Current Developments of Imidazole-Based Medicinal Chemistry. **Medicinal Research Reviews**, v.34, n.2, p.340-437, 2014a.

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

ZHANG, X. et al. Enantioselective [3+ 2] cycloaddition and rearrangement of thiazolium salts to synthesize thiazole and 1, 4-thiazine derivatives. **Org. Chem. Front.**, v. 5, p. 2126-2131, 2018.

ZHANG, M. et al. Chromenone-based GSK-3 $\beta$  inhibitors as potential therapeutic targets for cardiovascular diseases: In silico study, molecular dynamics, and ADMET profiles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 12, 104288, 2022.

ZHAO, X. et al. Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-protein corona and the related cytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v.292, p.98-107, 2015.

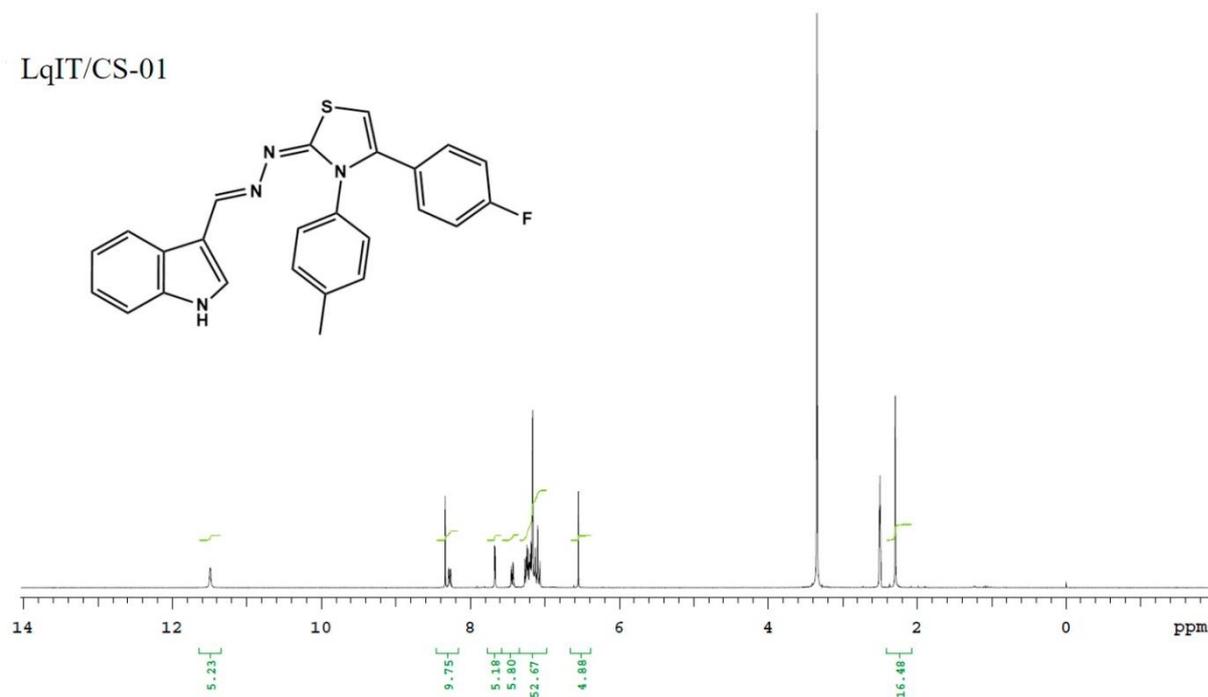
ZHANG, Z. et al. Fucoidan Extract Enhances the Anti-Cancer Activity of Chemotherapeutic Agents in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. **Marine Drugs**, v.11, n.1, p.81-98, 2013a.

ZHANG, Z. et al. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n.2, p.235-242, 2013b.

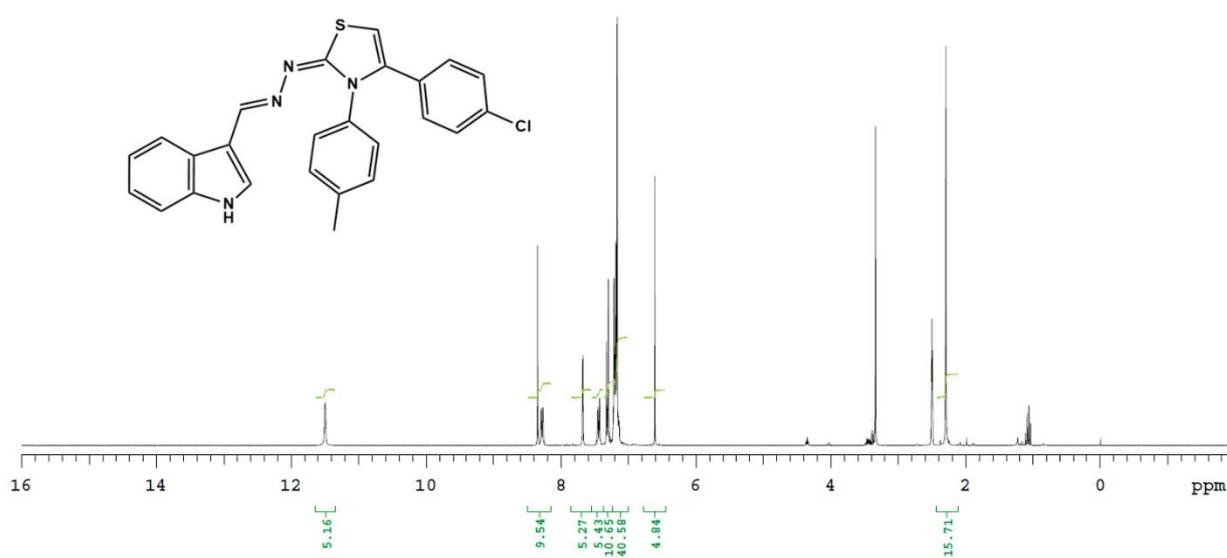
ZHOU, J. et al. Trypsin-catalyzed multicomponent reaction: A novel and efficient one-pot synthesis of thiazole-2-imine derivatives. **Journal of Biotechnology**, v.241, p.14-21, 2017.

## APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup>H DOS COMPOSTOS LQIT/CS-01 E LQIT/CS-02

LqIT/CS-01

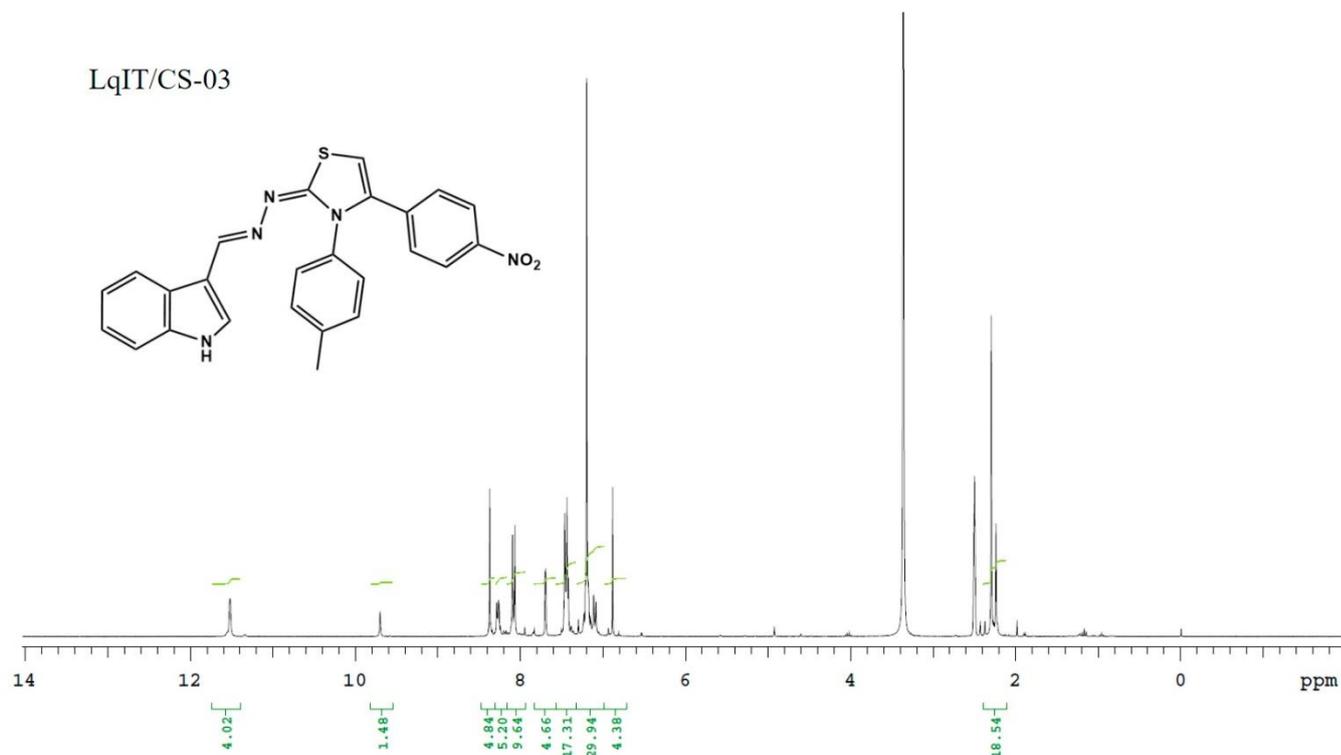


LqIT/CS-02

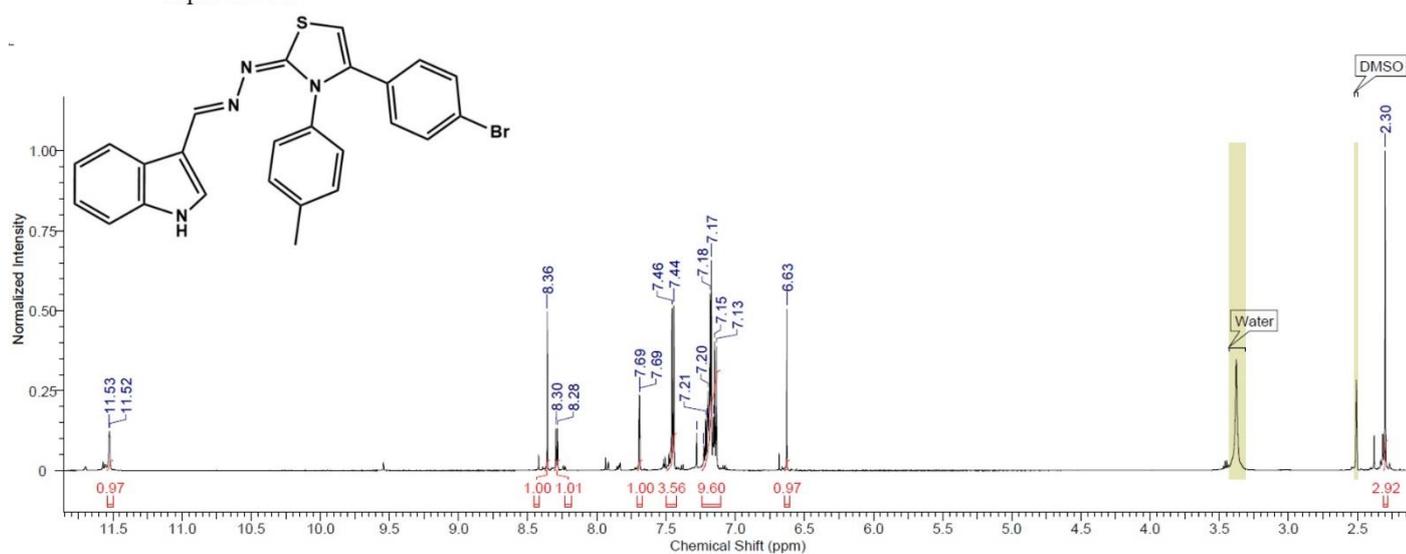


## APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup>H DOS COMPOSTOS LQIT/CS-03 E LQIT/CS-04

LqIT/CS-03

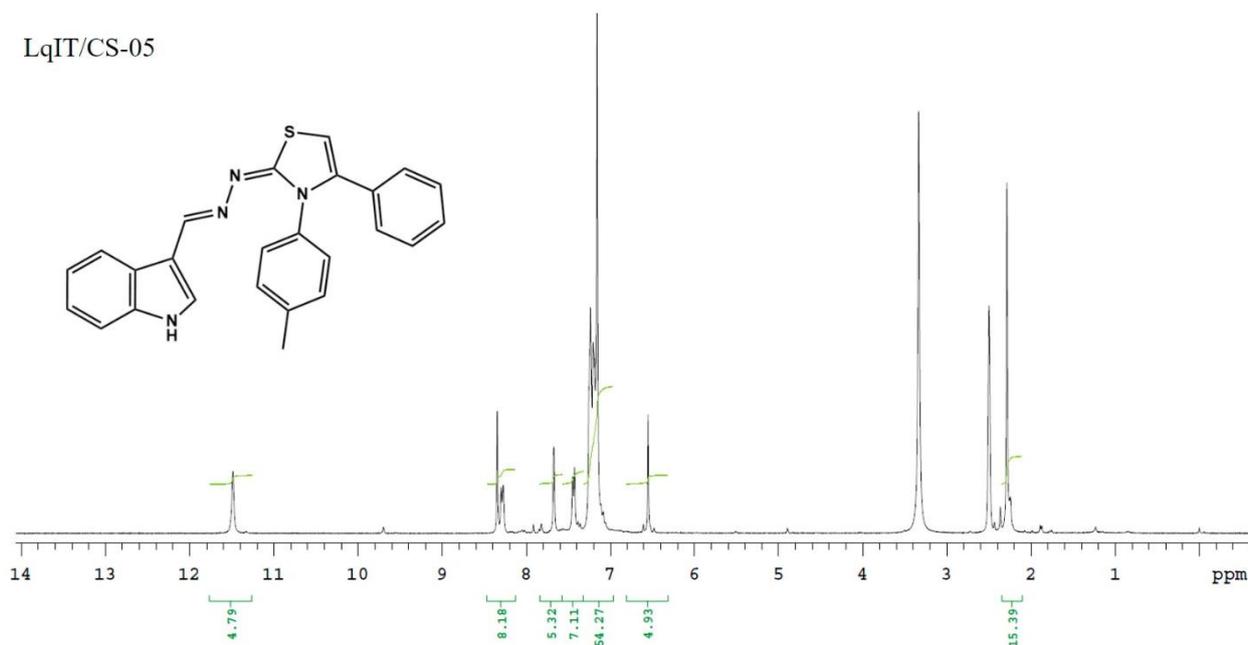


LqIT/CS-04

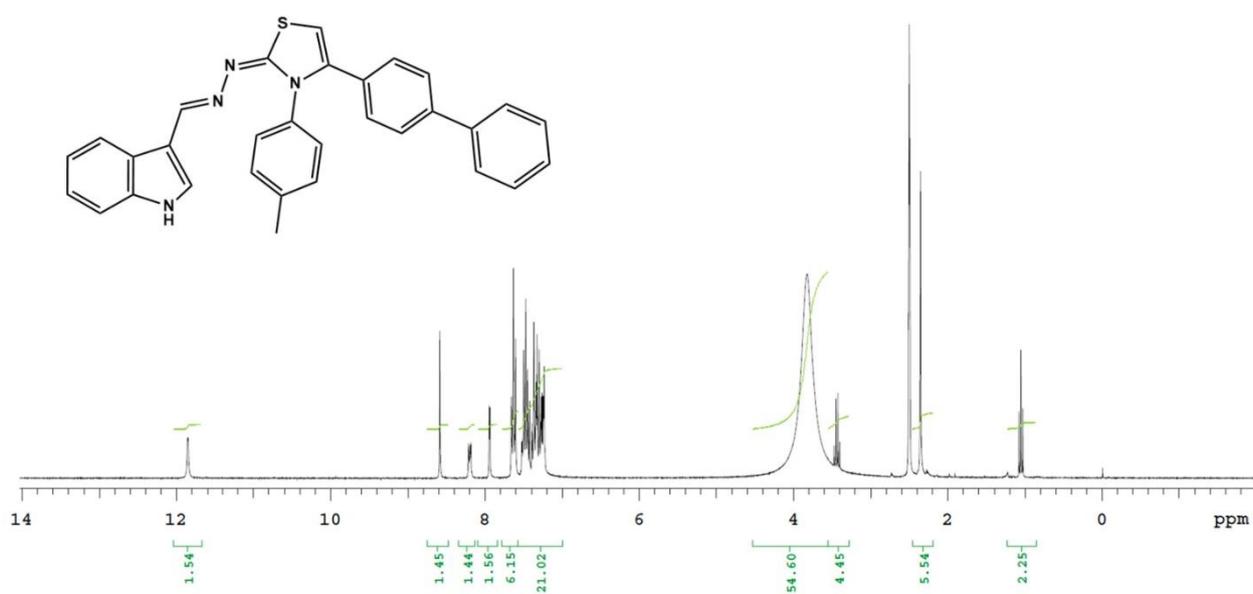


