



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E A ALBUMINA SÉRICA BOVINA DE
NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS**

Recife

2019

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E A ALBUMINA SÉRICA BOVINA DE
NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS**

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

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

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

**Recife
2019**

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Alves, Josival Emanuel Ferreira

Estudos de interação com o DNA e a albumina sérica bovina de novos derivados indol-tiazólicos / Josival Emanuel Ferreira Alves - 2019.

149 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices

1. Câncer 2. DNA 3. Indol-tiazólicos

I. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de (orient.) II. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-111

JOSIVAL EMANUEL FERREIRA ALVES

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM O DNA E A ALBUMINA SÉRICA BOVINA DE
NOVOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS**

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

Aprovada em: 15/02/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns

Prof.^a Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Externo)
Departamento de Farmácia – UEPB

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Aos meus prestativos companheiros de laboratório Natanael, Charles, César e Jamerson por me ajudarem benevolmente com a “desafiadora” parte de caracterização química dos derivados sintetizados.

Aos meus companheiros de laboratório Cleberson, Pedro, Paula, Franciane, Ariany que solícitamente me ajudaram na compreensão dos protocolos relativos aos experimentos químicos e pelo coleguismo que contribuiu amistosamente com minha estadia na família LQIT.

As minhas amáveis e queridas amigas e irmãs científicas “Tops da interação” Amélia, Denise, Iris, Keriolaine (Kel) e Aurenice, por sempre estarem ao meu lado facilitando e colaborando piamente com meu aprendizado técnico-teórico; pelos ricos, inesquecíveis, apreciáveis e cômicos momentos de descontração e entretenimento que tanto me revigoraram, em especial, nos instantes de adversidade, cujo companheirismo e cumplicidade extrapolaram as paredes dos laboratórios, tornando-se um vínculo fraternal que vou levar para toda a vida. Indubitavelmente, vocês foram fundamentais à realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de mestrado Tayrine e Noé, pelos momentos de descontração e conversas tão produtivas que tivemos durante esse período, pelo companheirismo, sobretudo, nas apresentações de seminários durante a vivência das disciplinas; pelos conhecimentos compartilhados, pelo fato de sempre um estar encorajando e torcendo pelo sucesso do outro. Aprendi demais no convívio com vocês. Esse trio vai longe! Vocês são demais!

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

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

Ao EREM Sebastião Tiago de Oliveira, em Jupi-PE, na pessoa da minha querida amiga e gestora Fabiana Maranhão, que tanto me impulsinou a trilhar por este novo caminho, depositando com veemência sua confiança na minha capacidade.

Aos meus colegas professores e demais funcionários da instituição supracitada, aqui representados pela minha grande amiga Leidjane, uma pessoa maravilhosa e exemplo de profissional docente a ser seguido, por tanto me incentivar a fazer o mestrado, sempre

acreditando na minha trajetória acadêmica e que eu seria bem sucedido nesta nova empreitada.

Aos meus queridos ex-alunos deste educandário, pois, em todo tempo, também acreditaram na minha capacidade, por torcerem pelo sucesso profissional e por me incentivarem a ser um docente melhor a cada dia, refletindo incisivamente no profissional que pretendo ser.

Ao colégio CINDER, em Lajedo-PE, na pessoa da minha querida amiga e gestora Graciara das Neves, que mesmo em pouco tempo trabalhando juntos, também depositou tanta confiança na minha capacidade e por ter me incentivado a galgar mais um degrau na minha vida profissional.

Ao corpo docente e demais funcionários da referida instituição pedagógica, aqui representados por minhas amigas Érica e Edja, que com tanta alegria me fizeram se sentir em casa, por torcerem tanto por mim e que tanto me apoiaram quando decidi alçar voo para esta nova etapa da minha vida.

Aos meus queridos ex-alunos do educandário previamente mencionado, por, incessantemente, também acreditarem na minha capacidade, por compreenderem minha ausência e por contudentemente me auxiliarem a crescer enquanto docente, contribuindo com minha maturidade pessoal, repercutindo no meu aprimoramento enquanto profissional que almejo me tornar.

Aos técnicos do CETENE, do DQF-UFPE e do LAC-UFPE pela realização de análises cruciais à conclusão desta pesquisa.

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

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

“Então a nossa boca se encheu de riso e a nossa língua de cânticos; então, se dizia entre as nações: ...Grandes coisas fez o Senhor por nós, e, por isso, estamos alegres.”

(BÍBLIA, 2011, 3-1664)

RESUMO

Compostos heterociclos têm sido considerados uma boa escolha no desenho de moléculas providas de diversas ações farmacológicas, interagindo com distintos alvos terapêuticos. Ademais, estes apresentam uma relativa facilidade de serem modificados com substituintes adicionais, qualificando-os como excelentes pontos de partida para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos, por exemplo. O DNA é considerado um alvo molecular relevante em várias investigações terapêuticas, cuja eficácia é dependente do grau de afinidade de um dado ligante com esta biomolécula. Nesse contexto, é imprescindível conhecer a capacidade de ligação de fármacos e protótipos de fármacos com proteínas plasmáticas como as albuminas séricas, cujo grau de afinidade pode determinar sua biodisponibilidade e eficácia. À vista disso, esse trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar dez novos derivados indol-tiazólicos, bem como avaliar sua capacidade de interação com o ctDNA e com a albumina sérica bovina (BSA), através de distintas técnicas espectroscópicas e estudos de viscosidade. Os compostos propostos foram sintetizados com êxito e caracterizados por meio das técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, infravermelho e espectrometria de massas. Na análise da interação com o ctDNA, foram constatados efeitos hipercrômico, hipocrômico, hipsocrômico e batocrômico e as constantes de afinidade (K_b) calculadas pelo método de absorção UV-vis situaram-se entre 8.52×10^4 e $6.99 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, enquanto na técnica de fluorescência com uso do brometo de etídio (BE) foram encontradas constantes de supressão (K_{sv}) entre 0.38×10^4 e $0.77 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Os dados do dicroísmo circular demonstraram que a maioria dos derivados não alteram significativamente a estrutura secundária do ctDNA. Estudos de viscosidade revelaram que nenhum dos compostos foi capaz de alterar expressivamente a viscosidade relativa do ctDNA, em comparação com a sonda intercalante BE. Mediante os resultados obtidos, pode-se prever que os compostos interagem com o ctDNA via ligação aos sulcos. Nas análises de interação com a BSA foram encontrados diferentes efeitos espectroscópicos e as constantes de afinidade (K_b) calculadas na absorção UV-vis situaram-se entre 1.12×10^5 e $1.60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Pela técnica de emissão fluorescente foram calculadas constantes de supressão (K_{sv}) entre 3.28×10^4 e $11.06 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Tais resultados indicam que a inserção dos substituintes propostos contribuíram no processo de interação dos derivados com as biomacromoléculas utilizadas neste trabalho, principalmente os portadores do anel benzênico, provido ou não de um halogênio na posição *para*, e do bromo na posição 5 do anel indólico.

Palavras-chaves: BSA. Câncer. DNA. Indol-tiazólicos. Interação. Quimioterápicos.

ABSTRACT

Compounds heterocycles have been considered a good choice in the design of molecules provided with various pharmacological actions, interacting with different therapeutic targets. In addition, they are relatively easy to be modified with additional substituents, qualifying them as excellent starting points for the development of antineoplastic drugs, for example. DNA is considered a relevant molecular target in several therapeutic investigations whose efficacy is dependent on the degree of affinity of a given ligand with this biomolecule. In this context, it is essential to know the binding capacity of drugs and prototypes with plasma proteins such as serum albumin, whose degree of affinity may determine its bioavailability and efficacy. In view of this, this work has as objective to synthesize and characterize ten new indole-thiazolic derivatives, as well as to evaluate their capacity of interaction with ctDNA and bovine serum albumin (BSA), through different spectroscopic techniques and viscosity studies. The proposed compounds were successfully synthesized and characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR, IR and MS techniques. In the analysis of the interaction with ctDNA, different spectroscopic effects were observed and the affinity constants (K_b) calculated by the UV-vis absorption method were between 8.52×10^4 and 6.99×10^6 , whereas in the fluorescence technique using BE, (K_{sv}) between 0.38×10^4 and 0.77×10^4 . By the DC technique it was observed that most of the derivatives did not significantly alter the secondary structure of the ctDNA. Viscosity measurements revealed that none of the compounds was able to significantly alter the relative viscosity of the ctDNA as compared to the BE intercalating probe. From the results obtained, the compounds can be predicted to interact with ctDNA via groove binding. In the analysis of interaction with the BSA different spectroscopic effects were found and the affinity constants (K_b) calculated in the UV-vis absorption were between 1.12×10^5 and 1.60×10^5 . The suppressive constants (K_{sv}) between 3.28×10^4 and 11.06×10^4 . These results indicate that the insertion of the proposed substituents was crucial in the process of interaction of the derivatives with the biomacromolecules used in this work, especially those bearing the benzene ring, with or without a halogen in the para position. of bromine at position 5 of the indole ring.

Keywords: BSA. Cancer. Chemotherapeutic. DNA. Indol-thiazolics. Interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de fármacos antitumorais com porções heterocíclicas indol-tiazólicas.....	23
Figura 2 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Serafim et al., (2018).....	24
Figura 3 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Silva et al., (2018).....	25
Figura 4 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Oliveira et al., (2016).....	25
Figura 5 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Moraes et al., (2018).....	26
Figura 6 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Lafayette et al., (2017).....	26
Figura 7 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por Oliveira et al., (2017).....	27
Figura 8 – Estruturas químicas de heterociclos estudados por pesquisadores do LQIT.....	28
Figura 9 – Estruturas químicas de substâncias naturais portadoras do núcleo indol.....	29
Figura 10 – Atividades polifarmacológicas do núcleo indol.....	30
Figura 11 – Estruturas químicas do anel indólico e seus derivados.....	31
Figura 12 – Estruturas químicas de alcaloides e fármacos antitumorais portadores do núcleo indol.....	32
Figura 13 – Estrutura química do núcleo tiazol.....	33
Figura 14 – Estruturas químicas de fármacos antitumorais providos do núcleo tiazol.....	35
Figura 15 – Estruturas químicas de protótipos antineoplásicos providos com os núcleos indol e tiazol.....	36
Figura 16 – Estruturas químicas de antitumorais usados na clínica.....	38
Figura 17 – Estruturas químicas de fármacos que interagem com o DNA.....	39
Figura 18 – Modos de interação entre um ligante e o DNA.....	40
Figura 19 – Estruturas químicas de agentes intercalantes do DNA.....	41
Figura 20 – Estruturas químicas de ligantes via sulcos do DNA e por ligação eletrostática....	42
Figura 21 – Estruturas químicas de ligantes cujo modo de interação com o DNA foi estabelecido, complementarmente, pela técnica de absorção UV-vis.....	43
Figura 22 – Estruturas químicas de sondas fluorescentes intercalantes e ligantes aos sulcos do DNA.....	44

Figura 23 – Estruturas químicas de ligantes cujo modo de interação com o DNA foi estabelecido, complementarmente, através da utilização de sondas fluorescentes.....	45
Figura 24 – Estruturas químicas de ligantes cujo modo de interação com o DNA foi estabelecido, complementarmente, pela técnica de dicroísmo circular.....	46
Figura 25 – Efeitos espectroscópicos: hipocromismo, hipercromismo, hipsocromismo e batocromismo.....	47
Figura 26 – Estruturas químicas de ligantes cujo modo de interação com o DNA foi estabelecido, complementarmente, pela técnica hidrodinâmica de viscosidade.....	48
Figura 27 – Homologia entre a HSA e a BSA.....	50
Figura 28 – Estruturas tridimensional da BSA e seus residuais de triptofano intrínsecos.....	51
Figura 29 – Estruturas químicas de ligantes que interagem com a BSA.....	52
Figura 30 – Espectro de RMN ¹ H do composto JF-251.....	65
Figura 31 – Espectro de RMN ¹³ C do composto JF-251.....	65
Figura 32 – Espectro de infravermelho do composto JF-251.....	66
Figura 33 – Espectro de massas do composto JF-251.....	67
Figura 34 – Espectro de absorção UV-Vis do derivados LQIT/JF-256 na ausência e na presença do ctDNA.....	79
Figura 35 – Gráfico de dispersão da intensidade de fluorescência relativa dos derivados indol-tiazólicos ligados ao complexo BE-ctDNA.....	86
Figura 36 – Espectro de supressão fluorescente do complexo BE-ctDNA na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 252 e 256.....	87
Figura 37 – Espectro de DC do ctDNA na ausência e na presença de todos os derivados indol-tiazólicos.....	91
Figura 38 – Gráfico comparativo das alterações na viscosidade relativa do ctDNA livre e conjugado a todos os derivados indol-tiazólicos e ao BE.....	95
Figura 39 – Espectros de absorção UV-Vis da BSA livre e conjugada aos derivados LQIT/JF's 257 e 258.....	100
Figura 40 – Espectros de supressão fluorescente da BSA livre e conjugada aos derivados LQIT/JF-256.....	106

Figura 41 – Gráfico de dispersão da intensidade de emissão fluorescente dos derivados indolizínicos ao serem conjugados à BSA.....	109
Figura A1 – Espectros de absorção do LQIT/JF-249, LQIT/JF-253, LQIT/JF-250 e LQIT/JF-254 na presença de quantidades crescentes do ctDNA.....	137
Figura A2 – Espectros de absorção do LQIT/JF-251, LQIT/JF-255, LQIT/JF-257 e LQIT/JF-258 na presença de quantidades crescentes do ctDNA.....	138
Figura A3 – Espectros de absorção do LQIT/JF-252 na presença de quantidades crescentes do ctDNA.....	139
Figura A4 – Espectros de emissão do BE livre e ligado ao ctDNA na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254.....	140
Figura A5 – Espectros de emissão do BE livre e ligado ao ctDNA na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 255, 257 e 258.....	141
Figura A6 – Espectros de DC do ctDNA na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254.....	142
Figura A7 – Espectros de DC do ctDNA na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 252, 255, 256, 257 e 258.....	143
Figura B1 – Espectros de absorção da BSA na presença de quantidades crescentes dos LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254.....	144
Figura B2 – Espectros de absorção da BSA na presença de quantidades crescentes dos LQIT/JF's 251, 252, 255 e 256.....	145
Figura B3 – Espectros de supressão fluorescente da BSA na ausência e na presença e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254.....	146
Figura B4 – Espectros de supressão fluorescente da BSA na ausência e na presença e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 255, 257 e 258.....	147
Figura B5 – Espectros de supressão fluorescente da BSA na ausência e na presença e na presença do derivado LQIT/JF's 252.....	148

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Diversidade das atividades farmacológicas do núcleo tiazol.....	34
Esquema 2 – Mecanismo de formação dos derivados indol-tiazólicos.....	61
Esquema 3 – Mecanismo de formação do composto intermediário tiossemicarbazida LQIT/LT-34.....	62
Esquema 4 – Mecanismo de formação dos compostos intermediários tiossemicarbazonas LQIT/LT-50 e LT-51.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações espectroscópicas de absorção UV-Vis dos compostos LQIT/JF's livres e conjugados ao ctDNA.....	76
Tabela 2 – Informações espectroscópicas de emissão fluorescente dos compostos LQIT/JF's livres e na presença do complexo BE-ctDNA	84
Tabela 3 – Informações espectroscópicas da interação dos compostos LQIT/JFs conjugados ao ctDNA pela técnica de dicroísmo circular.....	90
Tabela 4 – Informações espectroscópicas de absorção UV-Vis da BSA livre e conjugada com os derivados LQIT/JF's	98
Tabela 5 – Informações espectroscópicas de emissão fluorescente da BSA livre e conjugada aos compostos LQIT/JF's	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo geral.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 HETEROCÍCLICOS COMO SCAFOLLDS PARA NOVOS QUIMIOTERÁPICOS ...	22
2.1.1 Compostos heterocíclicos	22
2.1.2 O núcleo indol	28
2.1.3 O núcleo tiazol.....	33
2.2 O DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER.....	37
2.3 INTERAÇÕES COM A SOROALBUMINA PARA ESTUDOS DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS	48
3 METODOLOGIA.....	53
3.1 SEÇÃO QUÍMICA	53
3.1.1 Materiais e equipamentos.....	53
3.1.2 Procedimentos experimentais.....	53
3.1.2.1 Obtenção do intermediário tiossemicarbazida (LQIT/LT-34).....	53
3.1.2.2 Obtenção dos intermediários tiossemicarbazonas (LQIT/LT-50 e LQIT/LT-51).....	54
3.1.2.3 Obtenção dos derivados indol-tiazólicos (LQIT/JF's)	54
3.2 SEÇÃO BIOLÓGICA	55
3.2.1 Estudos de interação dos derivados indol-tiazólicos com ctDNA e BSA.....	55
3.2.1.1 Materiais e equipamentos	55
3.2.1.2 Estudos de interação com o ctDNA.....	55
3.2.1.2.1 <i>Preparo da solução de ctDNA.....</i>	<i>55</i>
3.2.1.2.2 <i>Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....</i>	<i>56</i>
3.2.1.2.3 <i>Estudos fluorescentes de deslocamento do Brometo de Etídio (BE) com os compostos-testes</i>	<i>57</i>
3.2.1.2.4 <i>Espectroscopia de dicroísmo circular.....</i>	<i>57</i>
3.2.1.2.5 <i>Estudos de medição da Viscosidade.....</i>	<i>58</i>
3.2.1.3 Estudos de interação com a BSA.....	58

3.2.1.3.1 Preparo da solução de BSA.....	58
3.2.1.3.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	59
3.2.1.3.3 Espectroscopia de emissão fluorescente	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 SEÇÃO QUÍMICA.....	61
4.1.1 Caracterização estrutural dos derivados indol-tiazólicos.....	64
4.1.1.1 Dados espectroscópicos, espectrométricos e físico-químicos dos derivados indol-tiazólicos.....	67
4.1.1.1.1 (E) -2 - (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) - 4-metil-3- (naftalen-1-il) - 2,3-di-hidrotiazol-5-carboxilato (JF-249).....	67
4.1.1.1.2 (E) -2 - ((E) -2 - (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato (JF-250).....	68
4.1.1.1.3 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -4- (4-bromofenil) -3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol (JF-251).....	69
4.1.1.1.4 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4-fenil-2,3-di-hidrotiazol (JF-252).....	69
4.1.1.1.5 (E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -4-metil-3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol -5-carboxilato (JF-253)	70
4.1.1.1.6 (E) -2- ((E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4- oxotiazolidin-5-ilideno) acetato (JF-254).....	71
4.1.1.1.7 (E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno)-hidrazinilideno) -4- (4-bromofenil) -3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol (JF-255).....	72
4.1.1.1.8 (E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4-fenil-2,3-di-hidrotiazole (JF-256)	73
4.1.1.1.9 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -4- (4-clorofenil) -3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol (JF-257).....	73
4.1.1.1.10 (E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -4- (4-clorofenil) -3- (naftalen-1-il) -2, 3-di-hidrotiazol (JF-258).....	74
4.2 SEÇÃO BIOLÓGICA	74
4.2.1 Estudos espectroscópicos de interação com o ctDNA.....	74
4.2.1.1 Ensaios espectroscópicos de absorção UV-vis.....	74
4.2.1.2 Ensaios espectroscópicos de emissão fluorescente	82
4.2.1.2.1 Estudos de competição com o brometo de etídio (BE).....	82

4.2.1.3 Ensaio espectroscópico de dicroísmo circular.....	89
4.2.1.4 Estudos hidrodinâmicos de Viscosidade	94
4.2.2 Estudos espectroscópicos de interação com a soroalbumina bovina (BSA).....	97
4.2.2.1 Ensaio espectroscópico de Absorção UV-vis.....	97
4.2.2.2 Ensaio espectroscópico de supressão da emissão fluorescente	103
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
6 PERSPECTIVAS	114
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICE A – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS COM O CTDNA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ABSORÇÃO UV-VIS, FLUORESCÊNCIA E DC.....	137
APÊNDICE B – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS COM A BSA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA.....	144
APÊNDICE C – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY.....	149

1 INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos são planejados, sintetizados e avaliados visando a descoberta de novos agentes terapêuticos que incluem aqueles com atividade antitumoral devido à ocorrência de uma interação com diferentes alvos moleculares, por exemplo, o DNA (ASADI et al., 2018; ABDEL-MAKSOUUD et al., 2018). Apesar do rápido desenvolvimento na área de diagnóstico, o desenvolvimento de novas terapêuticas contra o câncer é uma tarefa complexa em razão das sofisticadas vias biológicas que contribuem para a progressão da doença (ALTINTOP et al., 2018; ABDEL-MAKSOUUD et al., 2018). Em virtude disto, a química medicinal têm desenvolvido e avaliado vários agentes anticâncer, mas a maioria deles são insuficientes para o tratamento desta doença por causa de sua falta de especificidade em relação às células cancerosas e por seu alto risco de toxicidade para as células normais. Devido a isso, a pesquisa farmacêutica está focada na descoberta de agentes antineoplásicos mais seletivos e menos tóxicos (PEARCE, 2017).

Investigações sobre a interação de fármacos ou protótipos de medicamentos com o DNA têm sido realizadas no intuito de compreender o seu mecanismo de ação a nível molecular. Esta biomolécula é o alvo intracelular primário de medicamentos anticâncer, uma vez que o seu mecanismo de ação inclui o da divisão celular, além de serem capazes de afetar a replicação e a transcrição, induzindo a morte celular e apoptose, evidenciando a relevância da elucidação dos mecanismos de efeitos significativos dos compostos sobre as propriedades estruturais e físicas do DNA, no desenho de novos candidatos a fármacos (EL-NAKKADY et al., 2012; GUPTA et al., 2017; TIAN et al., 2017; ALIZADEH et al., 2018; BHATTACHARJEE et al., 2018).

Ainda nesse contexto, é relevante conhecer os mecanismos de interação entre fármacos e candidatos à fármacos com proteínas plasmáticas, a fim de se compreender suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. A albumina sérica bovina (BSA) é constantemente usada como um modelo de substituição da albumina sérica humana (HSA) para diversos estudos, devido à sua alta semelhança estrutural com a HSA, além de sua fácil disponibilidade e menor custo, posto que informações envolvendo interação com proteínas plasmáticas têm sido veementemente utilizadas em terapias direcionadas para prevenir, diagnosticar e tratar doenças, sendo este um dos principais focos de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, incluídos os antineoplásicos (XIE et al., 2015; SHAHRAKI; SHIRI; MANSOURI-TORSHIZI, 2016; NASKAR et al., 2017; ROY et al.,

2017; CANOVIC et al., 2017; GUO et al., 2017; HASANZADEH et al., 2017; XU et al., 2018, MATOS, 2018; MARTÍNEZ et al., 2018).

Estruturas heterocíclicas como o indol e o tiazol são altamente versáteis e com ampla atividade farmacológica, inclusa a ação antineoplásica. Pesquisas relatam que esses núcleos interagem com o DNA, alterando a estrutura, função e estabilidade, podendo modular vários processos celulares-chaves como a replicação ou pela atividade inibitória de enzimas importantes à topologia do DNA, como as topoisomerases (EL-NAKKADY et al., 2012; LAFAYETTE et al., 2017; SINGH, 2014; SARKAR; BHATTACHARJEE; BHADRA, 2016; GUPTA et al., 2017; SINGLA et al., 2017; CARVALHO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017). Ademais, estudos têm sido realizados investigando a inserção de diversos grupos químicos ao anel tiazol e seus derivados, no intuito de potencializar, reciprocamente, sua ação farmacológica, como é o caso do núcleo indol, cujas atividades farmacológicas são, muitas vezes, aprimoradas quando uma mesma estrutura química é portadora de ambos os citados núcleos, atuando no fortalecimento, por exemplo, da atividade antitumoral (SOLOMON; HU; LEE, 2009; RAMSHID et al., 2010; PARRINO et al., 2015; O'DEA et al., 2018).

Diante das evidências que apontam a relevância e as distintas atividades biológicas para os diferentes tipos de derivados indol-tiazólicos, este trabalho se objetiva em realizar a síntese e caracterização de novos compostos derivados indol-tiazólicos, e avaliar *in vitro* sua capacidade de interação com o ctDNA e com a BSA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Desenvolver novos derivados indol-tiazólicos e determinar o perfil de interação molecular com ctDNA e albumina.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar novos compostos derivados indol-tiazólicos, empregando como substituintes diferentes aldeídos aromáticos;
- ✓ Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados através das técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^1H e RMN ^{13}C), infravermelho (IV) e espectrometria de massas (MS);
- ✓ Avaliar a capacidade dos compostos sintetizados de interagir com o ctDNA por meio de estudos de absorção UV-vis, fluorescência, dicroísmo circular e viscosidade;
- ✓ Determinar o perfil de interação dos compostos com a albumina sérica bovina (BSA) por meio de espectroscopia de absorção UV-vis e fluorescência.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HETEROCÍCLICOS COMO SCAFOLLDS PARA NOVOS QUIMIOTERÁPICOS

2.1.1 Compostos heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos contêm átomos de carbono como membros do anel e pelo menos um outro elemento (como nitrogênio, oxigênio e enxofre) e desempenham papel vital no metabolismo de todos os seres vivos, pois são utilizado em quase todas as fases dos muitos processos bioquímicos necessários para sustentar a vida. São considerados como uma ponte entre as ciências químicas e biológicas, o que tem atraído substancialmente a atenção de pesquisadores, gerando uma quantidade significativa de trabalhos contemporâneos em todo o mundo (AGRAWAL; MISHRA, 2018; PEARCE, 2017; TRIPATHI et al., 2014).

Devido aos heterociclos serem tão prevalentes na natureza, eles se tornaram importantes no desenho e planejamento de fármacos, como os antitumorais, uma vez que existe a necessidade da síntese de novos agentes antineoplásicos potencialmente mais eficazes e detentores de um maior perfil de segurança devido aos disponíveis apresentarem efeitos colaterais tóxicos e desenvolvimento de resistência à sua ação (MABKHOT et al., 2018). Como muitos sítios de ligações de enzimas são predispostos a interagir com porções heterocíclicas, os heterociclos são uma boa escolha ao projetar moléculas que irão interagir com alvos e interromper os caminhos biológicos que conduzem à progressão do câncer, os quais são, muitas vezes, alvos para tais terapias (DUA et al., 2011; LEONI et al., 2017; MARCO-CONTELLES; SORIANO, 2011; NEPALI et al., 2014).

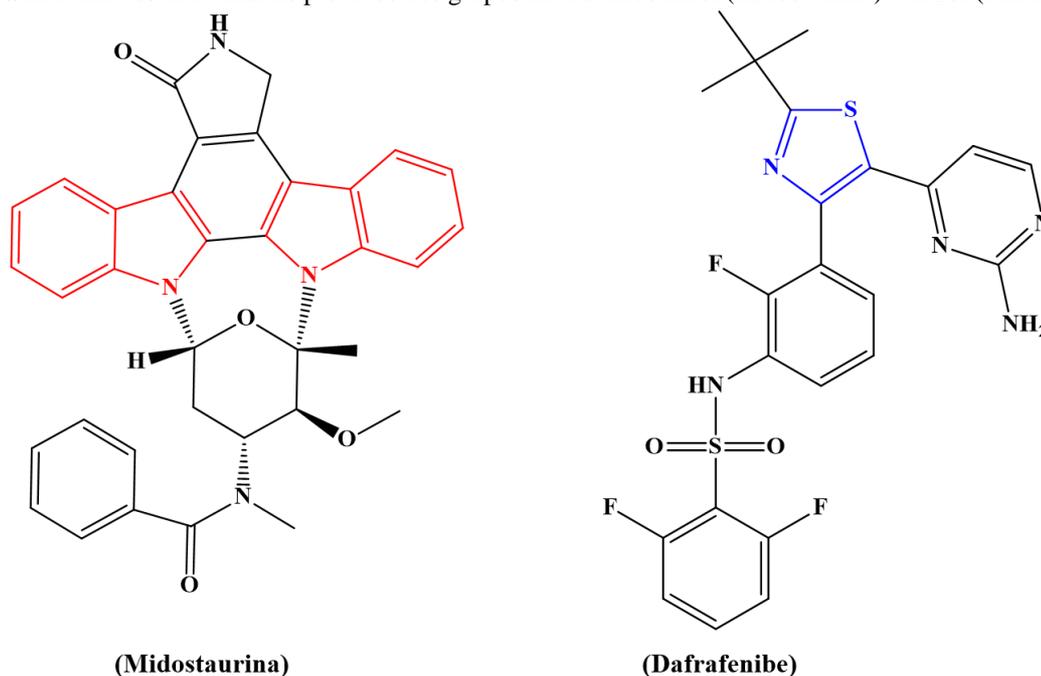
Além disso, o fato dos anéis heterocíclicos poderem ser modificados com substituintes adicionais lhes permitem abarcar uma ampla área de espaço químico, qualificando-os como excelentes pontos de partida para desenvolvimento de fármacos. Como resultado desses fatores, estruturas heterocíclicas há muito tempo desempenham um papel fundamental no combate ao câncer. De fato, 65% dos fármacos anticancerígenos existentes portadores de estruturas heterocíclicas foram aprovado para sua comercialização pela FDA entre 2010 e 2015, afora a produção de candidatos a medicamentos como antibióticos, antitumorais, anti-inflamatório, antivirais, antimicrobianos, antifúngicos e antidiabéticos (FARES et al., 2017; MANJAL et al., 2017; PEARCE, 2017).

Heterocíclicos à base de nitrogênio são de particular importância no desenho de

medicamentos antitumorais, apresentando-se em quase três quartos dos agentes antitumorais heterocíclicos aprovados pelo FDA entre 2010 e 2015. De todos os heterociclos nitrogenados, os indóis estão entre os mais valiosos, com pesquisas mostrando sua capacidade de induzir a morte celular em diversas linhagens celulares tumorais. Nas últimas décadas tem sido reportado que o indol e seus derivados são capazes de modular vias biológicas importantes na progressão do câncer, como por exemplo o indolcarbazol midostaurina (Figura 1), inibidor de quinases, aprovado pelo FDA para o tratamento da leucemia mielóide aguda, em abril de 2017 (CIVENNI et al., 2016; GOMTSYAN, 2012; MARTINS et al., 2015; PEARCE, 2017; SAYED et al., 2015; SHERER; SNAPE, 2015).

Outro elemento bastante prevalente nos heterociclos é o enxofre, um componente chave em vários cofatores de vitaminas, açúcares e ácidos nucleicos. Uma vez conhecida a significância do enxofre em sistemas biológicos, heterocíclicos contendo este elemento têm recebido atenção no desenvolvimento de fármacos antitumorais muito parecido com a importância dada aos nitrogenados. Para exemplificar, temos a estrutura do tiazol e seus derivados, cuja importância no tratamento do câncer tem sido demonstrada mediante a realização de pesquisas nos últimos anos. O dabrafenibe (Figura 1) é um medicamento antitumoral portador do tiazol que foi aprovado pelo FDA em 2013, para uso em pacientes com melanoma associado com a versão mutada do gene BRAF (SAID; ELSHIHAWY, 2014; WELSH; CORRIE, 2015).

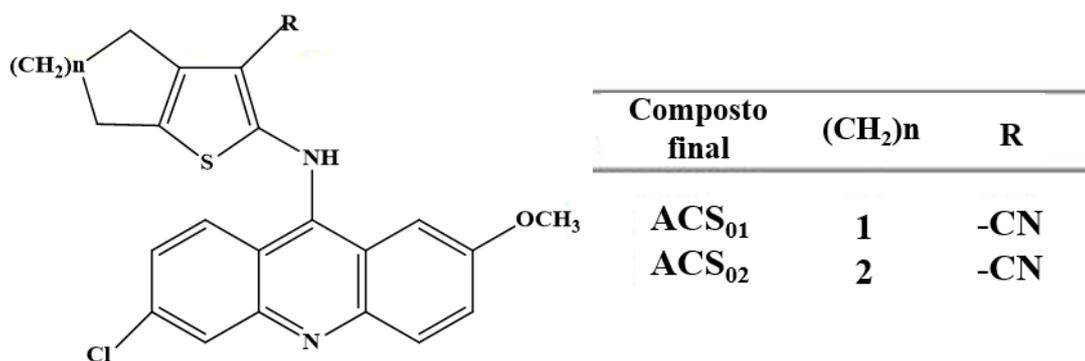
Figura 1. Fármacos antitumorais providos dos grupos heterociclos indol (midostaurina) e tiazol (dafrafenibe).



Em parceria com vários centros de pesquisa, o Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), situado no Departamento de Antibióticos da UFPE, tem produzido novos compostos orgânicos sintéticos heterocíclicos e investigado variadas atividades farmacológicas, mecanismos de ação e propriedades de interação com biomacromoléculas de interesse científico, como por exemplo, o ctDNA. Alguns destes estudos serão citados a seguir.

No que diz respeito à atividade antiparasitária, Serafim et al. (2018) sintetizaram oito compostos com porções tiofênicas e acridínicas, dos quais dois derivados (ACS₀₁ e ACS₀₂) apresentaram significativa ação leishmanicida *in vitro* contra cepas de *Leishmania (L.) amazonensis*, alcançando valores de IC₅₀ respectivos de $9,60 \pm 3,19$ e $10,95 \pm 3,96$ μM , conferindo um melhor desempenho mesmo até quando comparado aos fármacos clínicos usados na referida pesquisa (Figura 2).

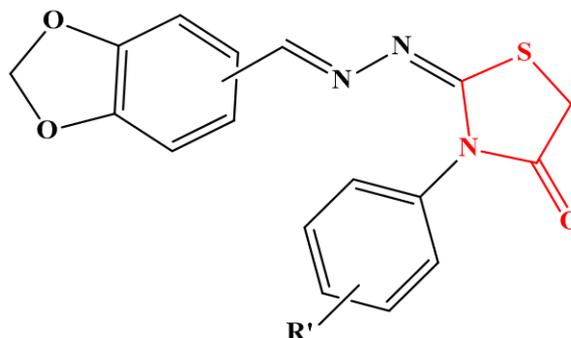
Figura 2. Melhores compostos com atividade leishmanicida da série testada por Serafim et al., (2018).



Fonte: Adaptado de Serafim et al., (2018).

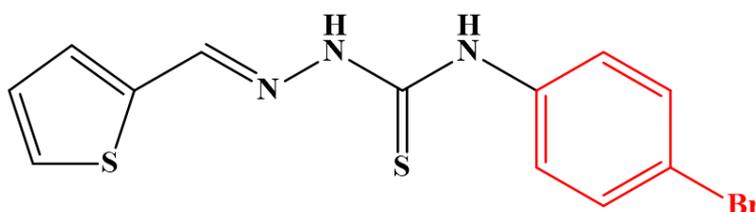
Silva et al. (2018) sintetizaram doze novos derivados benzodioxois, portando o núcleo tiazolidinona nas suas estruturas, dos quais o composto de número 12, portador da porção benzodioxol na posição 4 e do substituinte 4-bromo ligado ao benzeno, apresentou melhor resultado esquistossomicida *in vitro* contra as formas adultas do *S. mansoni*, pois promoveu 100% de mortalidade dos vermes nas primeiras 72 h de exposição na concentração de 100 μM e 83,3% na concentração de 50 μM , além de causar redução significativa da mobilidade e mudanças no tegumento de vermes adultos machos e fêmeas, incubados por 24 h com o mesmo composto, nas mesmas concentrações supracitadas (Figura 3).

Figura 3. Composto mais promissor com atividade esquistossomicida da série testada por Silva et al., (2018).



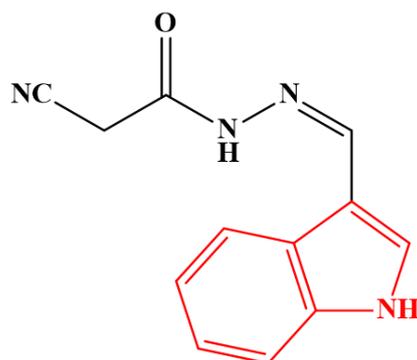
Relativo à atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, Oliveira et al. (2016) sintetizaram e avaliaram as ações anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* de um derivado tiossemicarbazônico substituído, com as porções 2-tiofeno e 4-bromofenil situadas nas extremidades de sua estrutura molecular (Figura 4). Os resultados mostraram efeitos de antinocicepção com mecanismos periféricos. Além disso, o referido composto, codificado como BTTSC, foi capaz de atuar em duas fases de inflamação, com ênfase na fase inicial, destacando sua ação sobre a modulação dos mediadores inflamatórios como a histamina.

Figura 4. Estrutura molecular do protótipo BTTSC cuja atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foi investigada por Oliveira et al., (2016).



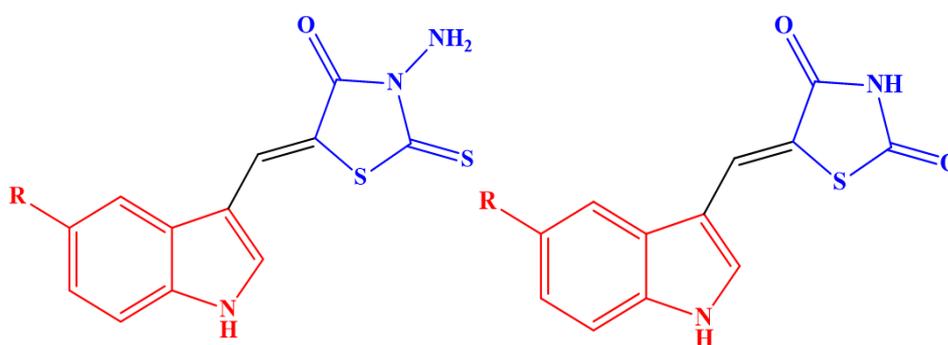
Moraes et al. (2018) realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial anti-inflamatório de dez novos derivados indólicos conjugados com o grupo N-acil-hidrazona e, entre outros achados, foi observado que o composto 3b (indol não-substituído) (Figura 5) mostrou um perfil anti-inflamatório mais elevado em relação aos demais, além de ter demonstrado também atividade inibitória seletiva para a COX-2, sendo o composto mais promissor da série.

Figura 5. Estrutura do composto mais promissor da série testada por Moraes et al., (2018), com atividade anti-inflamatória.