## APÊNDICE C – ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup>H DOS COMPOSTOS LQIT/CS-05 E LQIT/CS-06

LqIT/CS-05

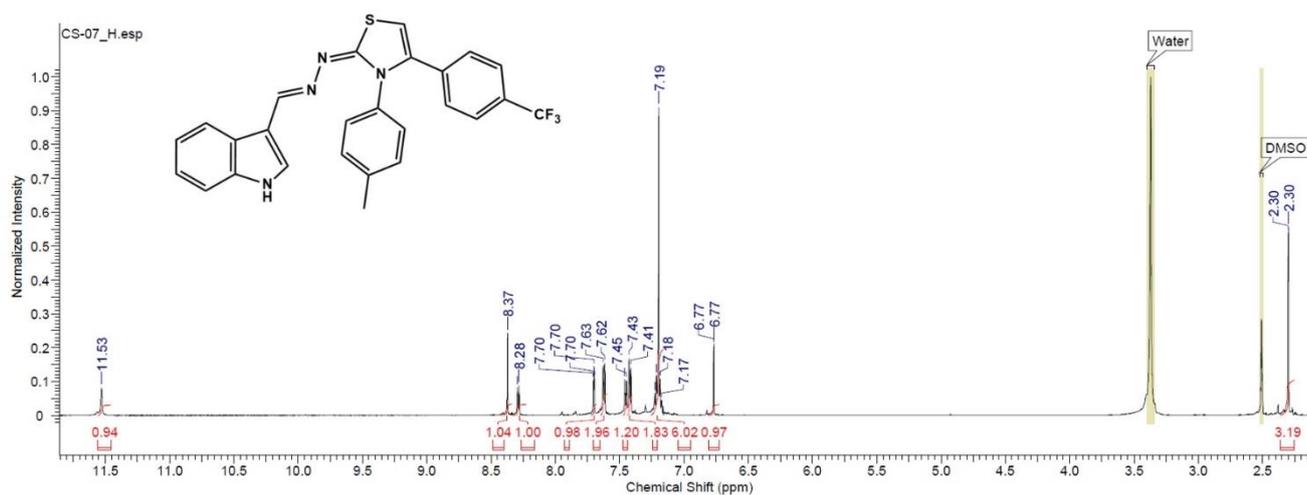


LqIT/CS-06

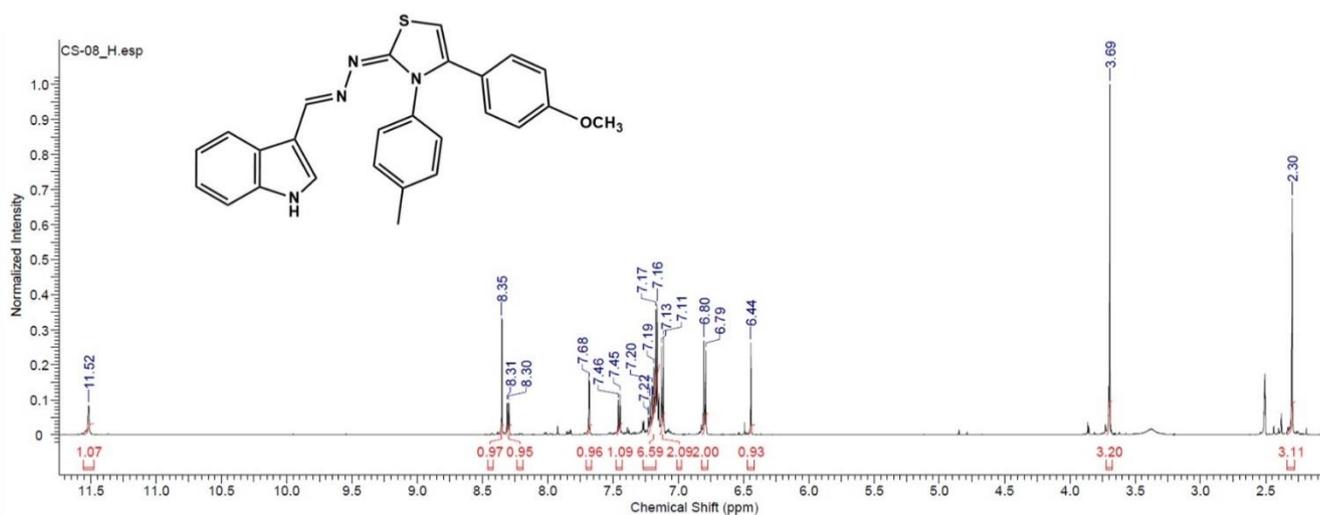


## APÊNDICE D – ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup>H DOS COMPOSTOS LQIT/CS-07 E LQIT/CS-08

LqIT/CS-07

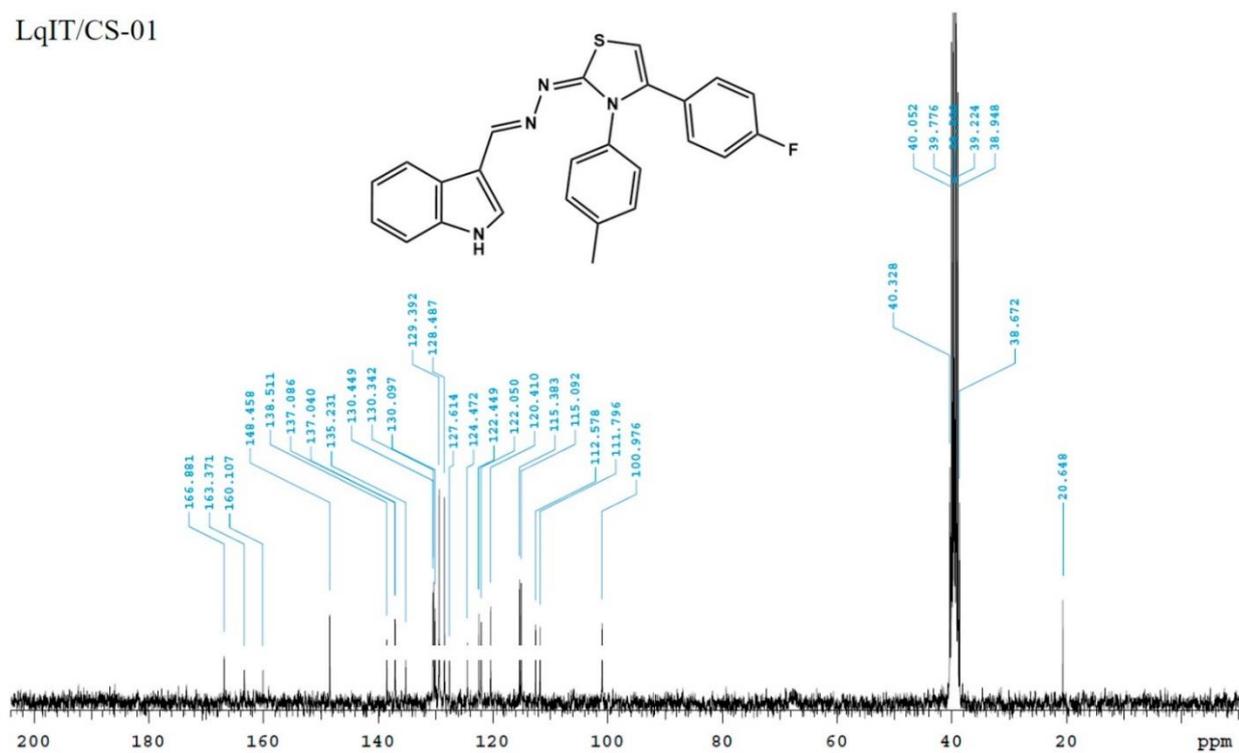


LqIT/CS-08