No que concerne à atividade antitumoral, Lafayette et al. (2017) realizaram a síntese de sete novos derivados indólicos com tiazolidinas e anéis de imidazolidina condensados com cadeias laterais, a fim de avaliar a sua capacidade de interagir com o DNA, seu potencial antiproliferativo frente a distintas linhagens celulares cancerígenas e inibição da atividade da enzima topoisomerase I humana. O composto **4c** foi o melhor no ensaio antitumoral contra linhagem de mama testada (T47D), com valor de IC_{50} menor que o controle positivo (doxorrubicina) (1,93 e 4,61 μM , respectivamente). Por outro lado, o composto **4a** foi ativo contra linhas celulares de leucemia (HL60 e K562) com o alto valor da constante de ligação ao DNA (Kb) de $5,69 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, contudo não conseguiu inibir a atividade da topoisomerase I. Os compostos 4a e 4c (ambos com indol não-substituído) estão demonstrados na Figura 6, a seguir.

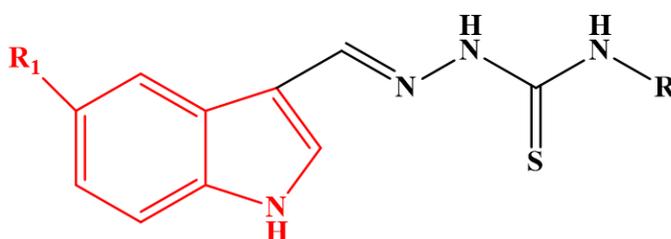
Figura 6. Estrutura dos protótipos 4a e 4c, os mais promissor da série testada por Lafayette et al. (2017).



Oliveira et al., 2017 sintetizaram nove novos derivados indólicos acoplados com porções tiazolidínicas e tiossemicarbazônicas, no intuito de averiguar a capacidade antiproliferativa frente a oito linhagens celulares tumorais. Para o composto mais potente do ensaio, foram realizados estudos adicionais avaliando a indução de morte celular, perfil do ciclo celular, interação com o ctDNA e inibição da topoisomerase II α humana. Quanto à atividade antiproliferativa, os compostos 2a-e e 3a-d mostraram valores médios de IG_{50}

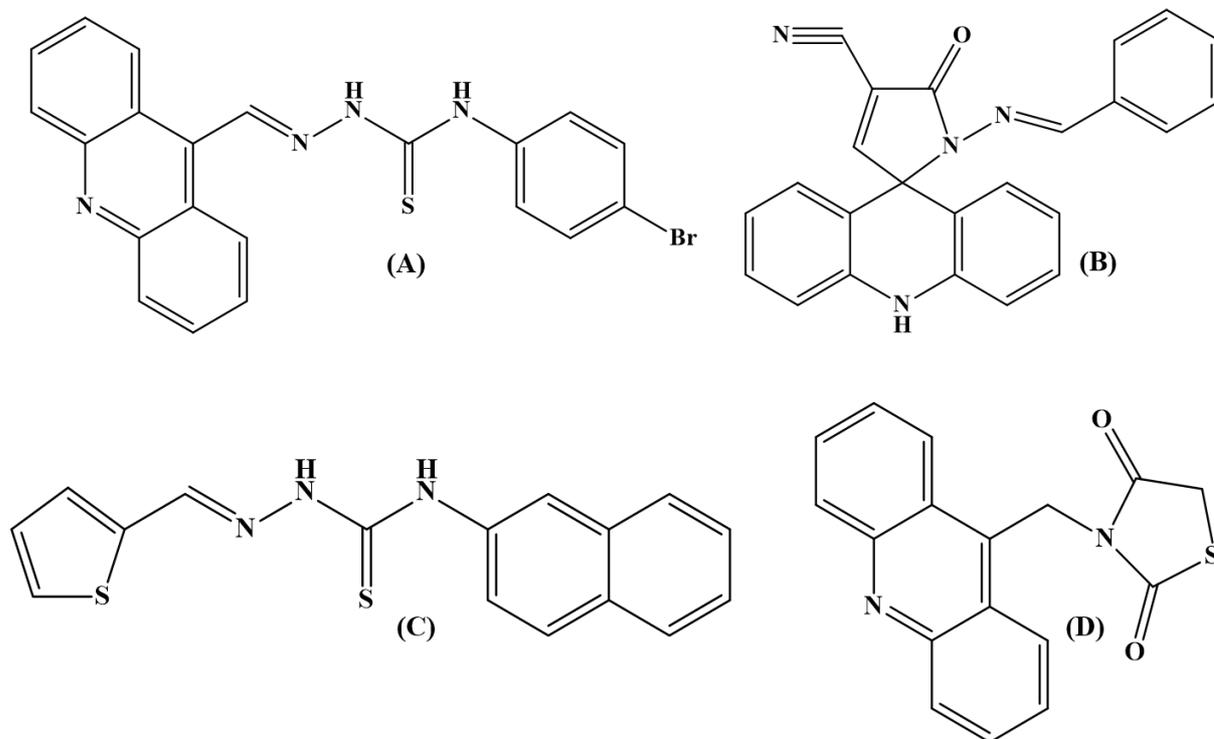
variando entre 1,1 μM (2b) - 84,65 μM (3d). O composto 2b (portador de um indol não-substituído e de um substituinte naftil na outra porção lateral) (Figura 7) foi o mais promissor, especialmente contra o adenocarcinoma colorretal (HT- 29) e células de leucemia (K562) ($\text{IG}_{50} = 0,01 \mu\text{M}$ para ambas as linhas celulares). Estudos de mecanismos demonstraram que 24 h de tratamento com o composto 2b (5 μM) foi o suficiente para induzir a exposição de resíduos de fosfatidilserina na fase G2/M em células HT-29. Além disso, o 2b (50 μM) foi capaz de interagir com o ctDNA e inibir a ação da enzima topoisomerase II α .

Figura 7. Estrutura do protótipo 2b, eleito o melhor na série testada por Oliveira et al., (2017) com atividade antiproliferativa, antitopoisomerase e com melhor interação com o DNA.



Ainda na perspectiva da avaliação do potencial antitumoral, outros estudos foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa com variados compostos sintéticos portadores de uma ou mais porções heterocíclicas, os quais apresentaram muitos resultados significativos *in vitro* e *in vivo*, através de testes antiproliferativos, de mecanismos de ação contra enzimas importantes para o processo de replicação e transcrição como as topoisomerasas ou pela sua capacidade de interação com o DNA. Diversos grupos químicos heterociclos foram utilizados nos referidos estudos, como derivados acridínicos-tiossemicarbazônicos (ALMEIDA et al., 2015), imidazacridinas e tiazacridinas (LAFAYETTE et al., 2013), espiroacridinas (ALMEIDA et al., 2016), derivados tiofênicos-tiossemicarbazônicos (OLIVEIRA et al., 2015) (Figura 8), entre outros. Tais estudos são de grande relevância científica, uma vez que demonstraram múltiplos protótipos candidatos a novos fármacos antineoplásicos.

Figura 8. Estruturas químicas de distintos protótipos heterocíclicos usados em estudos anticâncer por pesquisadores do LQIT/UFPE.



Fontes: (A) Almeida et al., (2015), (B) Almeida et al., (2016), (C) Oliveira et al., (2015), (D) Lafayette et al., (2013).

A partir desses resultados auspiciosos, é notável a importância em se continuar desenvolvendo novos agentes quimioterápicos providos dos anéis indol e tiazol, com a finalidade da obtenção de fármacos e candidatos a fármacos mais eficazes e seletivos, como as pesquisas têm indicado, especialmente, para estes grupos químicos, os quais serão discutidos a seguir.

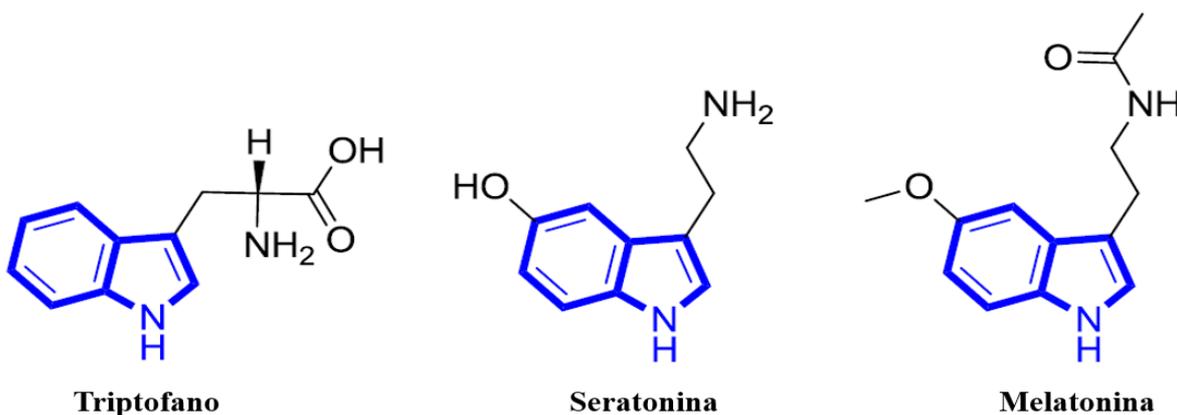
2.1.2 O núcleo indol

A estrutura indólica foi identificada pela primeira vez em 1860 por Baeyer e colaboradores e ganhou imensa popularidade como um farmacóforo em numerosas condições farmacológicas. Sua arquitetura molecular tem interessado químicos orgânicos para projetar derivados de interesse medicinal. Quimicamente, este sistema de anel heterocíclico é uma fusão de benzeno de seis membros e cinco membros do anel pirrol (SAUNDANE; VIJAYKUMAR; VAJJINATH, 2013; TABER; TIRUNAHARI, 2011; ZHANG; QU; NIU, 2016). Seu núcleo eletrofílico tem sido bem descrito na literatura, colaborando com a síntese

de vários derivados indólicos via adição e cicloadição nucleofílicos (BANDINI, 2013).

O indol é um heterociclo nitrogenado onipresente, um fitoconstituinte proeminente em várias espécies de plantas e é produzido por uma variedade de bactérias. A ocorrência natural deste núcleo pode ser devida à sua presença no aminoácido "triptofano" (Figura 9) (INMAN; MOODY, 2013). Os metabólitos bacterianos derivados de indol são o resultado da biossíntese via acoplamento de triptofano com outros aminoácidos. Por esta razão, é um constituinte de perfumes florais, alcaloides indólicos farmacologicamente ativos, fármacos, materiais funcionais, agroquímicos e de alguns hormônios animais, como serotonina e melatonina (Figura 9) (BIRMANN et al., 2018; KARIMABAD et al., 2017; NARSIMHA et al., 2016; SHAIKH et al., 2018; SINGH et al., 2014).

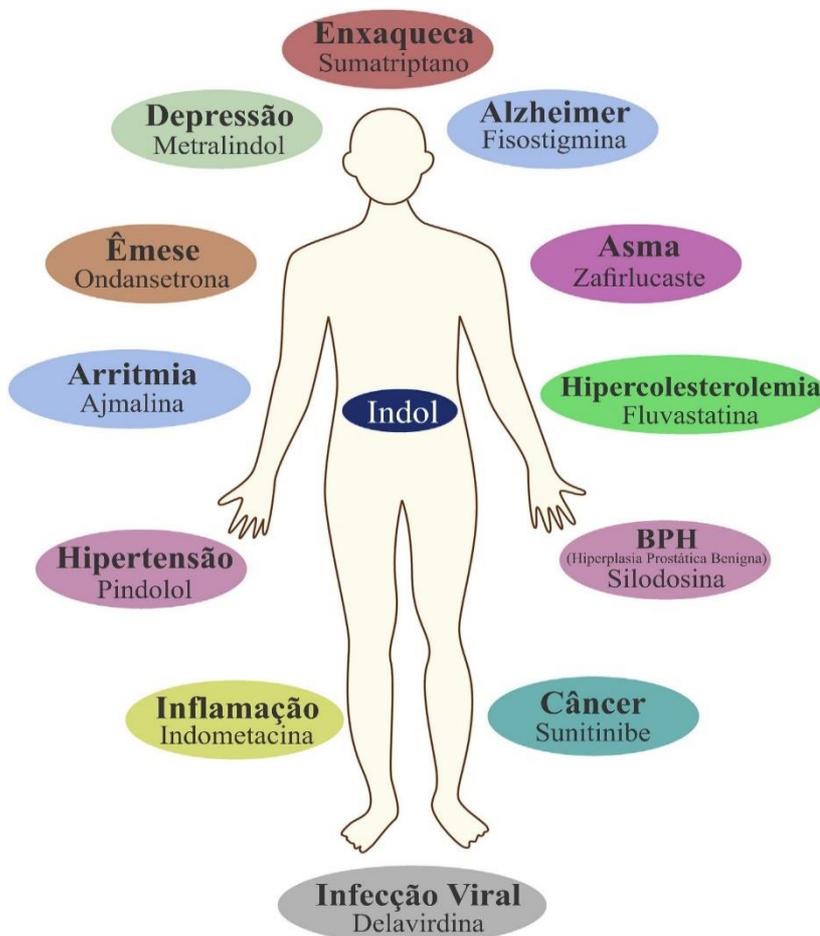
Figura 9. Substâncias naturais portadoras do núcleo indol em sua estrutura molecular.



Fonte: Adaptado de Chadha e Silikari (2017).

Diversos alcaloides indólicos são utilizados para atividades terapêuticas como a reserpina, usada como antihipertensivo e tranquilizante, a ajmalina para atividade antiarrítmica, fisostigmina para glaucoma e doença de Alzheimer ou o ácido indol-3-acético (AIA), um hormônio de crescimento vegetal. As atividades farmacológicas de derivados contendo o núcleo indólico incluem atividade anticâncer, imunomodulação, vasodilatação, hipertensão, depressão, distúrbios sexuais, esquizofrenia, HIV, doença de Parkinson, Doença de Huntington, infecções virais, β -bloqueio, receptores opióides ou analgésicos (Figura 10). Alguns agentes farmacêuticos que possuem a fração indol em sua constituição são: ondansetona, zafirlucast, sumatriptano, tadalafil, rizatriptano, fluvastatina, indoxol, tenidap, etodolaco, indometacina e LSD (AL-SHEMARY, 2017; CHADHA; SILAKARI, 2017; HE et al., 2017; LYU et al., 2017; RATHER et al., 2017; YURTTAS et al., 2017).

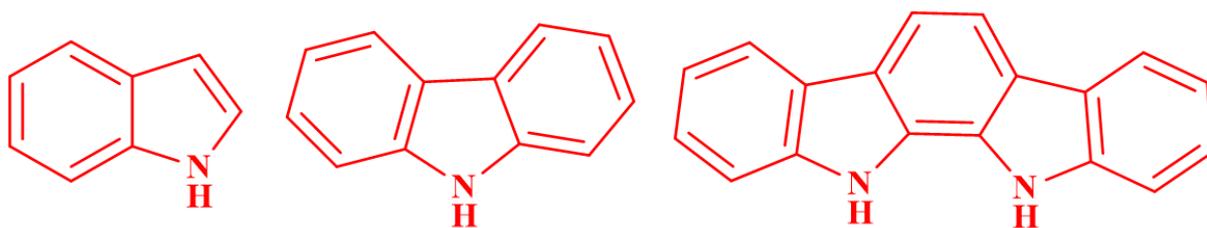
Figura 10. Exemplos das atividades polifarmacológicas do núcleo indol, com seus respectivos fármacos.



Fonte: Adaptado de Chadha e Silakari (2017).

Ademais, é bem reportado que o núcleo indólico, sobretudo, quando portador de variadas substituições, torna-se um “bloco de construção” adequado para muitos reagentes terapêuticos, conferindo a tal entidade química e a seus derivados operantes diversas ações farmacológicas (BISWAL et al., 2012; KAUSHIK et al., 2013; KELLY et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Os indoís e seus derivados, como o carbazol e o indolcarbazol (Figura 11), são altamente versáteis e têm sido amplamente usados na síntese de fármacos antineoplásicos importantes aprovadas pelo FDA (VITAKU; SMITH; NJARDARSON, 2014). Alguns exemplos são os alcaloides indólicos: vincristina, vinblastina, vinorelbina e vindesina, bem como fármacos já usados na clínica no tratamento contra o câncer: semaxanibe, sunitinibe, osimetinibe, alectinibe e panobinostate.

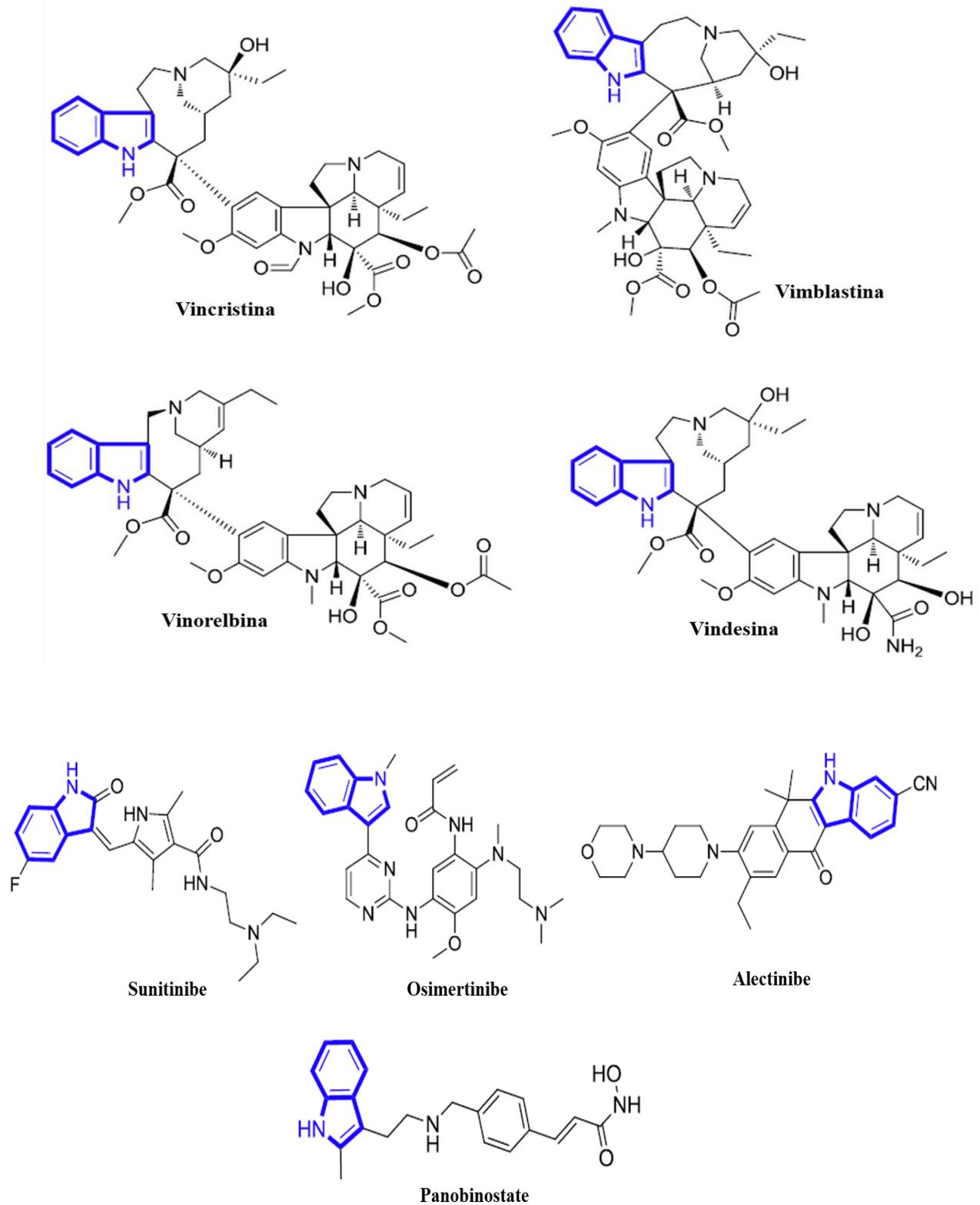
Figura 11. Da esquerda para a direita: o núcleo indol e seus derivados carbazol e indolcarbazol.



Fonte: O autor.

As estruturas moleculares de alguns desses alcaloides e fármacos já comercializados e usados no combate ao câncer são mostrados na Figura 12, a seguir.

Figura 12. Alcaloides e fármacos antitumorais portadores do anel indólico utilizados na clínica.

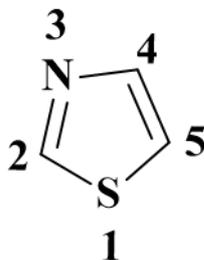


Fonte: Adaptado de Chadha e Silikari (2017).

2.1.3 O núcleo tiazol

Atualmente, algumas estruturas heterocíclicas têm ganhado interesse científico, pois têm apresentado valiosas atividades biológicas, como é o caso do tiazol, um importante fragmento de moléculas naturalmente existentes como a tiamina (vitamina B1), pirofosfato de tiamina (PPT, uma coenzima importante na respiração no ciclo de Krebs), epotilonas, carboxilase e a grande família de antibióticos macrocíclicos como os tiopeptídicos, tiostrepton e micrococcina P1 (CANKILIÇ; YURTTAŞ, 2017; DONDONI, 2010; TOCHE; DESHMUKH, 2017). A primeira síntese do anel tiazólico ocorreu no final do século XIX por Rudolf Hantzsch, em 1887. Trata-se de um composto orgânico aromático, heterocíclico que tem uma estrutura de anel com cinco membros, incluindo um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre, cuja fórmula molecular é C_3H_3NS (Figura 13) (KAUR; GOYAL, 2018; TEKALE et al., 2018).

Figura 13. Estrutura química molecular do núcleo tiazol.



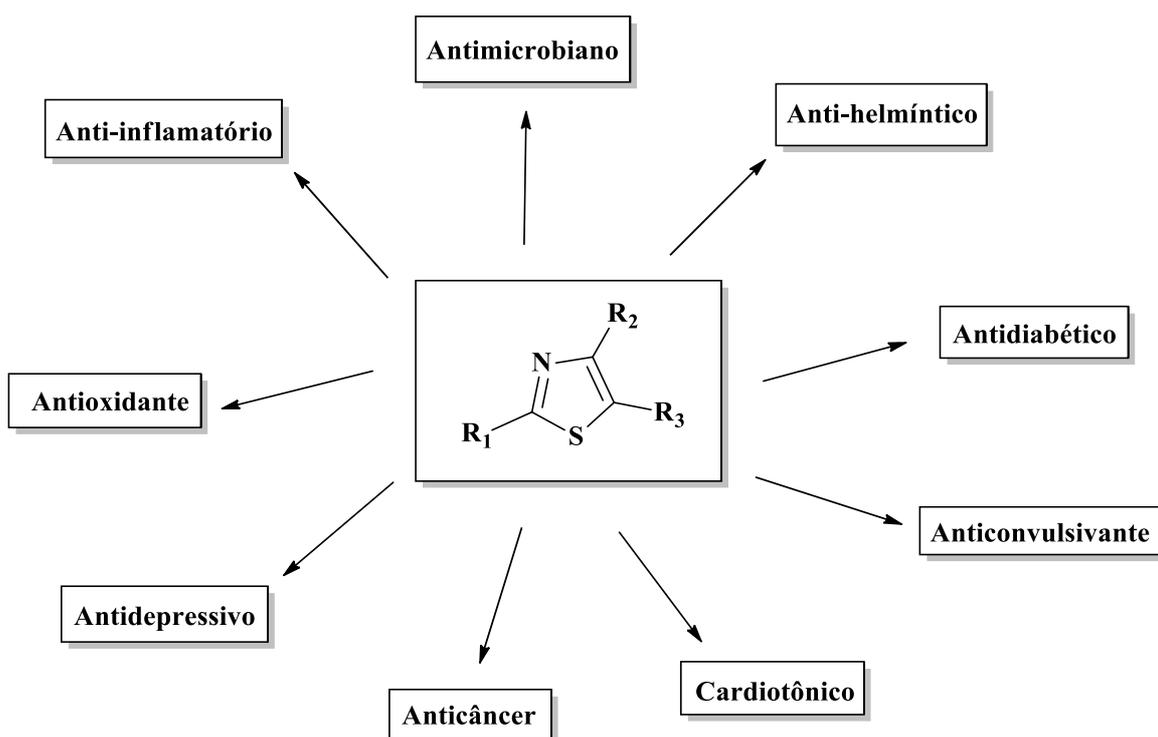
Fonte: O autor.

Os tiazóis têm sido reconhecidos por desempenharem um papel essencial na química medicinal, devido a sua importância terapêutica e são considerados como uma chave relevante na descoberta de muitas moléculas potencial e biologicamente ativas já usadas em tratamentos medicamentosos como o sulfatiazol (antimicrobiano), tiabendazol (anti-helmíntico e fungicida), ritonavir (anti-retroviral), cefdinir (antibiótico bactericida da classe das cefalosporinas), penicilina (antibiótico bactericida do grupo dos beta-lactâmicos), niridazol (esquistossomicida), talipexol (tratamento para a doença de Parkinson) e simeprevir (tratamento para a hepatite C) (KUBBA; RAHIM, 2018; MOHAREB; ABDALLAH; AHMED, 2017; OUF et al., 2017).

Por causa de sua importância biológica e facilidade da síntese do anel, compostos contendo tiazol têm sido amplamente estudados (SILVA et al., 2017; YADLAPALLI et al.,

2013; YURTTAS et al., 2015). Seus derivados combinados com vários heterocíclicos foram relatados com um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas (Esquema 1), como anti-HIV (MELEDDU et al., 2016), antioxidante (REDDY et al., 2015), diurético (AYATI et al., 2015), antituberculose (LU et al., 2012), antimicrobiana (MOHAMMAD et al., 2015; PAWAR et al., 2016), atividade analgésica (THORE; GUPTA; BAHETI, 2012) antineoplásica (PAREKH et al., 2017; PARK et al., 2011; XIE et al., 2015b), imunomoduladora (SANTOS et al., 2016), anti-inflamatório (NASTASA et al., 2013), anticonvulsivante (DAS; SIKDAR; BAIRAGI, 2016), cardiotônico (DUAN et al., 2015), anti-helmíntico (AMNERKAR; BHONGADE; BHUSARI, 2014) e antidiabético (KHATIK et al., 2017).

Esquema 1. Diversidade das atividades farmacológicas do núcleo tiazol.

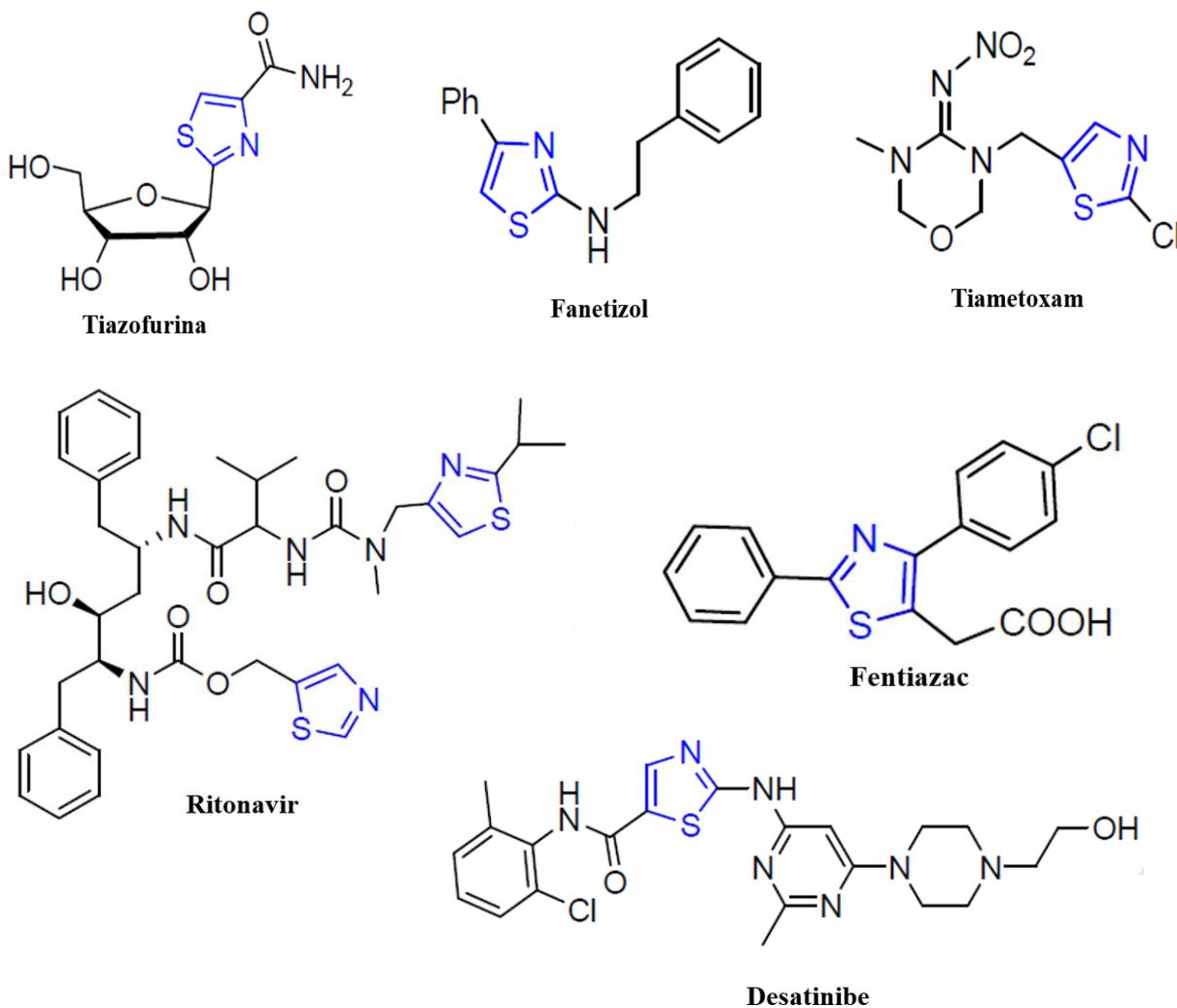


Fonte: O autor.

Com relação à atividade anticâncer, há vários medicamentos antitumoral utilizados na clínica portadores da estrutura tiazol, como o dasatinibe, dabrafenibe, tiazofurina e bleomicina (AMIT et al., 2014; AYATI et al., 2015; DUTTA et al., 2018; SARANGI et al., 2017). Recentemente, a maioria dos compostos, isolados dos produtos naturais, contendo a porção tiazol, exibem citotoxicidades consideráveis e potenciais antitumorais (ABD-

ELZAHER et al., 2016). As estruturas moleculares de alguns dos fármacos supracitados são mostrados na Figura 14, a seguir.

Figura 14. Fármacos antitumorais detentores do anel tiazólico.



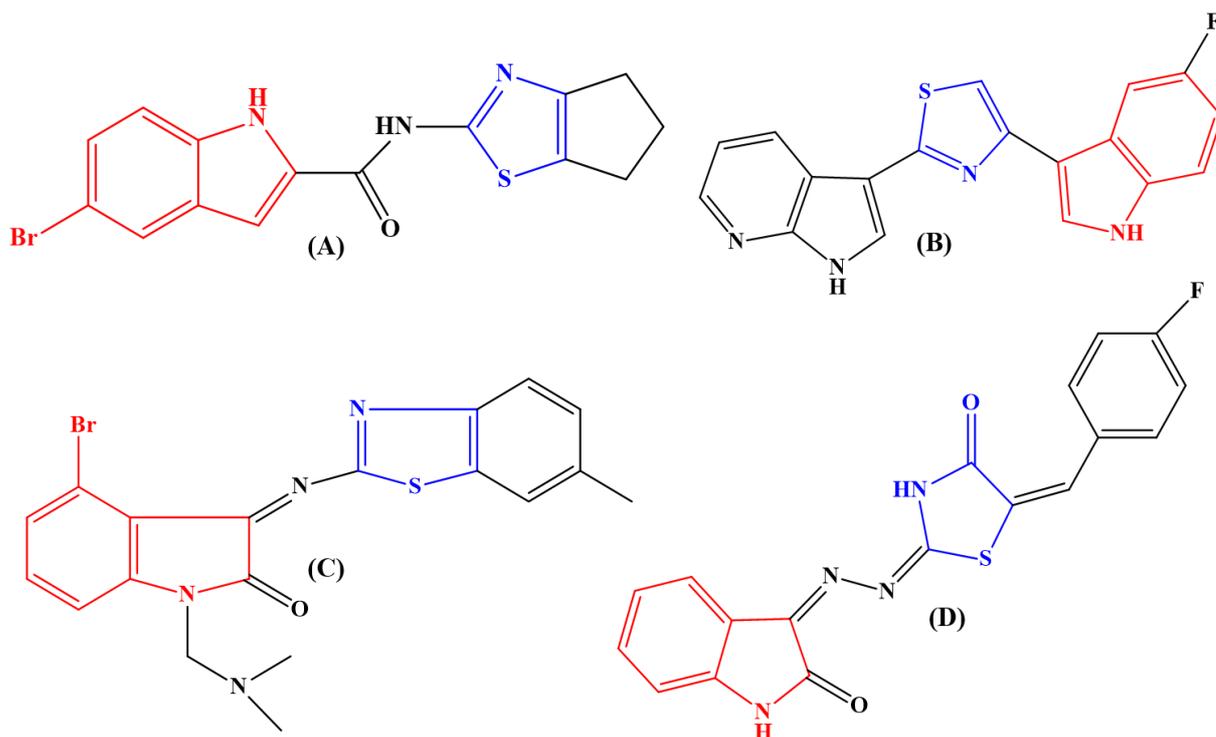
Fonte: Adaptado de Ayati et al., (2015).

Ainda nessa perspectiva, a atenção dos químicos medicinais é atraída pelo anel tiazol, devido não apenas à sua viabilidade sintética, mas também à sua incorporação na diversidade de agentes ativos terapêuticos. Uma vastidão de derivados tiazólicos têm sido reportados como agentes anticancerígenos (ALTINTOP et al., 2018; GROZAV et al., 2017; HE et al., 2016; MOHAMMED et al., 2017; OZEN et al., 2017; SANTANA et al., 2017) e muitas outras entidades portadoras do anel tiazol têm sido consideradas potenciadoras da ação antineoplásica, podendo atuar nas atividades citotóxica (HASSAN et al., 2012; LUO et al., 2011; VASU et al., 2017), anti-angiogênica (CHANDRAPPA et al., 2010; THIRUSANGU et

al., 2016), antiproliferativa (LACZKOWSKI et al., 2018), inibidores da polimerização da tubulina (GUGGILAPU et al., 2017), inibidores de tirosina quinase (TADESSE et al., 2017).

Ademais, muitos estudos têm sido realizados, investigando a inserção de diversos grupos químicos ao anel tiazol e seus derivados, no intuito de potencializar, reciprocamente, sua ação farmacológica, como é o caso do núcleo indol, cujas atividades farmacológicas são, muitas vezes, aprimoradas quando uma mesma estrutura química é portadora de ambos os citados núcleos, atuando no fortalecimento, por exemplo, das atividades: anti-hiperuricêmica (SONG et al., 2016), antibacteriana (GALI et al., 2014b; YURTTAS et al., 2017), anti-Parkinson (NAM et al., 2017), antioxidante (GROZAV et al., 2017) e antitumoral (O'DEA et al., 2018; PARRINO et al., 2015; RAMSHID et al., 2010; SOLOMON; HU; LEE, 2009) (Figura 15).

Figura 15. Exemplos de protótipos usados em pesquisas antitumorais portadores dos núcleos indol e tiazol.



Fontes: (A) O'Dea et al., (2018), (B) Parrino et al., (2015), (C) Solomon et al., (2009) e (D) Ramshid et al., (2010).

2.2 O DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER

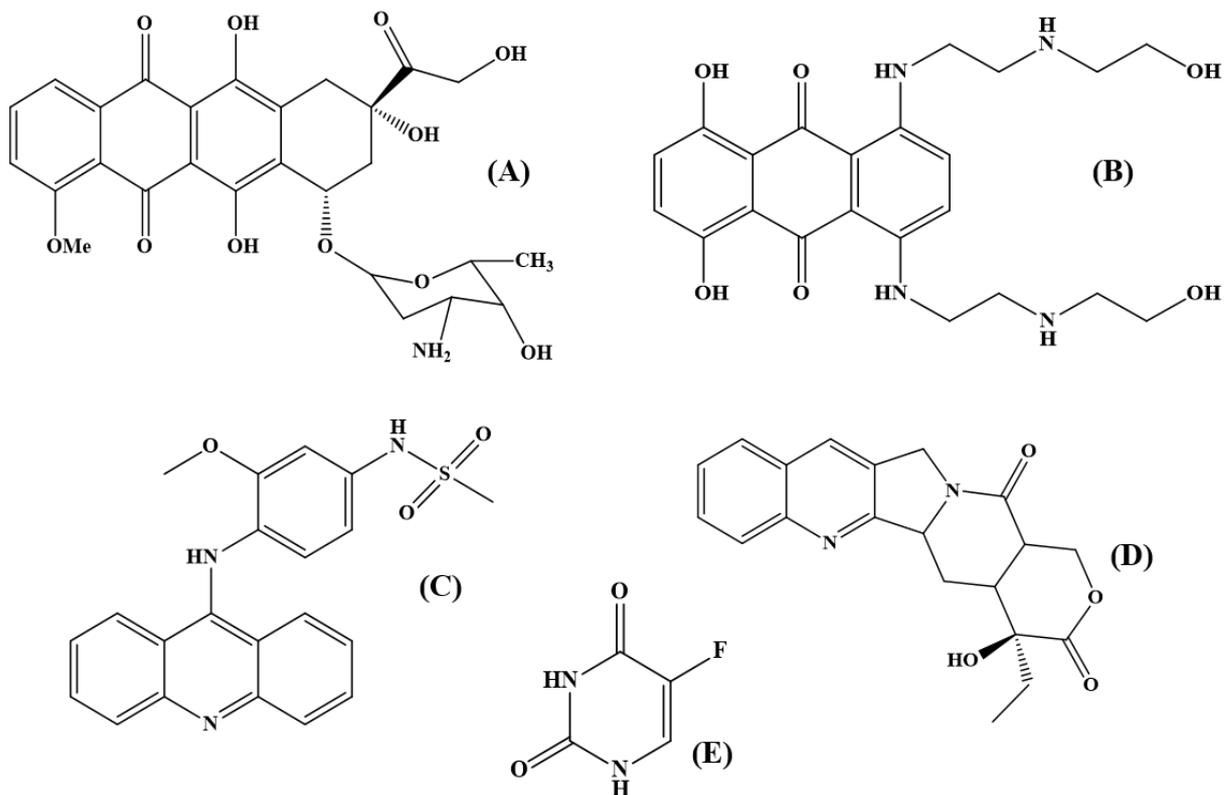
O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. Segundo estimativas da OMS, em 2030, prevê-se que a taxa de mortalidade seja de 13,1 milhões de mortes, sendo responsável por cerca de 1 em 6 mortes (OMS, 2018). Diferentemente das células normais que respondem a sinais que determinam o processo de divisão, diferenciação e morte celular, as células cancerosas desenvolvem grau de autonomia em relação a esses sinais, as quais são caracterizadas por três propriedades principais: proliferação descontrolada, amplo poder de plasticidade e capacidade de invadir tecidos em outros locais do corpo (metástase) (LABIB et al., 2018; SAINI; GUPTA, 2018).