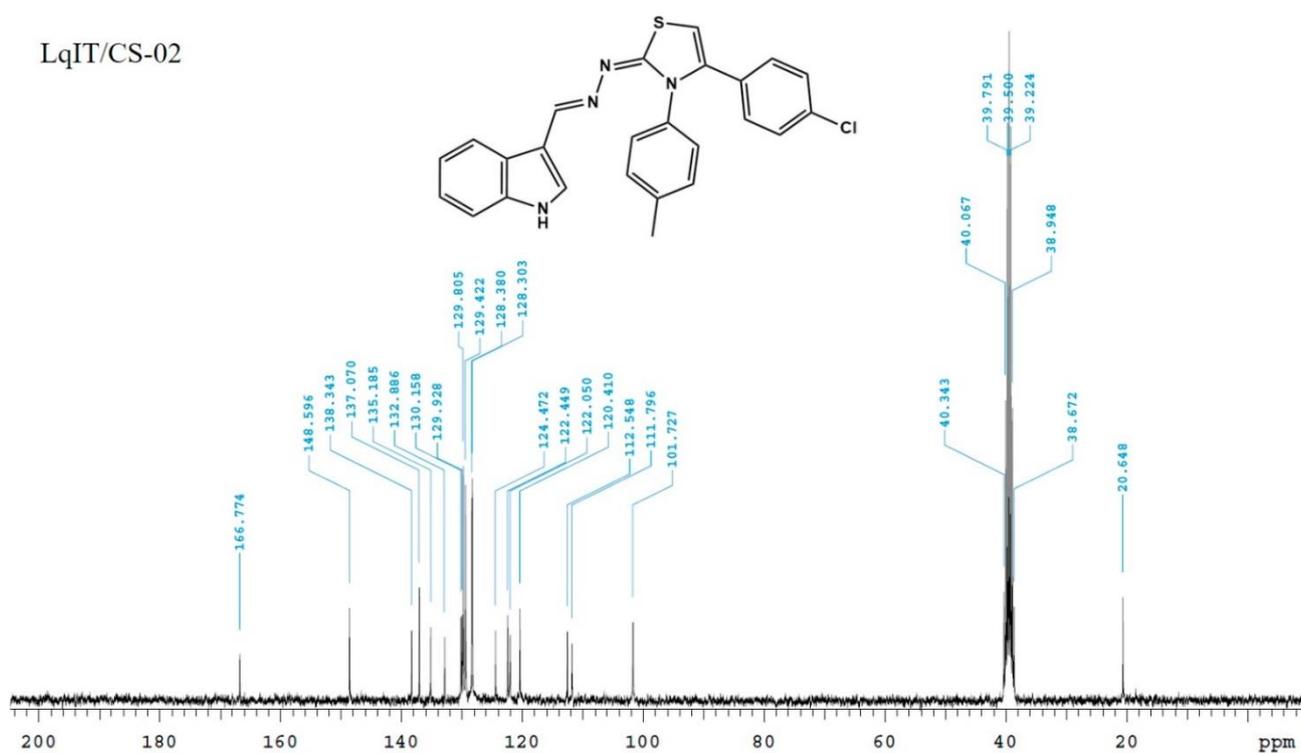


## APÊNDICE E – ESPECTROS DE RMN <sup>13</sup>C DOS COMPOSTOS LqIT/CS-01 E LqIT/CS-02

LqIT/CS-01

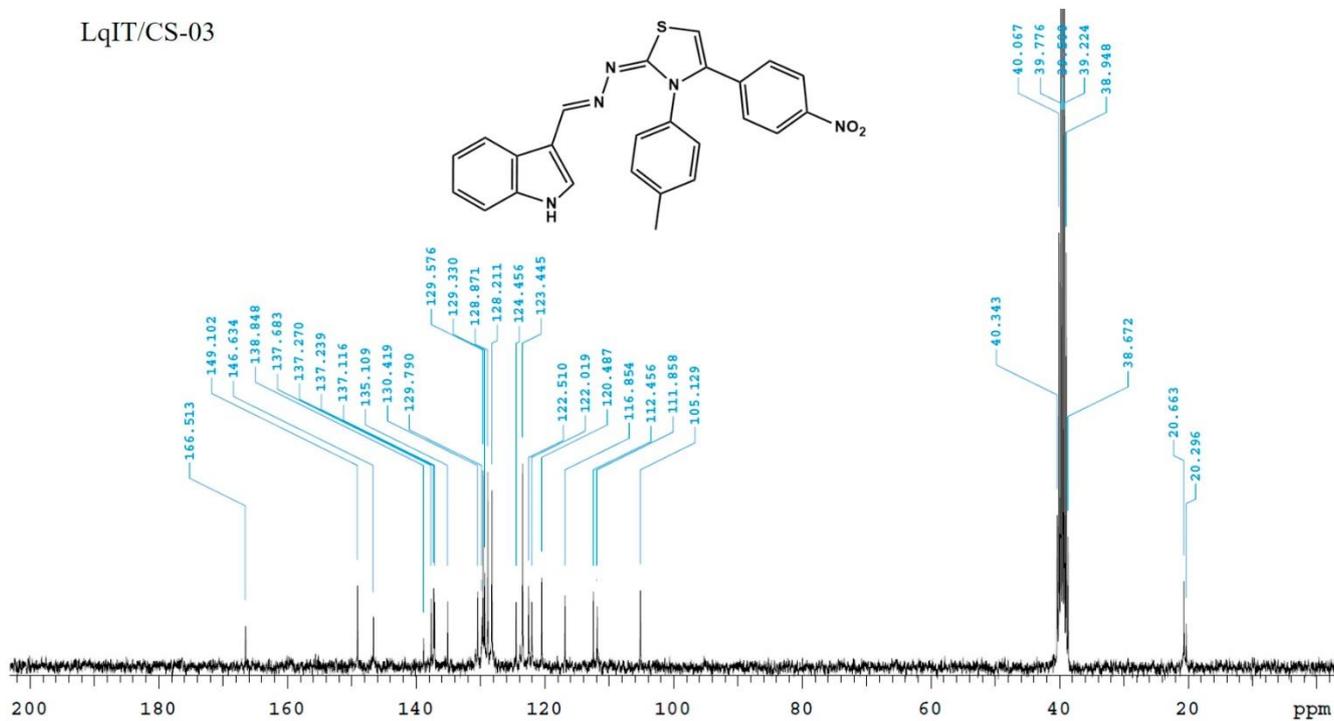


LqIT/CS-02

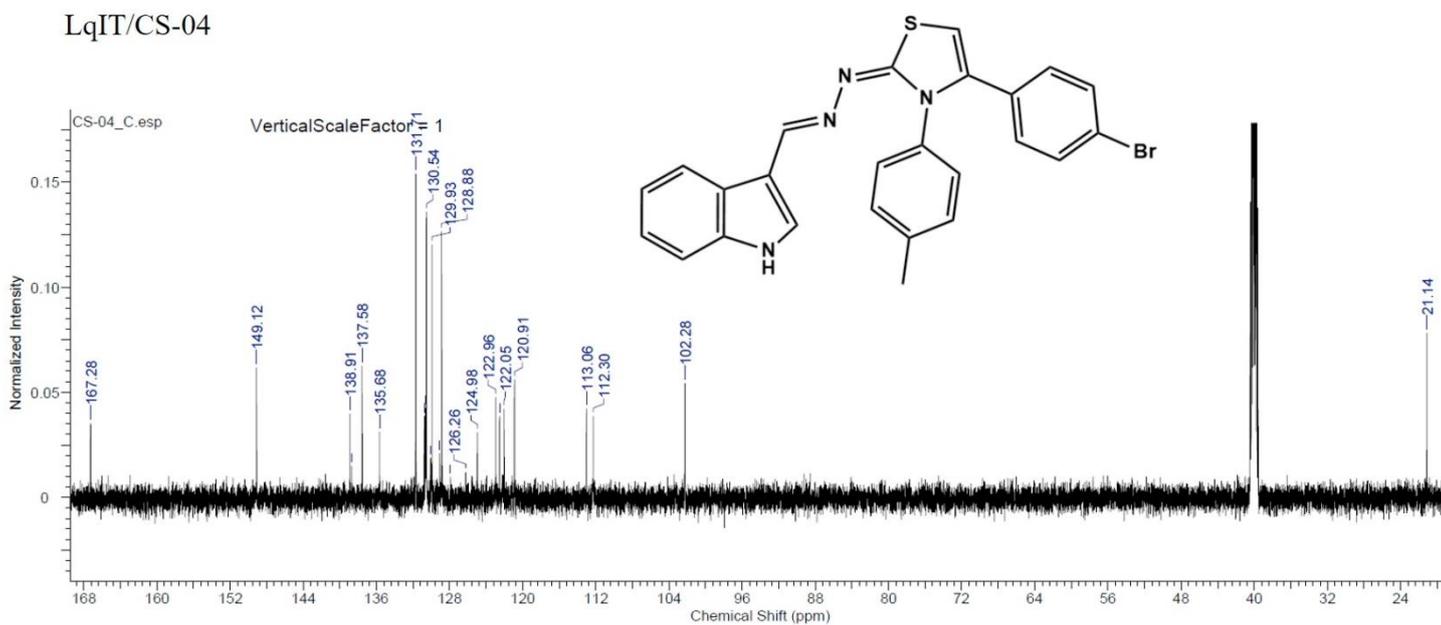


## APÊNDICE F – ESPECTROS DE RMN <sup>13</sup>C DOS COMPOSTOS LqIT/CS-03 E LqIT/CS-04

LqIT/CS-03

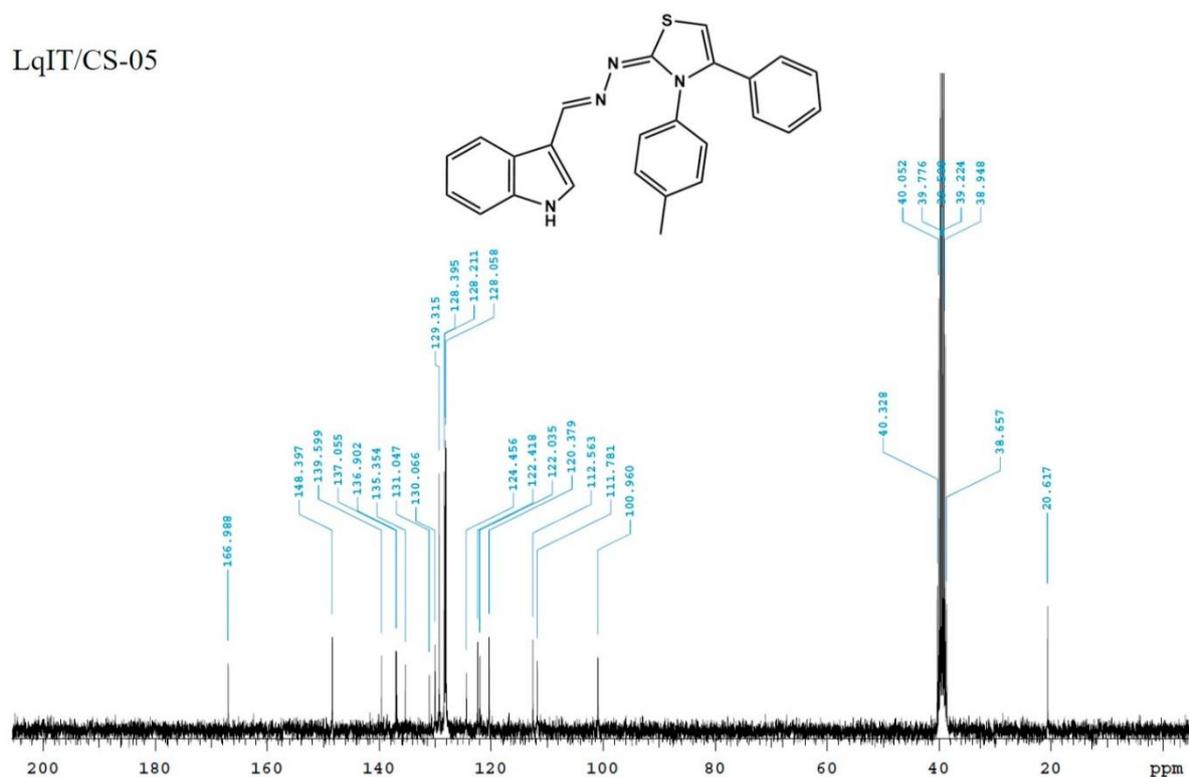


LqIT/CS-04