Geralmente, o câncer é causado por múltiplos fatores patogênicos e suas características estão relacionadas a um aumento na taxa de proliferação de células tumorais e numerosas mutações genéticas e/ou epigenéticas, que prolongam sua vida útil. Apesar da diversidade e heterogeneidade dos tumores, todos eles apresentam aumento da taxa de proliferação celular (ALMEIDA et al., 2017). Para haver proliferação celular é necessário a leitura e divisão do material genético celular. Por esta razão, o DNA é considerado um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos e um elemento relevante no planejamento de candidatos a fármacos. Moléculas que se ligam ao DNA podem modificar suas funções fisiológicas, inibindo sua replicação, transcrição ou expressão de informação genética nas células alvo, evitando assim crescimento celular (NI; WEI; KOKOT, 2011; VOGELSTEIN et al., 2013; PEI; ZHANG; LIU, 2014; ALEXANDER et al., 2014; ZHU et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

Investigações sobre a interação de fármacos com o DNA são realizadas desde o início da década de 1960. O ímpeto destes investigações é entender o mecanismo de ação dos fármacos em nível molecular. Geralmente, os ligantes afetam a replicação e a transcrição do DNA, induzindo a morte celular e apoptose, evidenciando a relevância da elucidação dos efeitos dos compostos sobre as propriedades estruturais e físicas do DNA, no desenho de novos candidatos a fármacos a serem utilizados na clínica (GENG et al., 2013; GALI et al., 2014; TIAN et al., 2017; ALIZADEH et al., 2018). Exemplos de medicamentos já usados clinicamente no combate ao câncer cujo alvo farmacológico é o DNA ou enzimas envolvidas diretamente nas funções intrínsecas desta biomolécula são: a doxorubicina (LEI; WANG; WU, 2012), *m*-AMSA (JANGIR et al., 2012), 5-fluorouracil (JANGIR et al., 2011),

mitoxantrona (SHAHABADI; HEIDARI, 2012) e camptotecina (RESCIFINA et al., 2014) (Figura 16).

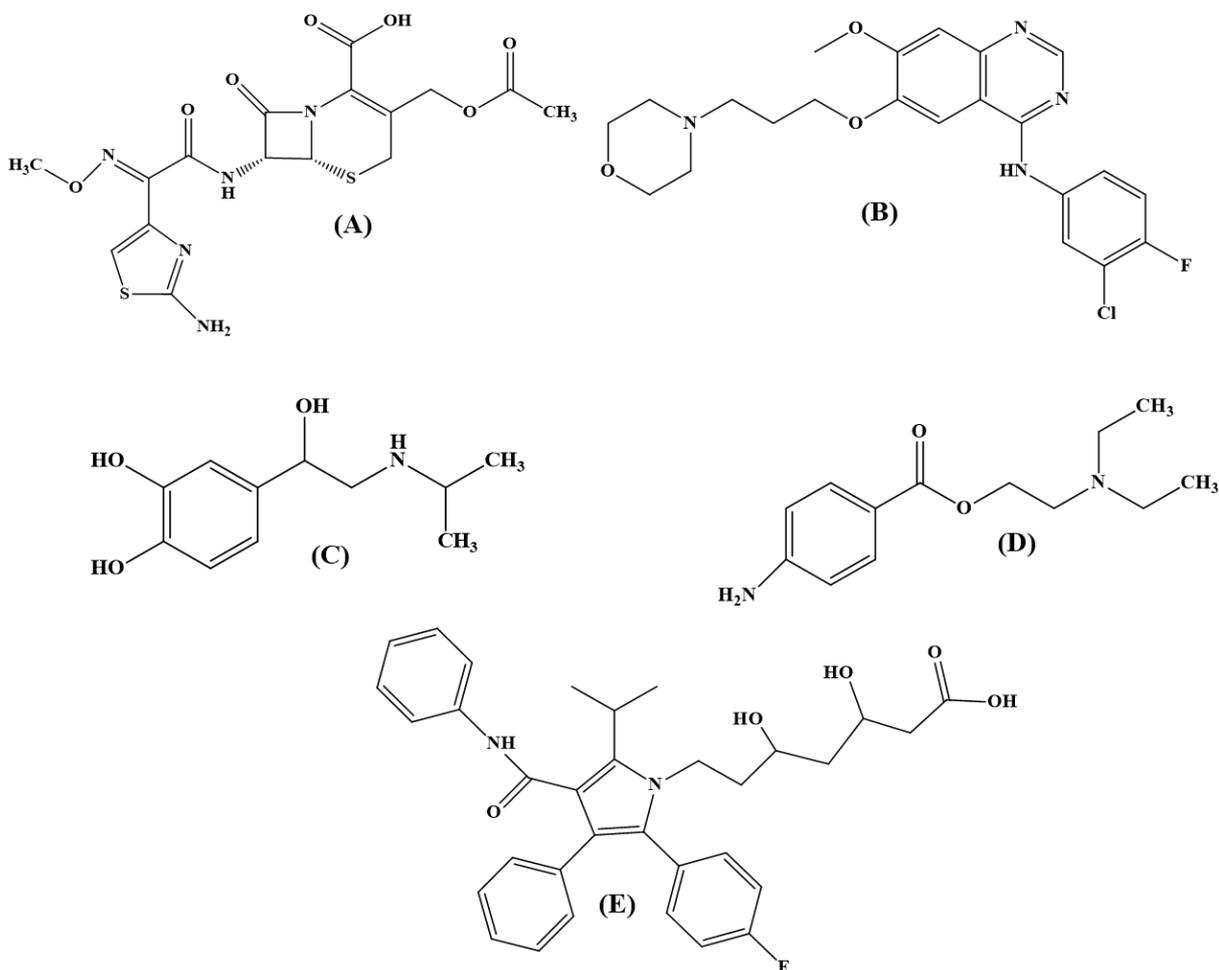
Figura 16. Estruturas químicas de alguns exemplos de fármacos antineoplásicos usados na clínica: doxorubicina (A), mitoxantrona (B), *m*-AMSA (C), camptotecina (D) e 5-fluorouracil (E).



Fontes: (A) Lei; Wang; Wu, 2012 (B) Shahabadi; Heidari, 2012 (C) Jangir et al., 2012 (D) Rescifina et al., 2014 e (E) Jangir et al., 2011.

Ademais, fármacos com outras atividades farmacológicas também são testados a fim de se constatar se são ou não providos da capacidade de interagir com o DNA. Como exemplos, podemos citar a atorvastatina (MIRZAEI-KALAR, 2018), procaína (ALI et al., 2018a), gefitinibe (SHI et al., 2015), cefotaxima (QAIS; AHMAD, 2017) e isoprenalina (NI; WEI; KOKOT, 2011) (Figura 17)

Figura 17. Estruturas químicas de fármacos cujas propriedades de interação com o DNA foram investigadas: cefotaxima (A), gefitinibe (B), isoprenalina (C), procaína (D) e atorvastatina (E).



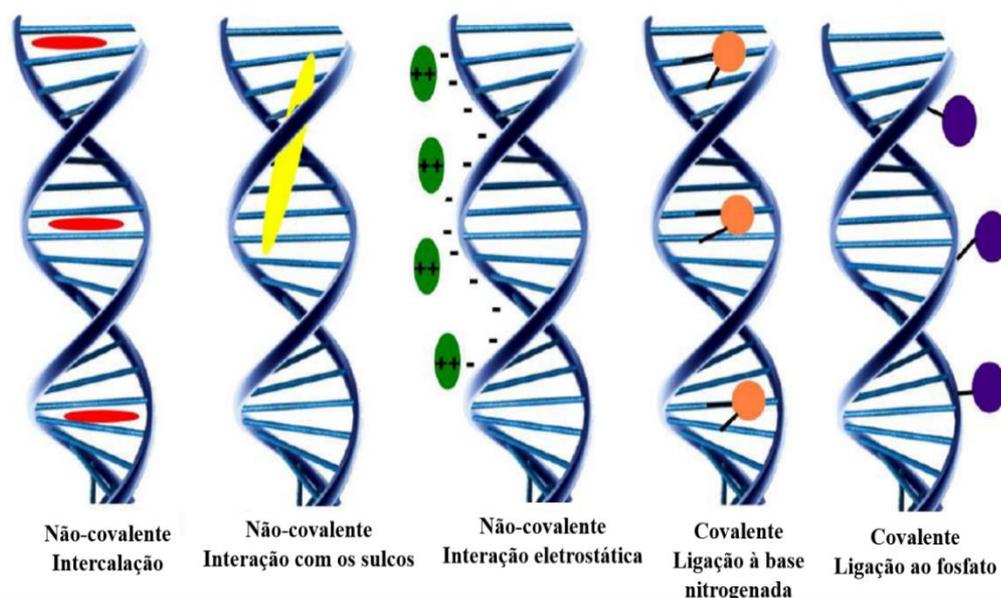
Fontes: (A) Qais; Ahmad, 2017 (B) Shi et al., 2015 (C) Ni; Wei; Kokot, 2011 (D) Ali et al., 2018 e (E) Mirzaei-Kalar, 2018.

Com base nisso, o DNA é o alvo intracelular primário de medicamentos anticâncer, como indicado pelos achados de inúmeras pesquisas biológicas. Por isso, esta biomolécula é explorada na perspectiva de se buscar melhores fármacos antitumorais com alta eficácia, baixa toxicidade e efeitos colaterais mínimos (EL-NAKKADY et al., 2012; ANITHA et al., 2013; ALI; BHATTACHARYA, 2014; KARAMI et al., 2017), como, por exemplo, os alcaloides (SARKAR; BHATTACHARJEE; BHADRA, 2016; BHATTACHARJEE et al., 2018) e os derivados orgânicos sintéticos (GUPTA et al., 2017).

Moléculas como as que constituem os fármacos podem interagir com o DNA via interação não covalente ou covalente (Figura 18). Como exemplos de ligantes que interagem covalentemente com o DNA existem os agentes alquilantes (PAUL; BHATTACHARYA, 2012; RAHMAN et al., 2017). Este tipo de interação pode provocar uma ligação irreversível,

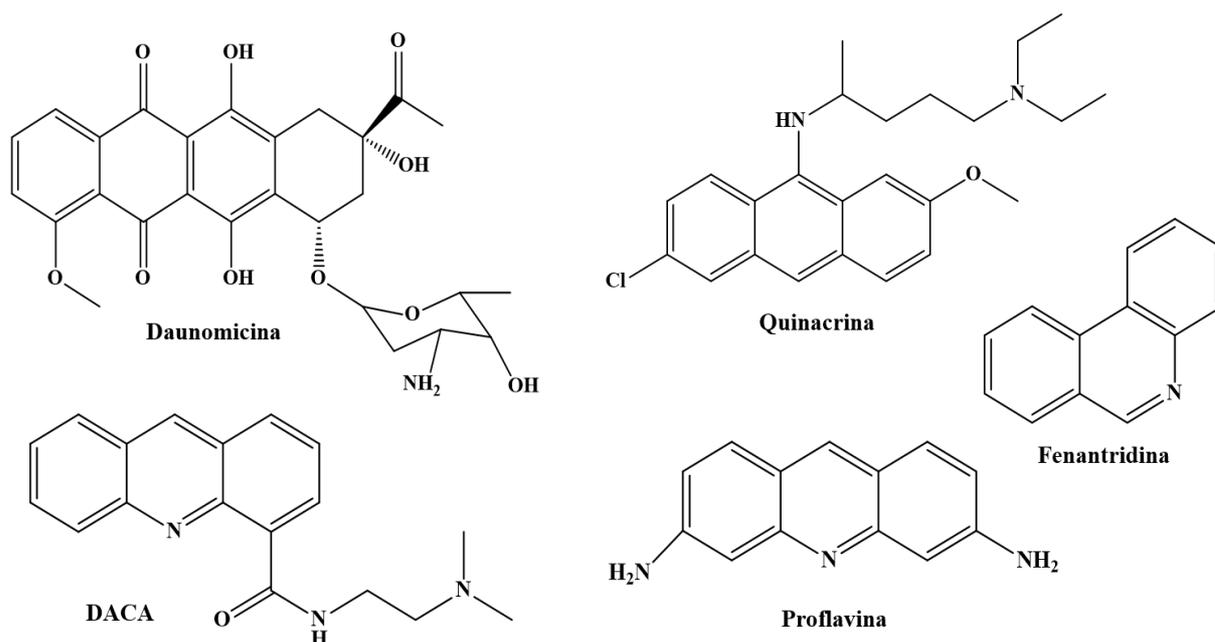
formando adutos entre os ligantes do complexo ou mesmo uma possível alquilação de bases nitrogenadas do DNA. Já a interação não covalente é uma interação reversível em que uma molécula interage com biomoléculas via intercalação, forças eletrostáticas ou interação aos sulcos, desencadeando mudanças na conformação do DNA, quebras em sua estrutura ou mesmo inibir a interação proteína-DNA. A ligação intercalativa e de sulco podem acontecer simultaneamente e de variadas formas, perto ou dentro da dupla hélice desta biomolécula, enquanto a ligação eletrostática ocorre em sua parte externa (SILVESTRI; BRODBELT, 2013; HANYU et al., 2012; EBRAHIMPOUR et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017).

Figura 18. Representação dos modos de interação entre ligantes e a molécula de DNA.



Fonte: Adaptado de BARRA; NETTO, 2016.

As interações intercalativas, que compreendem a inserção do ligante dentro da hélice do DNA, ocorrem através da intercalação entre os pares de bases, alterando a replicação do DNA e inibindo o crescimento da célula tumoral, que é a base para a concepção de novos fármacos antitumorais, tornando-os mais eficientes de acordo com a sua afinidade por esta biomolécula (LAFAYETTE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; AURAS et al., 2018; KOVVURI et al., 2017). Compostos químicos cujo modo de interação com o DNA é por via intercalativa foram estudados por Rescifina et al. (2014) e alguns deles podem ser observados na Figura 19.

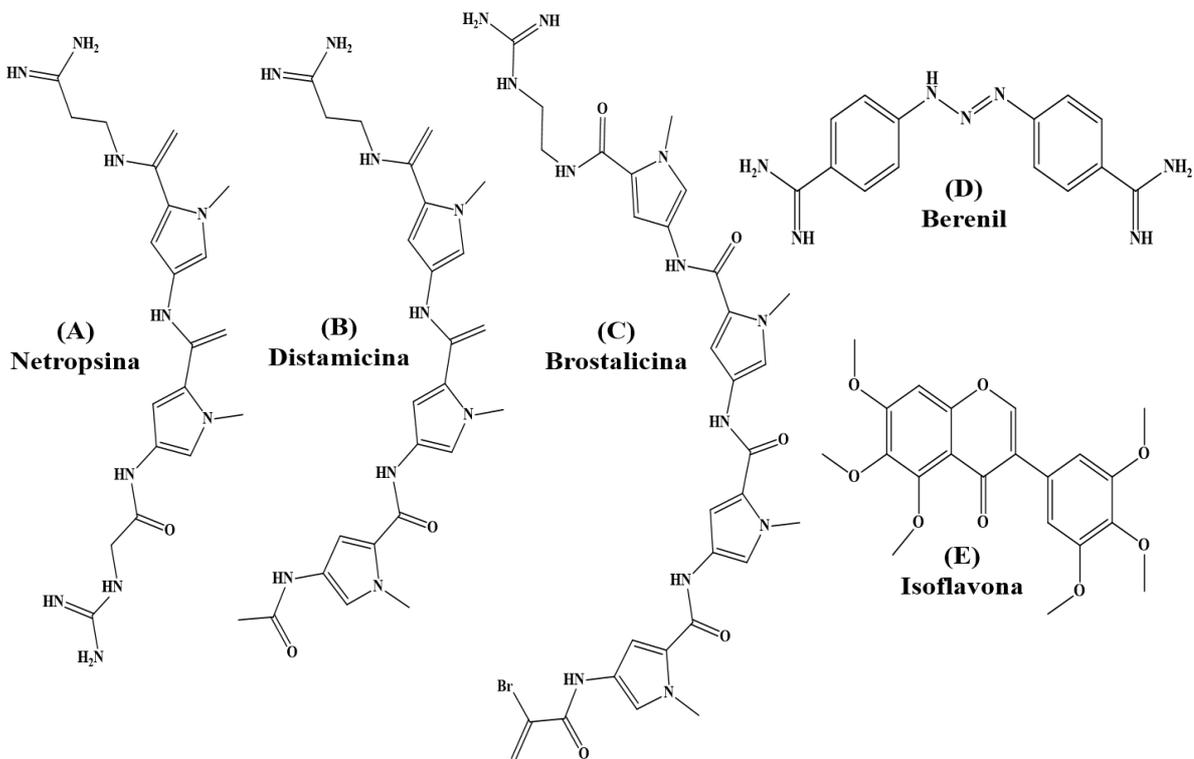
Figura 19. Estruturas químicas de agentes intercalantes do DNA.

Fonte: Adaptado de Rescifina et al., 2014.

Outro tipo de interação se dá através de ligação aos sulcos do DNA, podendo ser uma ligação ao sulco menor ou uma ligação ao sulco maior que são predominantemente estabilizados pela interação de van der Waals e ligações de hidrogênio formadas entre pequenas moléculas e bases nitrogenadas desta biomolécula, causando uma pequena distorção na sua “espinha dorsal”. Outra forma de interação existente desvela-se mediante ligações eletrostáticas ou ligações externas entre a “espinha dorsal” do fosfato do DNA carregado negativamente com uma pequena carga positiva de uma determinada molécula (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; QAIS; AHMAD, 2017).

Ainda nessa perspectiva, compostos que interagem com o DNA via ligação aos sulcos ou via interações eletrostáticas ou por ambos os casos, simultaneamente, foram evidenciados por ALI; BHATTACHARYA, 2014 e MIRZAEI-KALAR, 2018 (interação nos sulcos) e por PARVEEN et al., 2016 (interação eletrostática), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 20, a seguir.

Figura 20. Estruturas químicas de compostos que interagem com o DNA via ligação aos sulcos (A-D) e por interações eletrostáticas (E).



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

Investigações relativas à interação entre DNA e outras moléculas têm chamado a atenção dos cientistas nos últimos anos porque é de fundamental importância para a compreensão de muitos processos intracelulares e biotecnológicos (TIAN et al., 2017). Essas investigações podem ser feitas por meio de técnicas espectroscópicas de absorção, emissão fluorescente, dicroísmo circular (DC) e técnicas hidrodinâmicas, como a viscosidade. (JAUMOT; GARGALLO, 2012; GANESHPANDIAN et al., 2014; SHI et al., 2015; PARVEEN et al., 2016; ALI et al., 2018; ALIZADEH et al., 2018).

Através da técnica espectroscópica de absorção UV-vis, é possível obter a constante de ligação (K_b), uma medida quantitativa da interação entre compostos orgânicos e DNA (MCGHEE; HIPPEL, 1974). O valor é útil para comparar moléculas com diferentes estruturas, bem como para indicar os modos de ligação ao DNA (PLSIKOVA et al., 2012; LAFAYETTE et al., 2013). Constantes de ligação para intercaladores típicos estão no intervalo de 10^4 a 10^6 M^{-1} e são significativamente menores do que constantes de ligação para agentes ligantes em sulcos de DNA que variam de 10^5 a 10^9 M^{-1} (THAMILARASAN et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017).

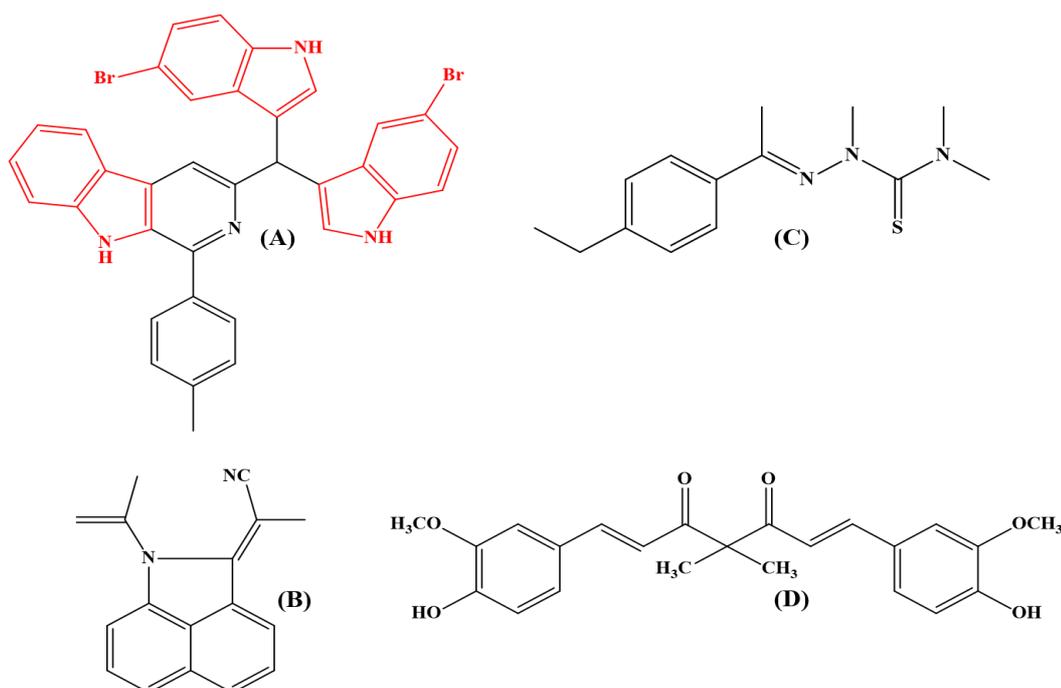
Como exemplo de investigações a respeito do modo de interação fármaco-DNA,

podemos citar o estudo de JANGIR et al. (2012) em que foi pesquisado o modo de interação do fármaco antitumoral amsacrina (*m*-AMSA) (Figura 16C), usando técnicas espectroscópicas como a absorção UV-vis e o DC, através das quais foi concluído que a *m*-AMSA interage com o DNA não apenas via modo intercalativo, mas também ligando-se ao sulco menor.

Ainda nessa perspectiva, JANGIR et al., 2011 e SHI et al., 2015 também investigaram o modo de interação dos fármacos anticancerígenos 5-fluorouracil (Figura 16E) e gefitinib (Figura 17B), respectivamente, utilizando-se de técnicas espectroscópicas como absorção UV-vis, emissão fluorescente e dicroísmo circular, entre outras como viscosidade e estudos de modelagem molecular, mediante as quais foi sugerido que o modo de interação destes medicamentos ocorre por modo intercalativo e através da ligação ao sulco menor do DNA, respectivamente.

No tocante aos estudos envolvendo protótipos de fármacos, temos como exemplos várias pesquisas que utilizaram a absorção UV-vis, como técnica complementar a fim de decifrar o modo de interação de distintos ligantes frente ao DNA, como as investigações conduzidas por KOVVURI et al., 2017 e LI et al., 2010, que definiram o modo de interação por via intercalação, e por KRISHNA et al., 2018 e LIU et al., 2015 que confirmaram o modo de ligação aos sulcos desta biomolécula (Figura 21).

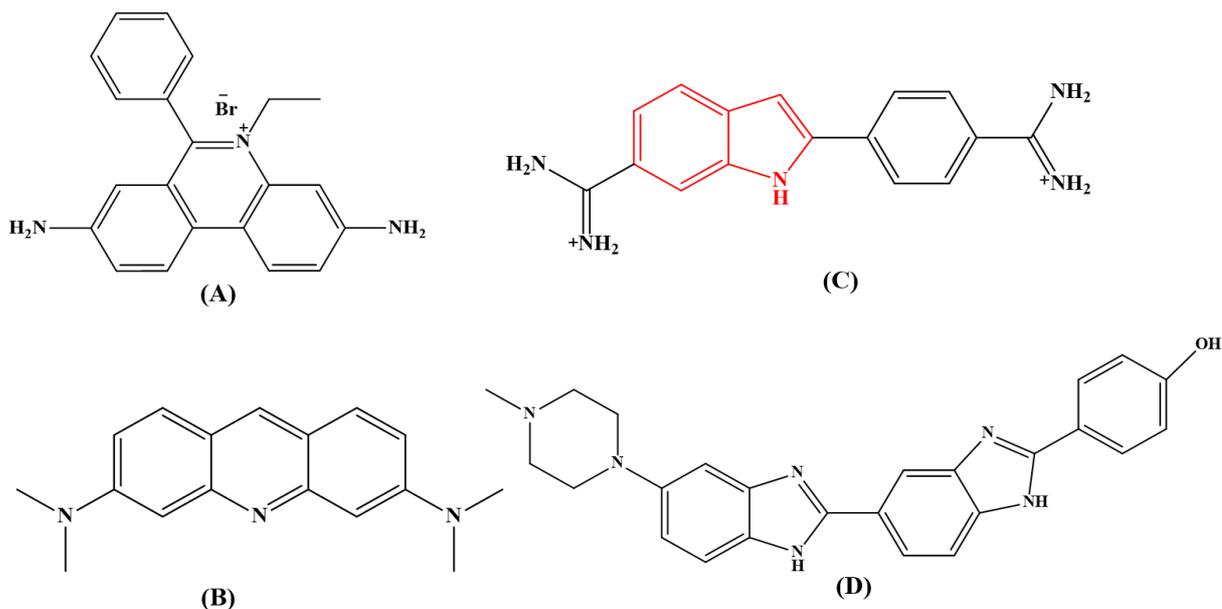
Figura 21. Estruturas químicas de protótipos intercalantes (A e B) e ligantes aos sulcos do DNA (C e D), os quais foram determinados mediante o uso complementar da técnica espectroscópica de absorção UV-vis.



Fontes: (A) Kovvuri et al., (2017), (B) Li et al., (2010), (C) Krishna et al., (2018) e (D) Liu et al., (2015).

É reportado que a emissão fluorescente do DNA é muito fraca. Em função disto, comumente, são usadas sondas de fluorescência. Certas sondas já possuem o seu modo de ligação ao DNA já bem definido e são úteis para decifrar o modo de interação de um ligante com esta biomolécula, como o brometo de etídio (BE) (SHAHABADI; MAGHSUDI, 2014) e a laranja de acridina (AO) (SANI et al., 2018), ambos agentes intercalantes, ou o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (ALI et al., 2018a) e o Hoechst 33258 (QAIS; AHMAD, 2017), ambos ligantes ao sulco menor desta biomacromolécula (Figura 22). Em tais experimentos, uma dado ligante, substituindo o corante que já está ligado ao DNA, supostamente, interage com este de uma maneira semelhante a do corante utilizado. Assim, qualquer alteração nas propriedades fluorescentes do complexo corante-DNA após a adição do ligante, pode gerar dados norteadores do mecanismo de ligação (REHMAN et al., 2015; LIU et al., 2015a).

Figura 22. Estruturas químicas de sondas fluorescentes usadas para decifrar o modo de interação de um ligante com o DNA: brometo de etídio (A), laranja de acridina (B), DAPI (C) e Hoeschst 33258 (D).



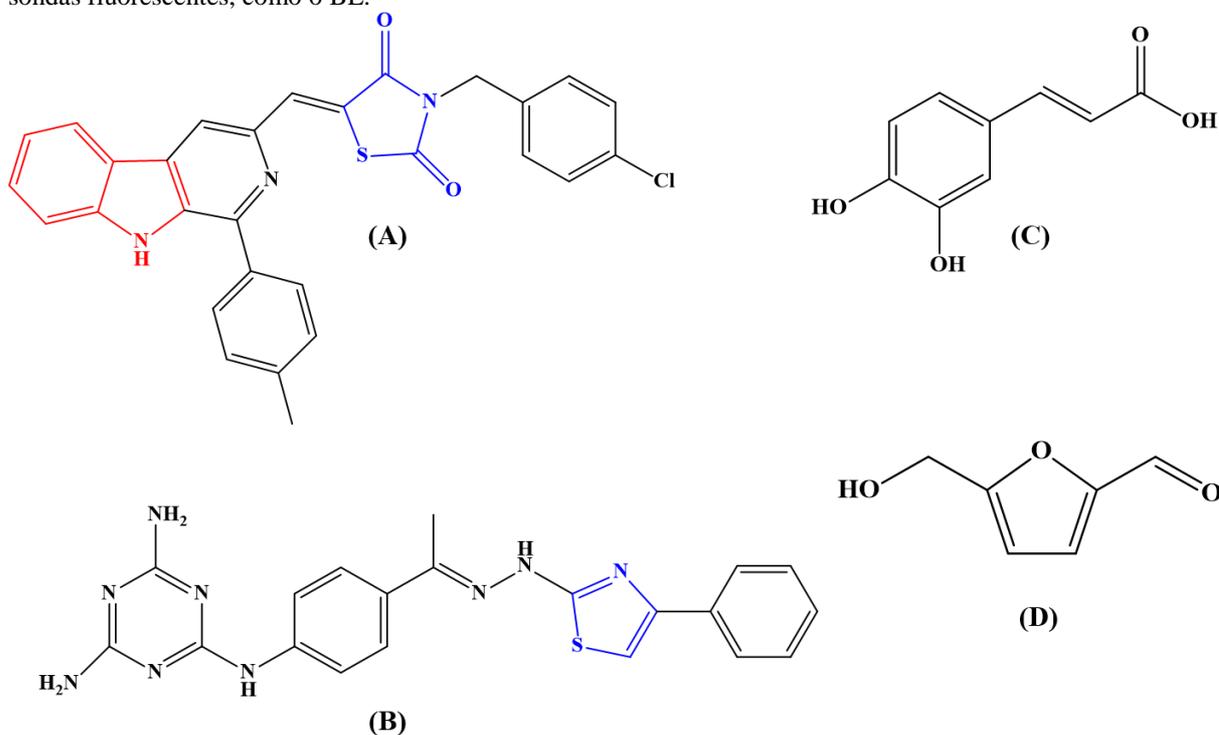
Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

O BE tem sua fluorescência suprimida quando isolado em meio aquoso, contudo, quando incubado com o DNA, esta sonda se intercala entre os pares de base desta biomolécula, os quais evitam a supressão fluorescente e a emissão do complexo BE-DNA pode ser detectada. Contudo, se o composto/fármaco de interesse for capaz de substituir o BE conjugado ao DNA, a emissão fluorescente outrora observada, passa a ser suprimida, indicando que o ligante tem uma forte habilidade intercalativa, quando comparado ao BE, resultado indicativo de que o referido ligante também é um agente intercalante entre as bases

do DNA (HANYU et al., 2012; RESCIFINA et al., 2014; SALEM et al., 2016; SANI et al., 2018; SANKARGANESH et al., 2018; SILVA et al., 2013; WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2018).

Nessa perspectiva, variadas pesquisas foram realizadas usando apenas o BE ou este juntamente com outras sondas fluorescentes para elucidar o modo de interação de um dado ligante com o DNA, como os estudos conduzidos por LACZKOWSKI et al., 2018 e TOKALA et al., 2018, cujos resultados indicaram o modo intercalativo de interação, bem como por ZHU et al., 2014 e SARWAR et al., 2017 que chegaram a conclusão do modo de interação via ligação aos sulcos do DNA, dos compostos testados (Figura 23).

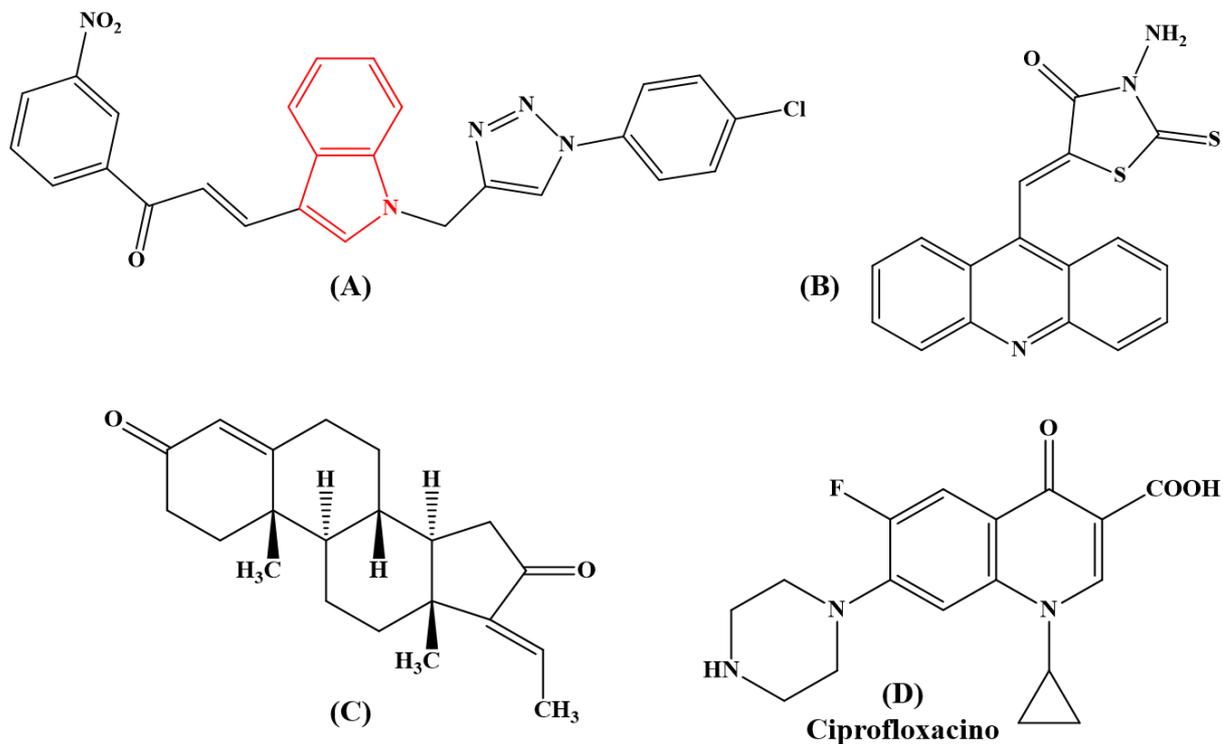
Figura 23. Estruturas químicas de derivados intercalantes (A e B) e ligantes dos sulcos do DNA (C e D), cujos modos de interação foram elucidados através da técnica espectroscópica de fluorescência mediante o uso de sondas fluorescentes, como o BE.



Fontes: (A) Tokala et al., (2018), (B) Laczkowski et al., (2018), (C) Sarwar et al., (2017) e (D) Zhu et al., (2014).

Como exemplos de investigações do modo de interação ligante-DNA, usando a técnica de DC como método complementar podemos citar os estudos realizados por ANEJA et al., 2018 e LAFAYETTE et al., 2013, cujos resultados indicam o modo de interação via intercalação, como também por LI et al., 2013 e IKHLAS; AHMAD, 2018 que inferiram a ligação aos sulcos como modo de interação dos compostos testados (Figura 24).

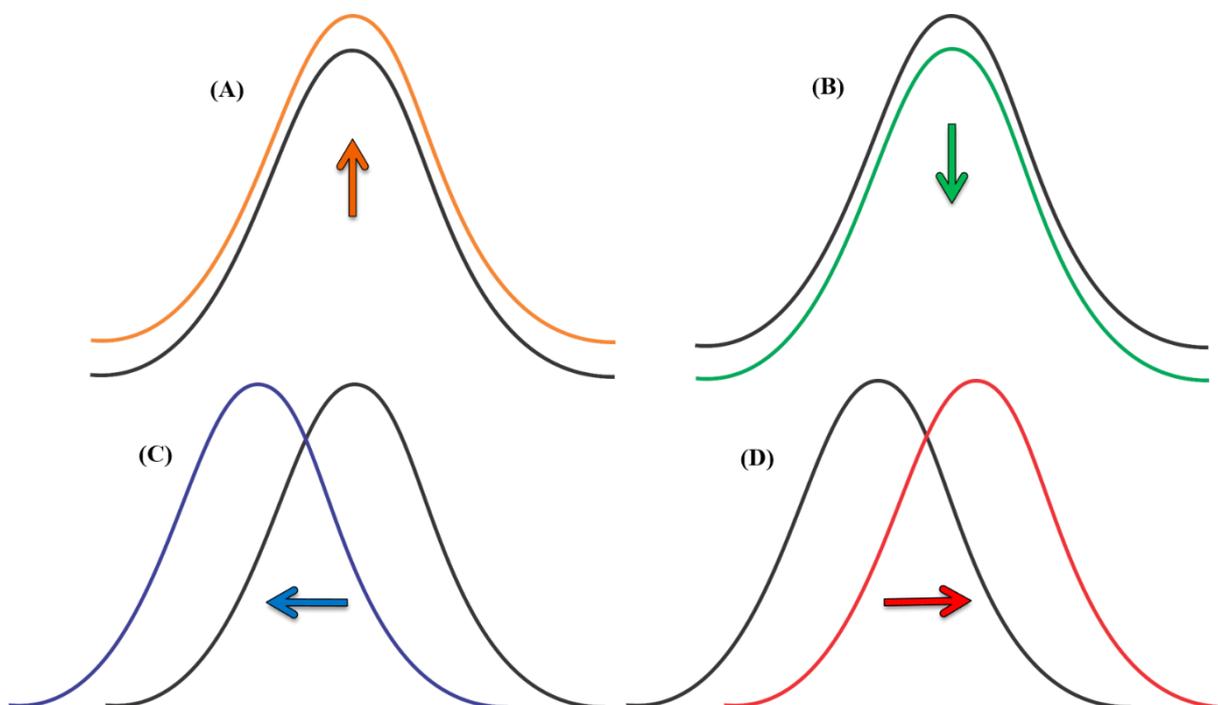
Figura 24. Estruturas químicas de derivados intercalantes (A e B) e ligantes dos sulcos do DNA (C e D), cujos modos de interação foram elucidados, complementarmente, através da técnica espectroscópica de DC.