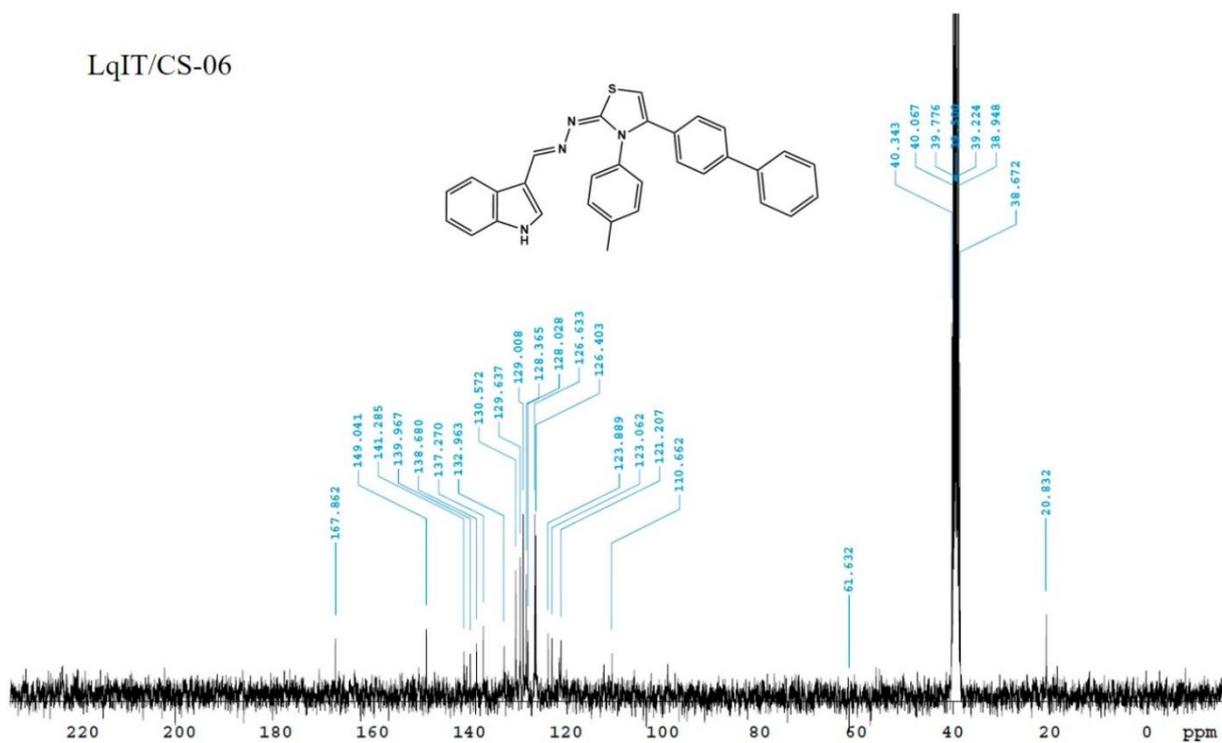


## APÊNDICE G – ESPECTROS DE RMN <sup>13</sup>C DOS COMPOSTOS LQIT/CS-05 E LQIT/CS-06

LqIT/CS-05

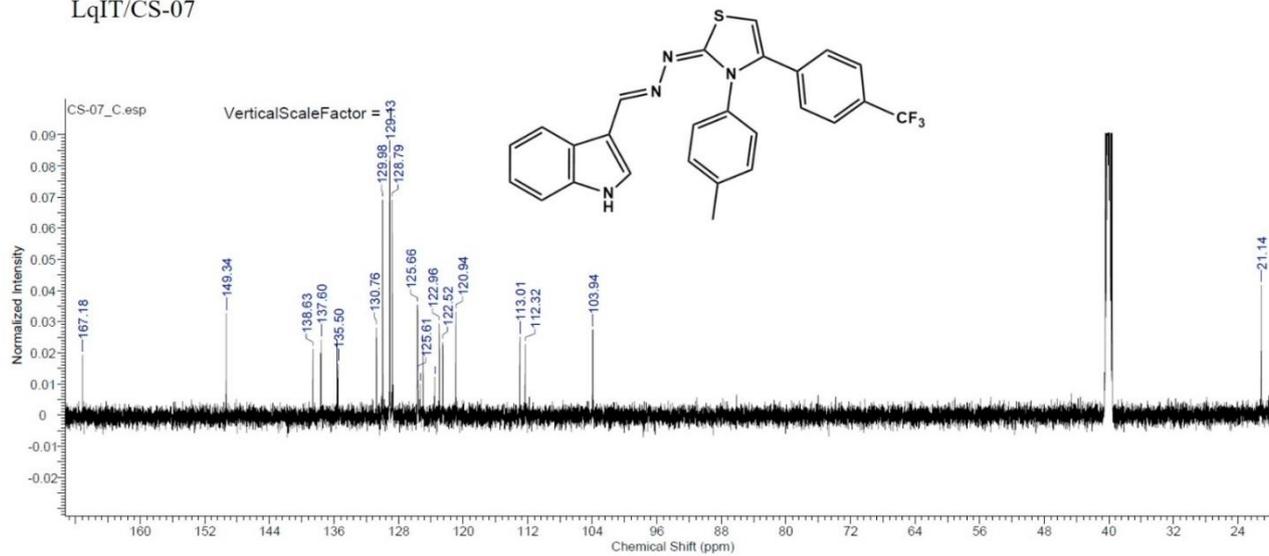


LqIT/CS-06

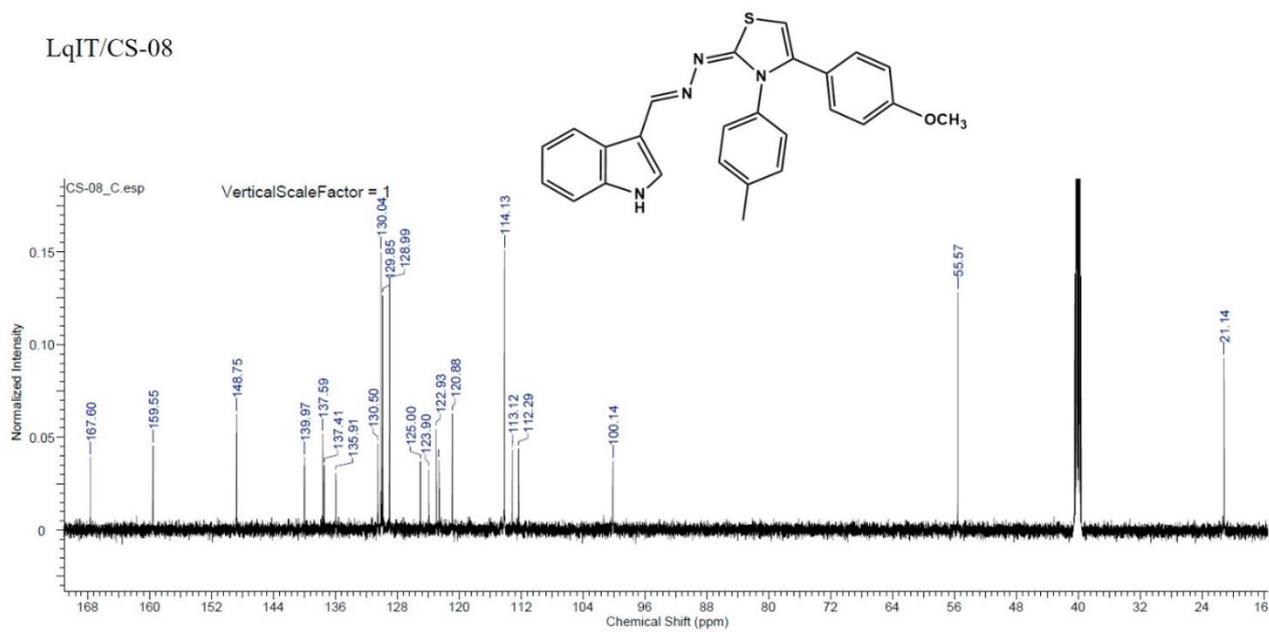


## APÊNDICE H – ESPECTROS DE RMN <sup>13</sup>C DOS COMPOSTOS LQIT/CS-07 E LQIT/CS-08

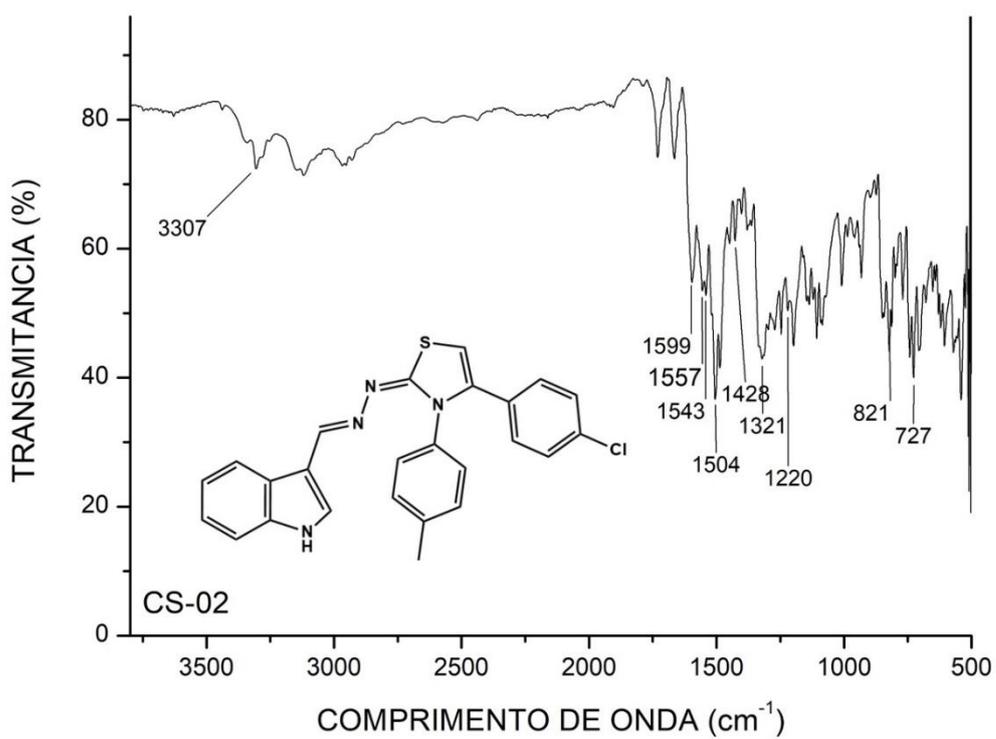
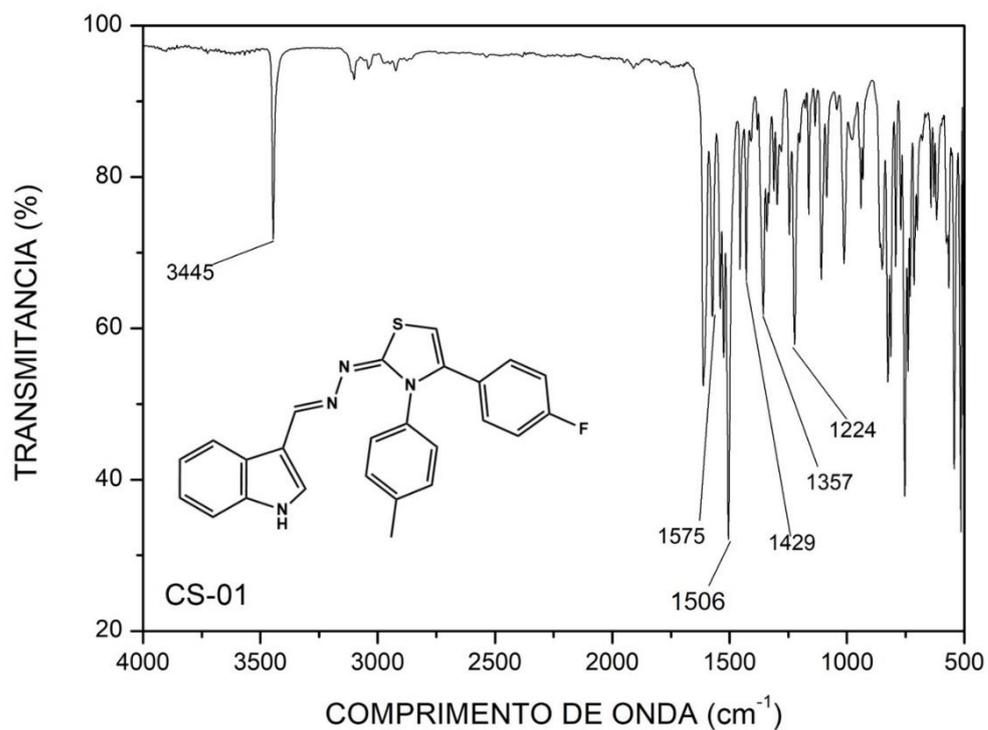
LqIT/CS-07