Fontes: (A) Aneja et al., (2018), (B) Lafayette et al., (2017), (C) Ikhlas et al., (2018) e (D) Li et al., (2013).

Uma vez decorrido o processo de interação do complexo biomolécula-ligante, pode-se verificar, em espectros de absorção ou fluorescência, alterações nas intensidades e na elipticidade da molécula biológica de interesse, as quais são bastante úteis para posterior análise, a fim de se investigar o mecanismo de interação por meio dos seguintes efeitos: efeito hipocrômico, correspondente à uma diminuição da luz absorvida ou emitida (BAS et al., 2018); efeito hiperocrômico, definido como aumento da intensidade de absorção ou emissão de luz (SHAHABADI; MAGHSUDI, 2014); efeito batocrômico, observado pelo deslocamento dos máximos de absorção ou emissão após ligação ao DNA para um comprimento de onda mais longo (deslocamento para a região do vermelho) (PAWAR; OTTOOR, 2018) e efeito hipsocrômico, quando ocorre deslocamento do máximo de absorção ou emissão para comprimentos de ondas menores (deslocamento para o azul) (CANOVIC et al., 2017). A Figura 25 representa os efeitos que podem ser detectados em estudos de interação entre ligantes e biomoléculas, como o DNA, a partir do uso das técnicas espectroscópicas supracitadas.

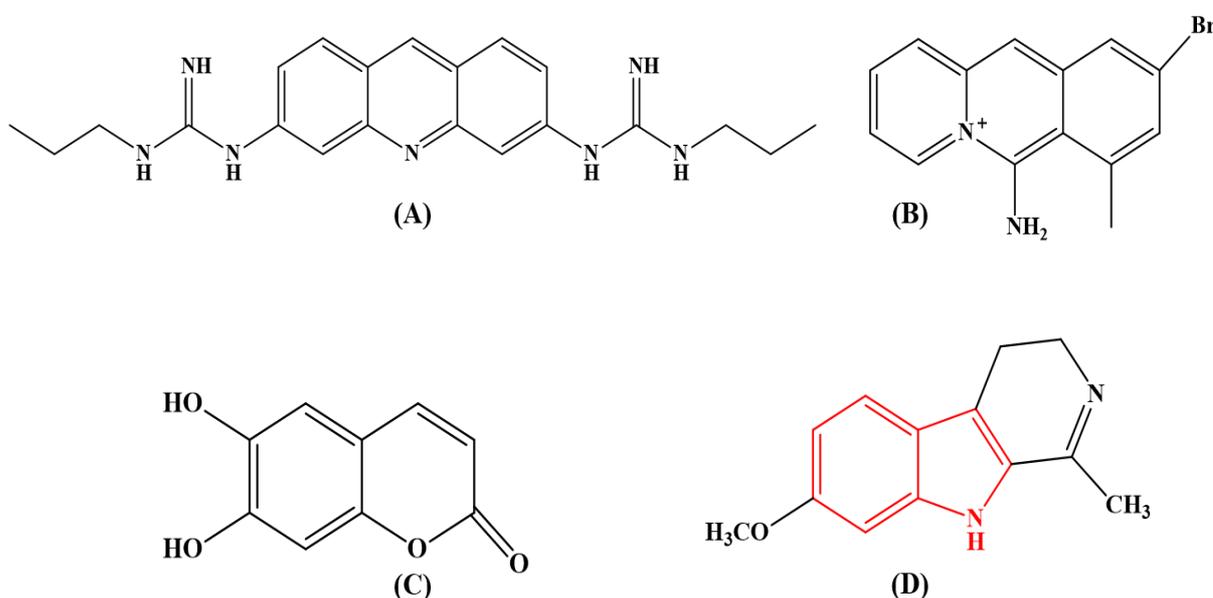
Figura 25. Efeitos observados em espectros relacionados a investigações sobre o modo de interação entre uma biomolécula e um ligante, através das técnicas espectroscópicas. É possível ocorrer os efeitos hiperacrômico (A), hipocrômico (B), hipsocrômico (C) e batocrômico (D), a partir do aumento, diminuição ou desvio do pico máximo obtido para a esquerda ou direita, respectivamente.



Fonte: O autor.

Os estudos de viscosidade podem auxiliar na distinção e elucidação dos três principais modos de interação entre diferentes ligantes frente ao DNA, podendo ou não se utilizar de sondas cujo modo de interação com esta biomolécula já é bem estabelecido (BENNER; IHMELS; PITHAN, 2014; FAULHABER et al., 2011; GUP; GÖKÇE; DILEK, 2015; SALEM et al., 2016). Como exemplos de investigações do modo de interação ligante-DNA, usando a técnica de viscosidade como método complementar podemos citar os estudos realizados por PLSIKOVA et al., 2012 e FAULHABER et al., 2011, cujos resultados indicam o modo de interação via intercalação, como também por SARWAR et al. (2015) e BHATTACHARJEE et al. (2018) que inferiram a ligação aos sulcos como modo de interação dos compostos testados (Figura 26).

Figura 26. Estruturas químicas de derivados intercalantes (A e B) e ligantes aos sulcos do DNA (C e D), cujos modos de interação foram elucidados, complementarmente, através da técnica hidrodinâmica de viscosidade.



Fontes: (A) Psilkova et al. (2012), (B) Faulhaber et al. (2011), (C) Sarwar et al. (2015) e (D) Bhattacharjee et al. (2018).

2.3 INTERAÇÕES COM A SOROALBUMINA PARA ESTUDOS DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

Estudos sobre a influência de fármacos e outros compostos biologicamente ativos em constituintes proteicos circulantes no sistema sanguíneo humano são de grande interesse, porque a interação dos medicamentos com componentes sanguíneos podem ou não afetar sua biodisponibilidade e o funcionamento de biomoléculas. Nesse contexto, a albumina sérica (AS) é uma das proteínas solúveis mais notáveis no sangue humano, pois é responsável por cerca de 60% de todas as proteínas plasmáticas, além de executar muitas funções fisiológicas essenciais ao metabolismo humano. Uma das propriedades proeminentes dessa proteína é sua capacidade de cumprir o papel de transportador de fármacos e outras substâncias similares (AMROABADI et al., 2018; DIXIT, 2017; HE et al., 2017; KARTHIKEYAN; BHARANIDHARAN; KESHERWANI, 2015; LI; WANG, 2014; MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018; NIAEI; HASSANZADEH; SHADJOU, 2018).

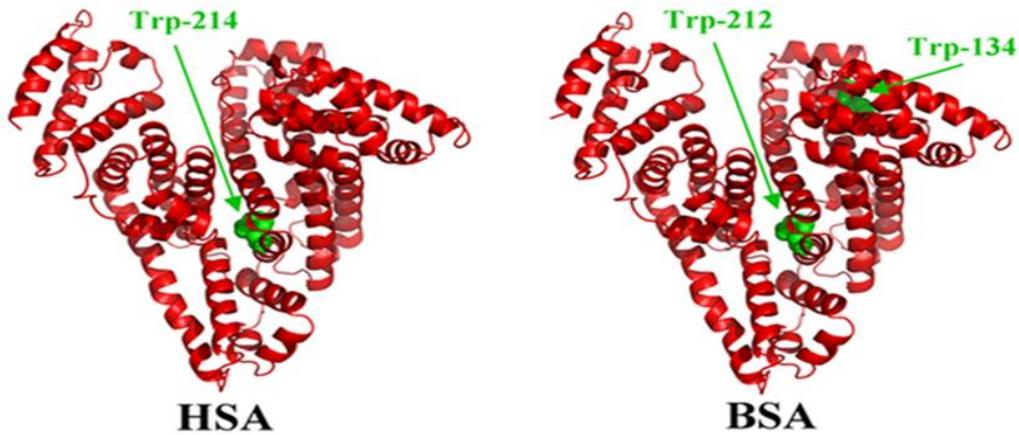
Nesse aspecto, a AS é rica em múltiplos locais de ligação lipofílica e desempenha papel vital no transporte de vários compostos exógenos e endógenos, incluindo medicamentos e nutrientes. Comparado com a sua forma livre, é conhecido que um medicamento específico

ligado à AS tem maior solubilidade no plasma, menor toxicidade, maior meia-vida plasmática e maior proteção contra a degradação ou transformação metabólica (CHEN; ZHANG; LIU, 2013; KARAMI et al., 2017; LIANG et al., 2018; LIU et al., 2018; PAUL et al., 2017; SHAHRI et al., 2017).

Além disso, é conhecido que a soroalbumina humana (HSA) se acumula nas células cancerígenas, sendo absorvida por células tumorais em níveis aumentados em comparação com células normais, sugerindo que esta proteína pode ser uma boa candidata para a entrega de medicamentos anticâncer para essas células transformadas, como ocorre com os fármacos antitumorais paclitaxel e doxorubicina. A interação fármaco-albumina serve como modelo para encontrar informações básicas sobre interações dessa modalidade e suas aplicações (BOZOGLAN; TUNÇ; DUMAN, 2014; FRAGOSO et al., 2017; FU et al., 2013; GOU et al., 2015; GUO et al., 2017; HASANZADEH et al., 2017; CANOVIC et al., 2017; XU et al., 2018).

Tais interações são usadas para avaliar os mecanismos de transporte, distribuição e metabolismo de fármacos. A HSA, a proteína mais abundante no plasma sanguíneo humano, está envolvida no transporte de ácidos graxos, metabólitos e fármacos. A BSA é usada como um modelo de substituição da HSA para estudos de diversas áreas de pesquisa, como as investigações de cunho antitumoral, devido à sua alta semelhança estrutural, inclusive tridimensionalmente, com a HSA (Figura 27). Ambas as albuminas partilham 76% de homologia de sequências, têm os mesmos sítios de ligação localizados nos subdomínios IIA e IIIA e os aminoácidos que revestem os locais de ligação são principalmente hidrofóbicos e semelhantes. O triptofano (Trp) 212 na BSA e o Trp-214 na HSA estão localizados em um microambiente hidrofóbico similar no subdomínio IIA e são usados como sondas para monitorar interações de ligação com moléculas dentro da albumina (ROY et al., 2016; SHI et al., 2016b; ARUMUGAM; SUBRAMANIAN; MALAICHAMY, 2016; CHAVES et al., 2018; CAMARGO et al., 2018; DAHIYA; PAL, 2018; DOMÍNGUEZ; CORTÉS-FIGUEROA; MELÉNDEZ, 2017; TATSUMI et al., 2017).

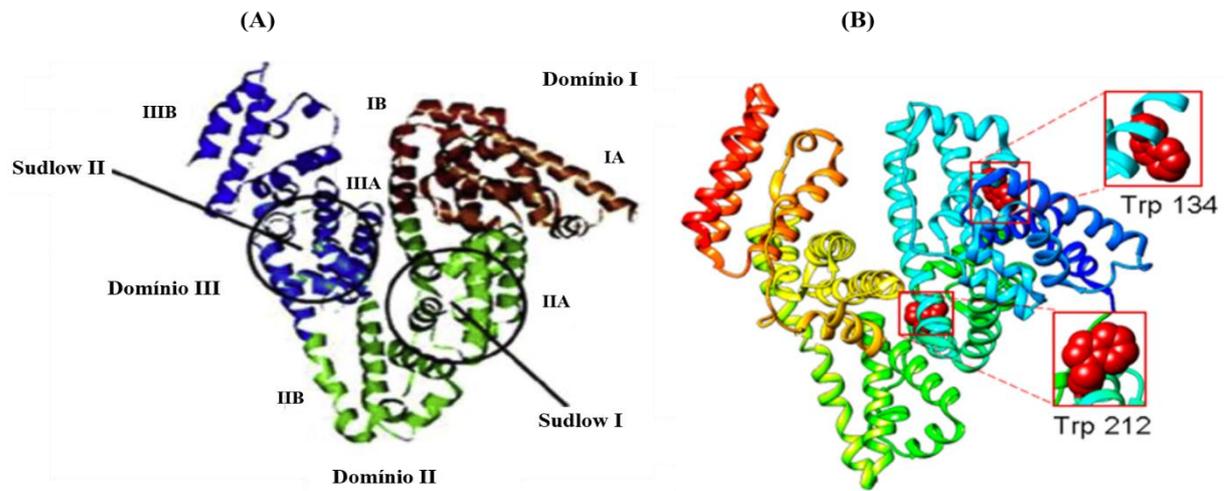
Figura 27. Homologia entre as estruturas tridimensionais da soroalbumina humana (HSA) e bovina (BSA), respectivamente. É possível notar que a HSA possui apenas um resíduo de triptofano (Trp-214), enquanto a BSA possui dois (Trp-134 e Trp-212).



Fonte: Belatik et al., (2012).

A BSA é a proteína mais estudada e possui uma única cadeia polipeptídica, um peso molecular de 66 kDa, sendo constituída por 583 resíduos de aminoácidos. Contém três domínios homólogos helicoidais conhecidos como I, II e III. Cada domínio é dividido em dois subdomínios (A e B). Existem dois principais sítios de ligação aos fármacos nos subdomínios IIA (Sudlow I) e IIIA (Sudlow II). A BSA possui dois resíduos de triptofano nomeados como Trp-134 e Trp-212 (Figura 28) (DRAVECZ et al., 2018; EBRAHIMIPOUR et al., 2017; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2016; LIU et al., 2018; QIN; YIN; SHEN, 2015; ROY et al., 2017; SHI et al., 2016a; QIN; YIN; SHEN, 2015; SHI et al., 2016b).

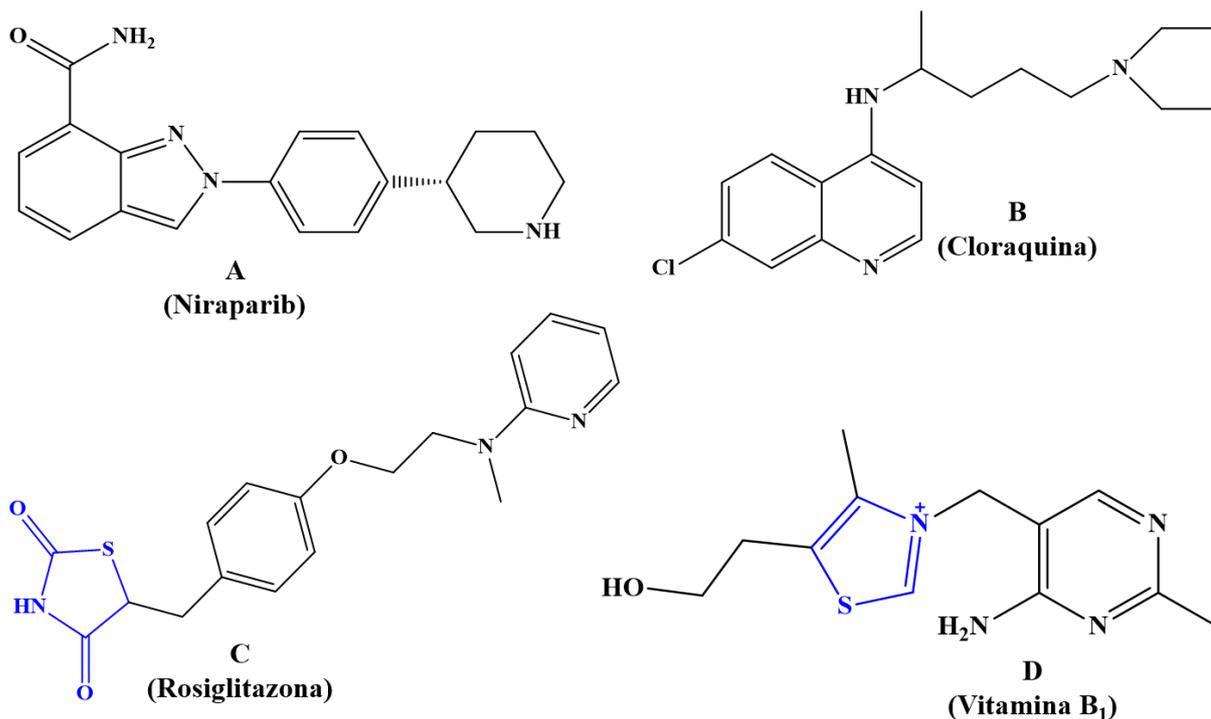
Figura 28. Estruturas tridimensionais da BSA, enfatizando os domínios, os sítios de ligação (A) e os residuais fluorescentes de triptofano (Trp-134 e Trp-212) intrínsecos a esta proteína plasmática (B).



Fontes: Adaptados de (A) Belatik et al., (2012) e (B) Meti et al., (2014).

Como exemplos de fármacos e demais substâncias cujo modo de interação com as citadas albuminas séricas foi investigado, podemos aludir o niraparib (GAN et al., 2018), a cloraquina (MARKOVI et al., 2018), a rosiglitazona (PAWAR; OTTOOR, 2018), a vitamina B₁ (KAUR et al., 2018), a sitofloxacina (DING et al., 2018), ácidos retinoicos (HUANG et al., 2017), o ácido cafeico (PRECUPAS et al., 2017), a azilsartana (MARTÍNEZ et al., 2018), o ramipril (SHI et al., 2016a), a procaína (XIE et al., 2015a) (Figura 17D) e medicamentos cardiovasculares (NIAEI; HASSANZADEH; SHADJOU, 2018). As estruturas químicas de alguns destes estão representados na Figura 29, abaixo.

Figura 29. Estruturas químicas de distintas substâncias utilizadas em pesquisas de interação com albuminas séricas.



Fontes: (A) Gan et al., (2018), (B) Marcovic et al., (2018), (C) Pawar e Ottoor (2018) e (D) Kaur et al., (2018).

Como exemplo de pesquisa envolvendo a interação entre a BSA e um fármaco antineoplásico temos o estudo conduzido por (ABDI et al., 2012), no qual foi realizado experimentos a fim de se estabelecer a existência ou não da interação entre o fármaco 5-fluorouracil e a BSA, através de técnicas espectroscópicas. Os resultados mostraram que há interação entre ambos, fato que pode contribuir com novas informações sobre o mecanismo de ação do citado medicamento na terapia anticâncer.

3 METODOLOGIA

3.1 SEÇÃO QUÍMICA

3.1.1 Materiais e equipamentos

Os reagentes usados para obtenção dos compostos foram 3-indol-carboxaldeído, 5-bromo-indol-3-carboxaldeído, hidrazina hidratada, 1-naftil-isotiocianato, dimetil-acetilenodicarboxilato, dietil-acetilenodicarboxilato, 2,4-dibromoacetofenona, 2-bromoacetofenona, 2-bromo-4-cloroacetofenona. Quanto aos solventes, usou-se etanol absoluto, ácido acético glacial, metanol, diclorometano, acetato de etila, *n*-hexano. Todos os reagentes mencionados foram fornecidos pela *Sigma Aldrich*. Os solventes álcool etílico, diclorometano, ácido acético glacial foram fornecidos pela Química Moderna, Quimex e Dinâmica.