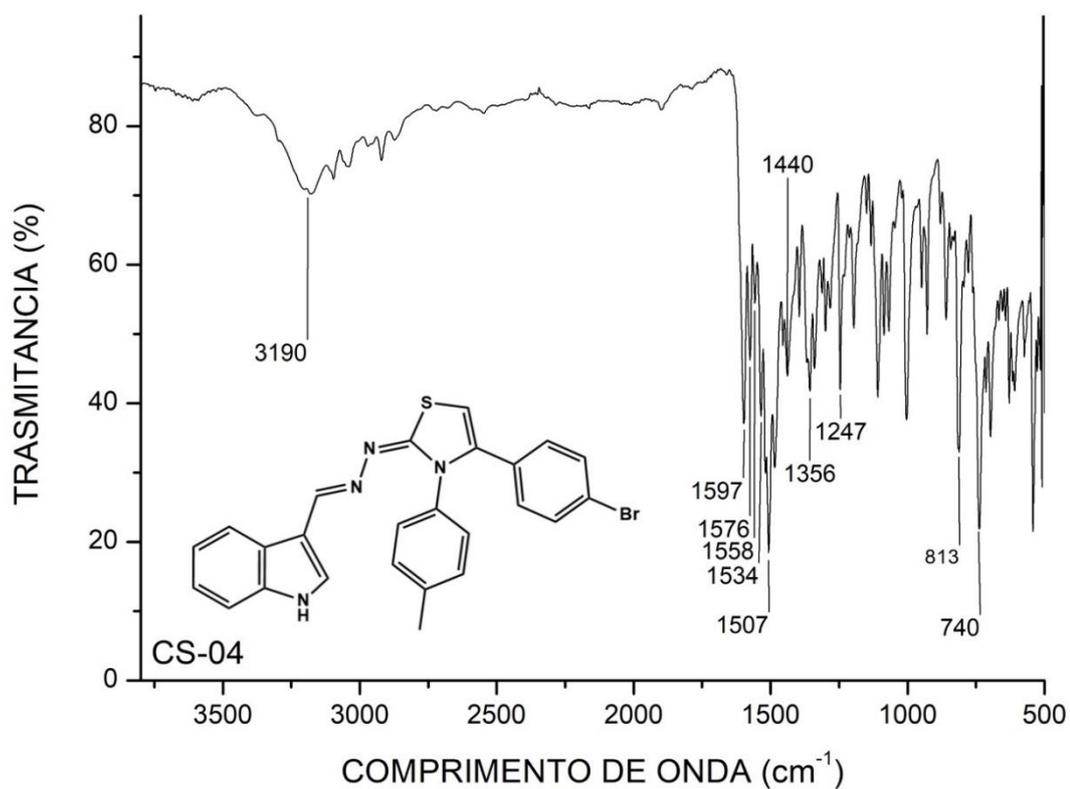
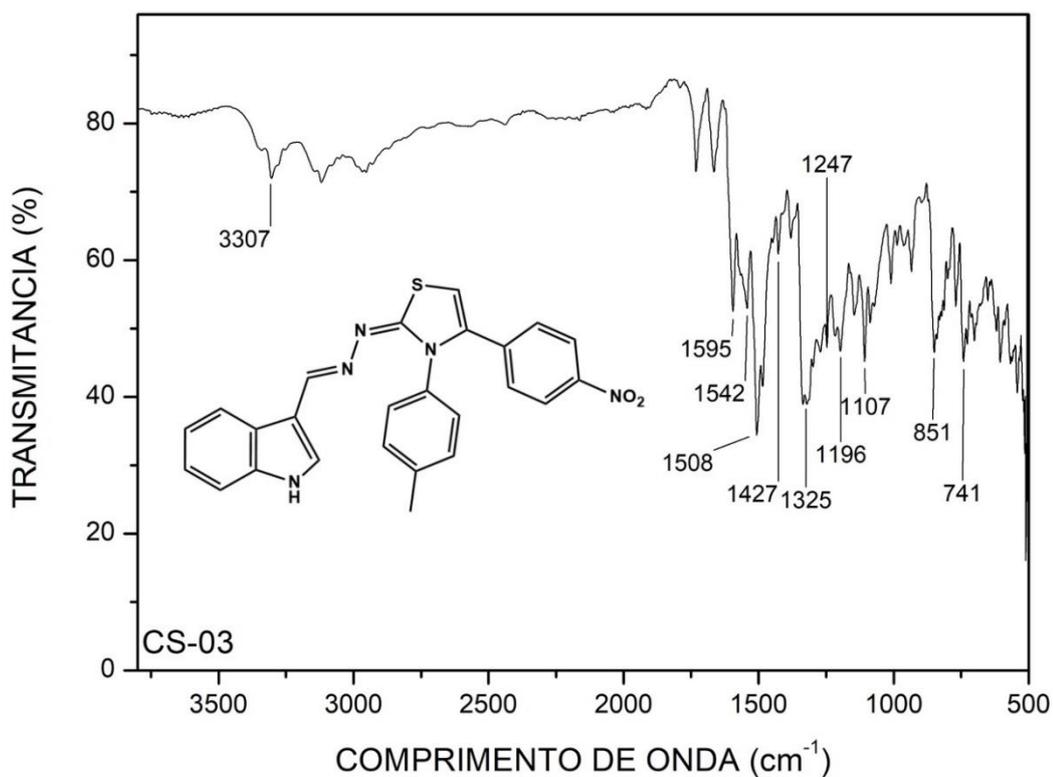
LqIT/CS-08

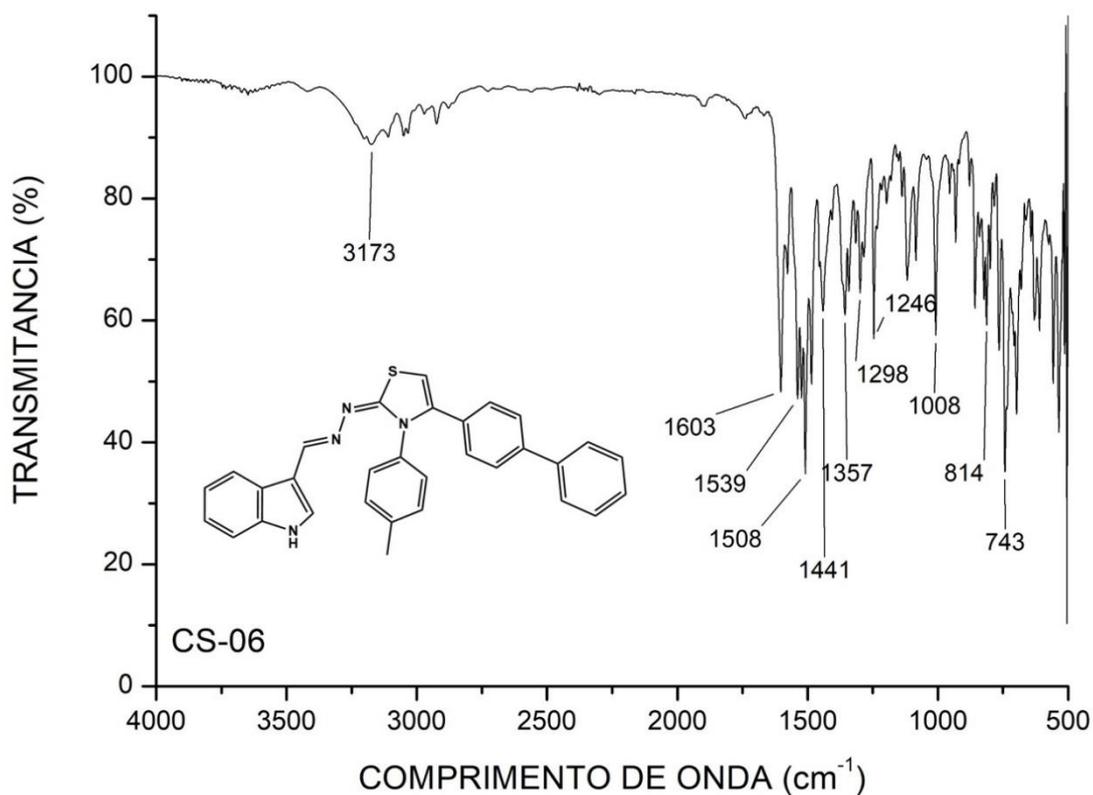
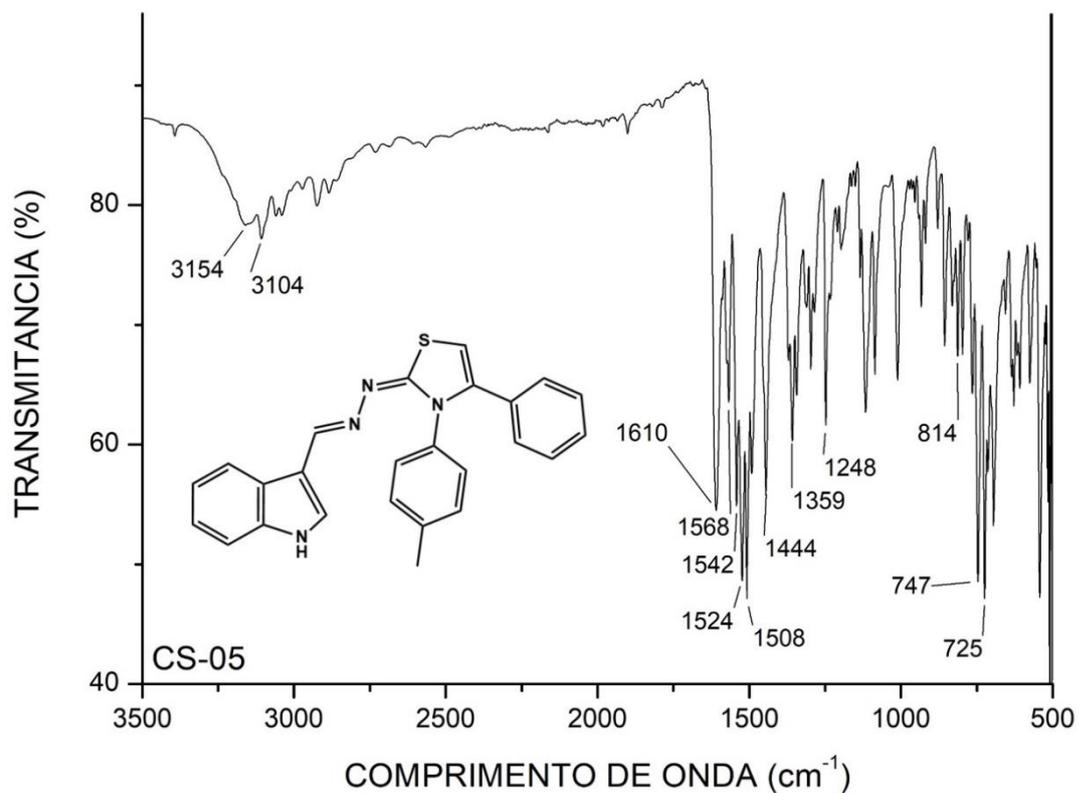


## APÊNDICE I – ESPECTROS DE IV DOS COMPOSTOS LQIT/CS-01 E LQIT/CS-02

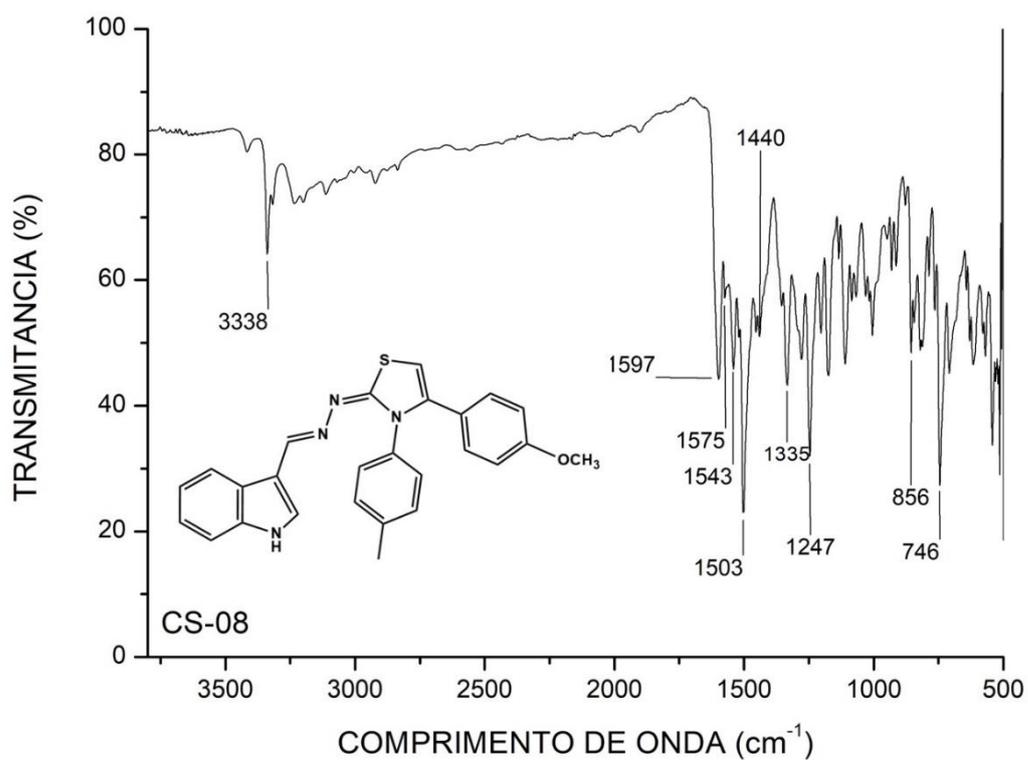
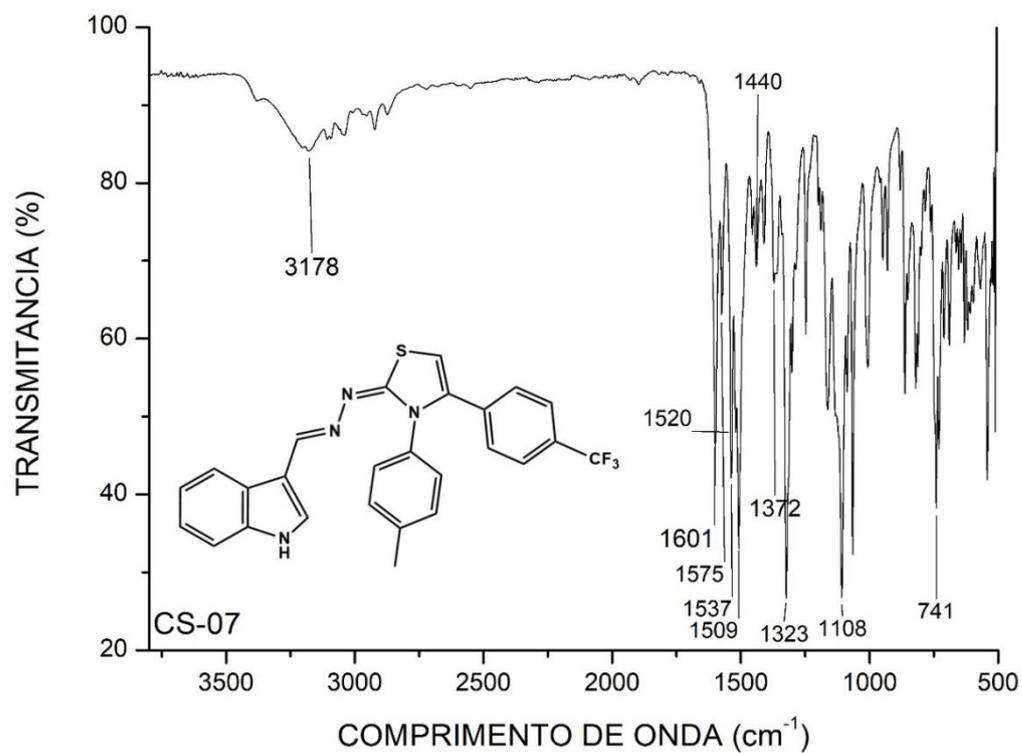


## APÊNDICE J – ESPECTROS DE IV DOS COMPOSTOS LQIT/CS-03 E LQIT/CS-04

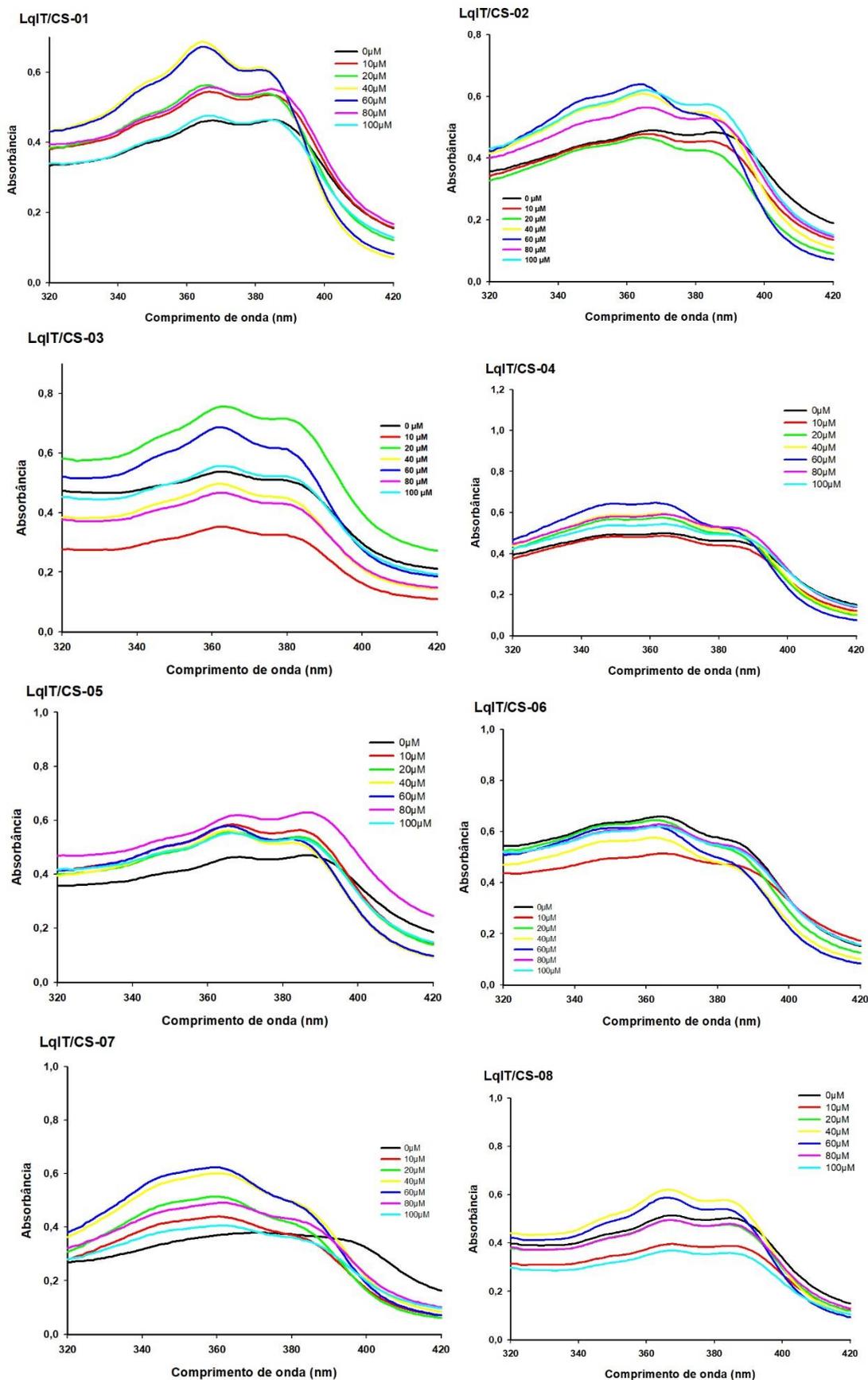


**APÊNDICE K – ESPECTROS DE IV DOS COMPOSTOS LQIT/CS-05 E LQIT/CS-06**

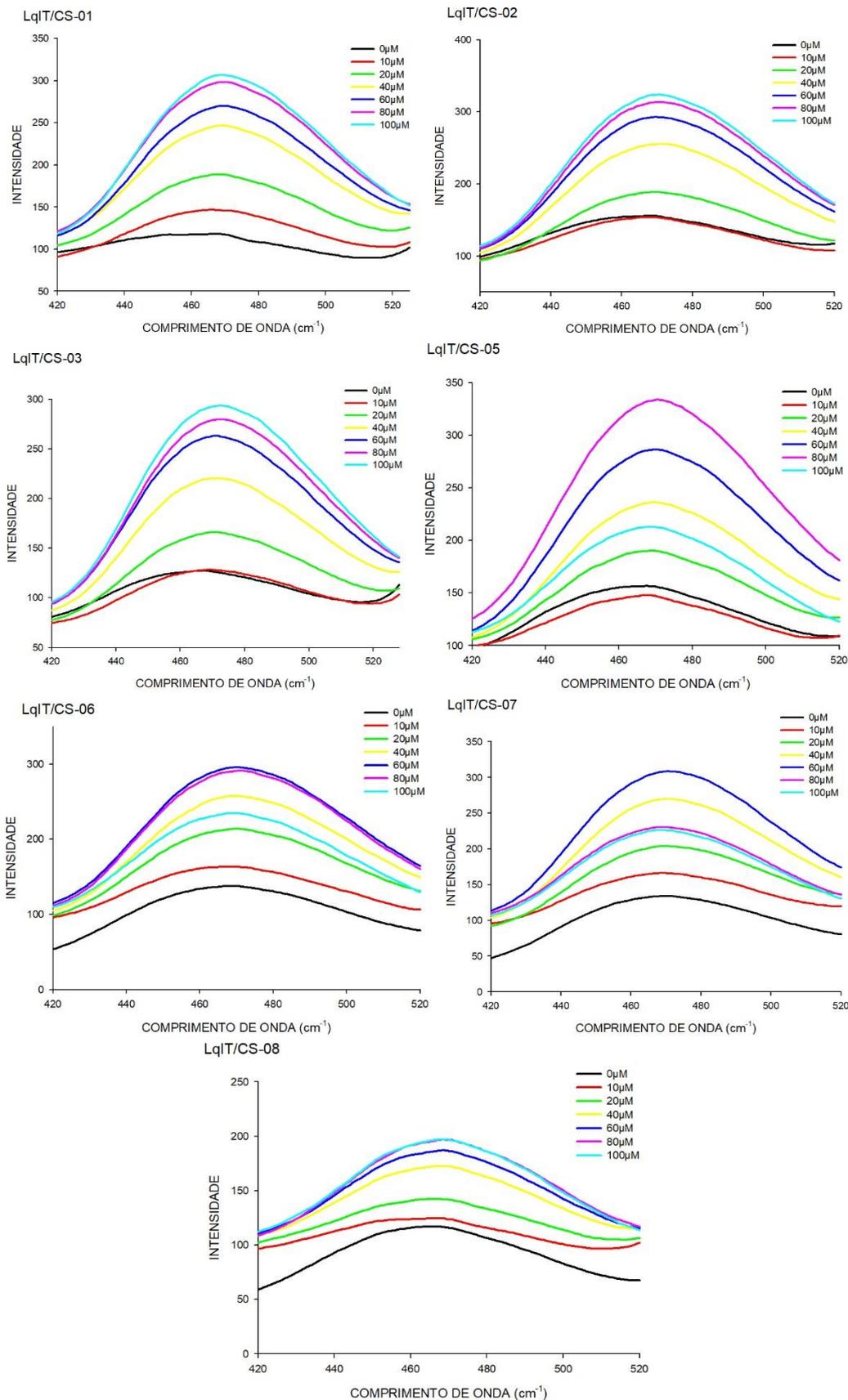
## APÊNDICE L – ESPECTROS DE IV DOS COMPOSTOS LQIT/CS-07 E LQIT/CS-08



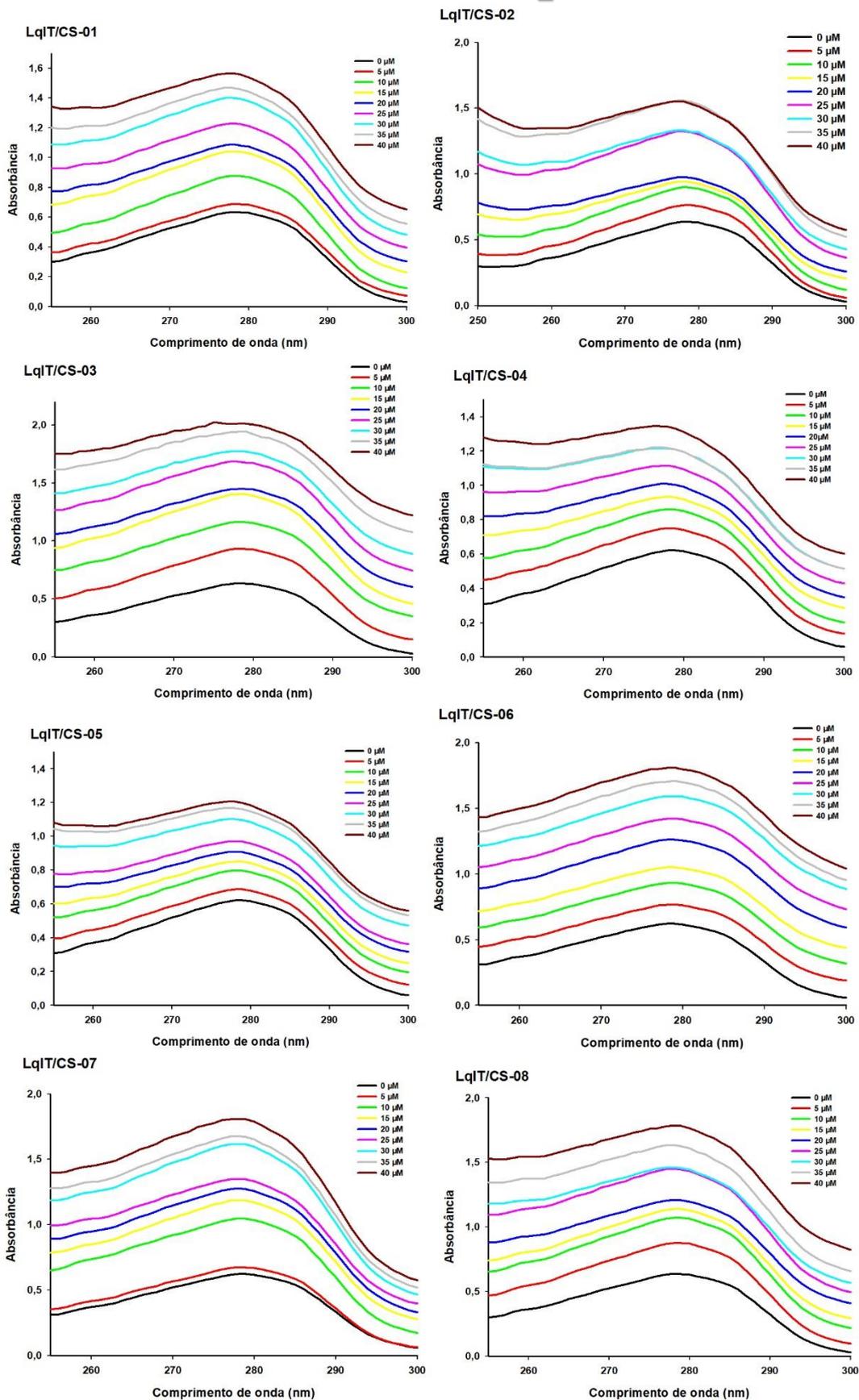
## APÊNDICE M – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS COMPOSTOS LqIT/CS's + DNA



## APÊNDICE N – ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPOSTOS LQIT/CS's + DNA



## APÊNDICE O – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA BSA + COMPOSTOS LqIT/CS's



## APÊNDICE P – ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA BSA + COMPOSTOS LQIT/CS's