Para a determinação do ponto de fusão, foi utilizado um fusiômetro Fisatom modelo 431D (Fisatom, São Paulo, Brasil). Os derivados foram analisados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se placas de sílica gel Merk 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de 0,25 mm de espessura, reveladas na câmara de luz UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, França).

Para caracterização estrutural dos compostos químicos foi utilizada Espectroscopia de Infravermelho (IV) registrados num espectrofotômetro FTIR Bruker (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), utilizando pastilhas de KBr, com bandas de absorção expressas em cm^{-1} ; Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C) realizados em aparelhos Varian UnityPlus 300 MHz (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), utilizando DMSO- d_6 como solvente; Espectrometria de Massas realizada no aparelho MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

3.1.2 Procedimentos experimentais

3.1.2.1 Obtenção do intermediário tiossemicarbazida (LQIT/LT-34)

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1,0 g (4,6 mmol) do 1-naftil-isotiocianato correspondente em 30 mL de diclorometano. A mistura foi deixada em agitação magnética até a sua total solubilização. Em seguida foram adicionados 0,3 mL (9,3 mmol) de hidrato de hidrazina (50%). A reação ocorrida para a formação do citado intermediário foi a

adição nucleofílica entre 2 mols de hidrazina e 1 mol do 1-naftil-isotiocianato, usando o solvente diclorometano como dantes mencionado. A reação permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 1 hora. Houve precipitação da tiossemicarbazida durante a reação. Ao término do tempo previamente citado, a mistura foi filtrada e obtido um sólido esbranquiçado amorfo que foi recristalizado em sistema EtOH/H₂O. Logo após, foi dado prosseguimento às etapas subsequentes. À medida que as reações eram concluídas, usava-se Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para consolidar a formação do intermediário de interesse.

3.1.2.2 Obtenção dos intermediários tiossemicarbazonas (LQIT/LT-50 e LQIT/LT-51)

A obtenção dos compostos intermediários tiossemicarbazônicos LT-50 ((E)-2-((5-bromo-1H-indol-3-il) metileno-*N*-(naftalen-2-il) hidrazinacarbotioamida) e o LT-51 ((E)-2-((1H-indol-3-il) metileno-*N*-(naftalen-2-il) hidrazinacarbotioamida) se sucedeu através de uma reação de condensação em proporções equimolares, usando, como reagentes, a tiossemicarbazida obtida na etapa anterior (LT-34) para qual foram adicionados aldeídos indólicos em reações distintas, sendo eles o 3-indol-carboxaldeído (LQIT/LT-51) e o 5-bromo-indol-3-carboxaldeído (LQIT/LT-50), da seguinte forma: em um balão de fundo redondo foram adicionados, à temperatura ambiente, os aldeídos indólicos substituídos em 20 mL de etanol e 15 gotas de ácido acético glacial. A mistura foi deixada em agitação magnética até a sua total solubilização. Em seguida foram adicionados a tiossemicarbazida obtida na etapa anterior e a reação mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1h. Ao término do referido tempo, a mistura foi filtrada e obtido um sólido amorfo que foi recristalizado em sistema EtOH/H₂O. À medida que as reações eram concluídas, usava-se CCD para consolidar a formação das tiossemicarbazonas.

3.1.2.3 Obtenção dos derivados indol-tiazólicos (LQIT/JF's)

A síntese dos novos derivados indol-tiazólicos se sucedeu através de uma reação de ciclização em proporções equimolares, usando, como reagentes, as tiossemicarbazonas obtidas na etapa anterior, às quais foram adicionados os seguintes reagentes: dimetil-acetileno-dicarboxilato (JF's 249 e 253), dietil-acetileno-dicarboxilato (JF's 250 e 254), 2,4-dibromoacetofenona (JF's 251 e 255), 2-bromoacetofenona (JF's 252 e 256) e 2-bromo-4-

cloroacetofenona (JF's 257 e 258). As reações ocorreram à uma temperatura de 70-75°C, sob agitação magnética, por um período de 2 horas, usando etanol como solvente. Ao fim do tempo previamente indicado, a mistura foi filtrada e obtido um sólido amorfo que foi cristalizado em sistema EtOH/H₂O. À medida que as reações eram concluídas, usava-se CCD para consolidar a formação das tiazóis.

3.2 SEÇÃO BIOLÓGICA

3.2.1 Estudos de interação dos derivados indol-tiazólicos com ctDNA e BSA

3.2.1.1 Materiais e equipamentos

O DNA de timo bovino (ctDNA), bem como a BSA (albumina de soro bovino) e o brometo de etídio (BE) utilizados nas análises de interação foram adquiridos da Sigma-Aldrich. No preparo das soluções mãe dos compostos foi usado DMSO como solvente com posterior diluição em tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,6). Os espectros UV-vis, emissão de fluorescência e dicroísmo circular foram adquiridos em Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO, Espectrofluorímetro de JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão) e Espectropolarímetro JASCO (J-815 CD Spectrometer), respectivamente.

3.2.1.2 Estudos de interação com o ctDNA

Os ensaios de interação com ctDNA foram conduzidos mediante o uso das técnicas espectroscópicas de absorção UV-Vis, emissão fluorescente e dicroísmo circular, cujas metodologias estão discriminadas a seguir.

3.2.1.2.1 Preparo da solução de ctDNA

O insumo ctDNA foi dissolvido em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6) e deixado durante 24 h, à temperatura de 8°C, para sua estabilização. Após este período, a solução foi sonicada durante 30 minutos e sua concentração determinada utilizando o coeficiente de extinção molar 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987). A razão dos valores de absorbância em 260 e 280 nm foi utilizada para verificar o grau de pureza da

solução do ctDNA. Após o preparo da solução, esta foi armazenada em refrigeração, a uma temperatura de -20°C, com o propósito de ser reutilizada, posteriormente. As soluções-testes usadas nestes experimentos foram preparadas em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6), em duplicata.

3.2.1.2.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução mãe) e as soluções para análise foram preparadas em duplicata, numa concentração de 25 µM e exposição a solução de ctDNA nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM. As soluções-teste contendo os derivados e o ctDNA foram homogeneizadas e deixadas em repouso, à temperatura ambiente por 10 minutos para estabilização destes no tampão e, posteriormente, submetidas a análise absorviva. Todas as amostras foram analisadas no espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO, utilizando uma cubeta de quartzo retangular com comprimento de 1cm óptico de percurso. Nesta análise da interação dos derivados com o ctDNA, os espectros de absorbância foram registrados por varredura na faixa de comprimento de onda entre 200-600 nm. As concentrações usadas nas soluções-testes foram previamente definidas após a realização de uma varredura do perfil absorvivo dos compostos-teste livres.

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

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

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

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

3.2.1.2.3 Estudos fluorescentes de deslocamento do Brometo de Etídio (BE) com os compostos-testes

Inicialmente, a emissão fluorescente do BE foi medida na ausência e na presença do ctDNA, na concentração de 20 μM do BE e 100 μM do ctDNA, após 10 min de incubação à temperatura ambiente. As medições foram realizadas à temperatura ambiente, usando uma cubeta de quartzo retangular com caminho óptico de 1 cm de percurso e o espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão). Os espectros de fluorescência foram obtidos por excitação em 526 nm e varredura da emissão de 550 a 700 nm. A largura das fendas de excitação e de emissão foram 2,5 e 5 nm, respectivamente, com velocidade de 100nm/min. Para análise do deslocamento do intercalador BE pelos compostos testes, as soluções contendo BE-ctDNA foram preparadas na presença dos derivados nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 μM , em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6), em duplicata. As soluções foram homogeneizadas e deixadas de repouso por 10 minutos para estabilização no tampão e, posteriormente, submetidas a análise da fluorescência. As concentrações usadas nas soluções-testes foram previamente definidas após a realização de uma varredura do perfil absorptivo dos compostos-teste livres. O comportamento de supressão de emissão foi analisado através da equação de Stern-Volmer (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006):

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

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença dos derivados indólicos-tiazólicos. K_{sv} é a constante de supressão linear. $[Q]$ representa a concentração do composto. O gráfico da intensidade emissão relativa (F_0/F) versus $[Q]$ foi utilizado para obtenção da constante a partir da regressão linear do gráfico. Os dados de ligação foram obtidos a partir do software de SigmaPlot 10.0.

3.2.1.2.4 Espectroscopia de dicroísmo circular

As soluções dos compostos-teste usadas neste ensaio foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução mãe). As soluções finais de ctDNA (100 μM) e dos derivados (25 μM) foram homogeneizadas e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos para atingir o equilíbrio e, posteriormente, submetidas a análise absorptiva. As medições foram realizadas na faixa de 230 a 400 nm, com velocidade de 100 nm/min e banda de feixe de luz

de 1 nm usando uma cubeta de quartzo retangular, mediante a operação do espectropolarímetro JASCO (J-815 CD Spectrometer). Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software de SigmaPlot 10.0.

3.2.1.2.5 Estudos de medição da Viscosidade

Nos estudos de interação dos derivados LQIT/JF's com o ctDNA, através da técnica de viscosidade, foram preparadas soluções de ctDNA numa concentração de 100 μM e dos compostos-testes nas concentrações de 0, 12, 24, 36, 48 e 60 μM , em duplicata. Também foi preparada uma solução de ctDNA, à qual foram acrescentados 0, 12, 24, 36, 48 e 60 μM da mesma sonda fluorescente intercalante usada nos estudos de fluorescência anteriormente apresentados: o brometo de etídio (BE), no intuito de usá-la como padrão de intercalação para comparar com os resultados dos experimentos com os derivados propostos e definir mais precisamente o modo de interação destes com a citada biomolécula.

As medições da viscosidade foram realizadas usando um viscosímetro Stabinger Vicometer - Anton Paar (SVM 3000/G2). Estes estudos foram realizados a uma temperatura de 25 °C. Os dados relativos à viscosidade relativa das soluções de DNA na presença e ausência dos derivados indol-tiazólicos e do BE foram plotados no programa SigmaPlot 10.0, usando a fórmula $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus R = relação entre as concentrações do complexo ctDNA-ligante / concentração do ctDNA livre (sem o ligante), onde η é a viscosidade do DNA na presença dos ligantes e η_0 é a viscosidade do DNA na ausência destes (COHEN; EISESBERG, 1969).

3.2.1.3 Estudos de interação com a BSA

Os ensaios de interação com a BSA foram conduzidos mediante o uso das técnicas espectroscópicas de absorção UV-Vis, emissão fluorescente, cujas metodologias estão discriminadas a seguir.

3.2.1.3.1 Preparo da solução de BSA

O insumo BSA foi dissolvido em 10 mL de tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6). Após o preparo da solução, esta era armazenada em refrigeração, a uma temperatura de -20°C, com o propósito de ser reutilizada, posteriormente. As soluções-testes usadas nestes experimentos

foram preparadas em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,6), em duplicata.

3.2.1.3.2 Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução mãe). As soluções-teste foram preparadas em duplicata, fixando-se a concentração do composto em 40 μ M e variando-se a concentração da BSA nas seguintes concentrações 5, 10, 20, 40 e 80 μ M. A mistura dos composto-teste com a BSA foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilização e, posteriormente, submetidas a análise absorptiva em UV-vis por meio de varredura entre 200-600 nm. O aparecimento de alterações no comportamento absorptivo dos compostos na presença da BSA pode indicar a ocorrência de uma interação, pela formação do complexo biomolécula-ligante. A partir desta análise, é possível coletar informações significativas ao ponto destas evidenciarem o modo de interação, bem como calcular os valores relativos às constantes de ligação, revelando uma maior ou menor afinidade da biomolécula pelo composto-teste. Assim como na interação com o ctDNA, a constante de ligação intrínseca (K_b) da BSA foi obtida através da equação de (MCGHEE; HIPPEL, 1974):

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

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

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

3.2.1.3.3 Espectroscopia de emissão fluorescente

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

Na citada análise de interação, os espectros de emissão foram registrados na região de

310-400 nm usando um comprimento de onda de excitação de 285 nm, com bandas de excitação e de emissão de 2,5 nm.

Todas as medições foram realizadas a uma temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento de 1 cm de percurso. O comportamento de supressão de emissão foi analisado através da equação de Stern-Volmer (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006):

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

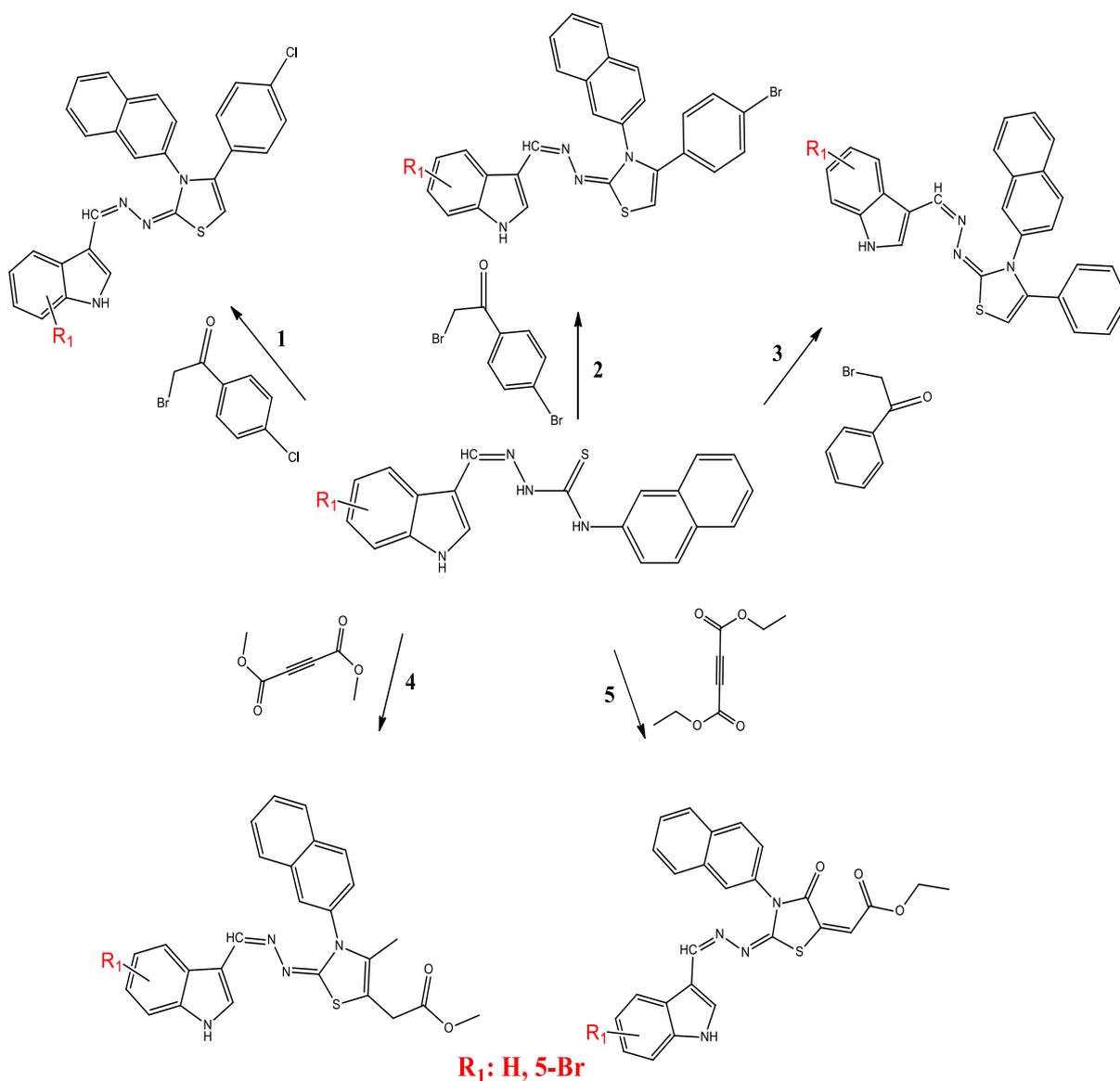
onde, F₀ e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença dos derivados indólicos-tiazólicos. K_{sv} é a constante de supressão linear. [Q] representa a concentração do composto. O gráfico da intensidade emissão relativa (F₀/F) versus [Q] foi utilizado para obtenção da constante a partir da regressão linear do gráfico. Os dados de ligação foram obtidos a partir do software de SigmaPlot 10.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEÇÃO QUÍMICA

A rota sintética empregada na obtenção dos novos derivados indol-tiazólicos mostrou-se eficiente, pois todos os compostos propostos foram obtidos com êxito por meio de lavagens e recristalização. O diagrama de síntese dos compostos obtidos pode ser visualizado no esquema 2, a seguir:

Esquema 2. Mecanismo de formação dos derivados indol-tiazólicos.

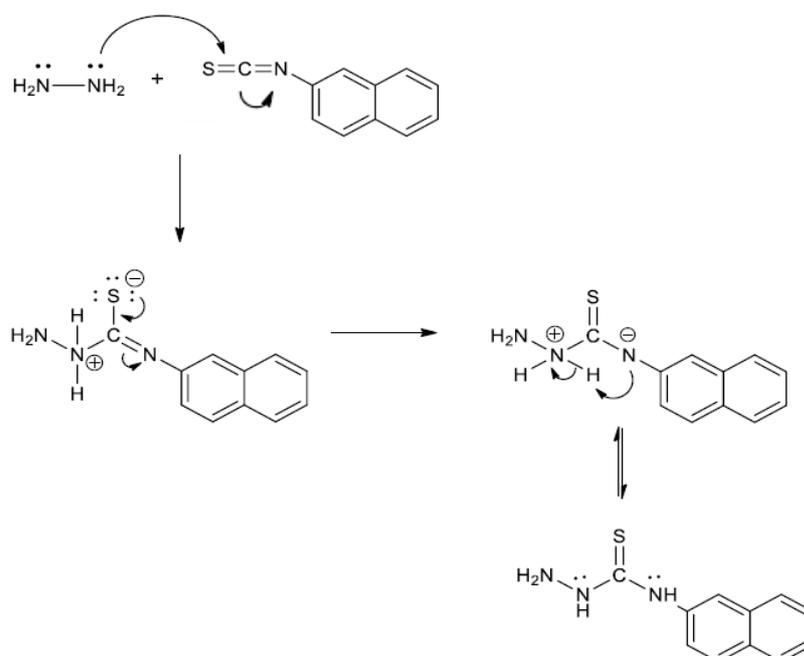


A formação dos tiazóis ocorreu em três etapas: a primeira delas consiste no mecanismo de S-alkilação que se inicia pela condensação dos diferentes reagentes

(acetofenonas e os acetilenodicarboxilatos) com o átomo de enxofre. Na segunda etapa ocorre um ataque intramolecular do par de elétrons livres do nitrogênio (N4) na carbonila, seguido da liberação de etanol, gerando a reação de ciclização das tiossemicarbazonas obtidas na etapa anterior, conduzindo a formação dos novos derivados indol-tiazólicos (CHAUBET et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, três etapas foram utilizadas na síntese dos novos derivados propostos nesse estudo, as quais serão discutidas, a seguir. A primeira etapa está elucidada no esquema 3, abaixo:

Esquema 3. Mecanismo de formação do composto intermediário tiossemicarbazida LQIT/LT-34.

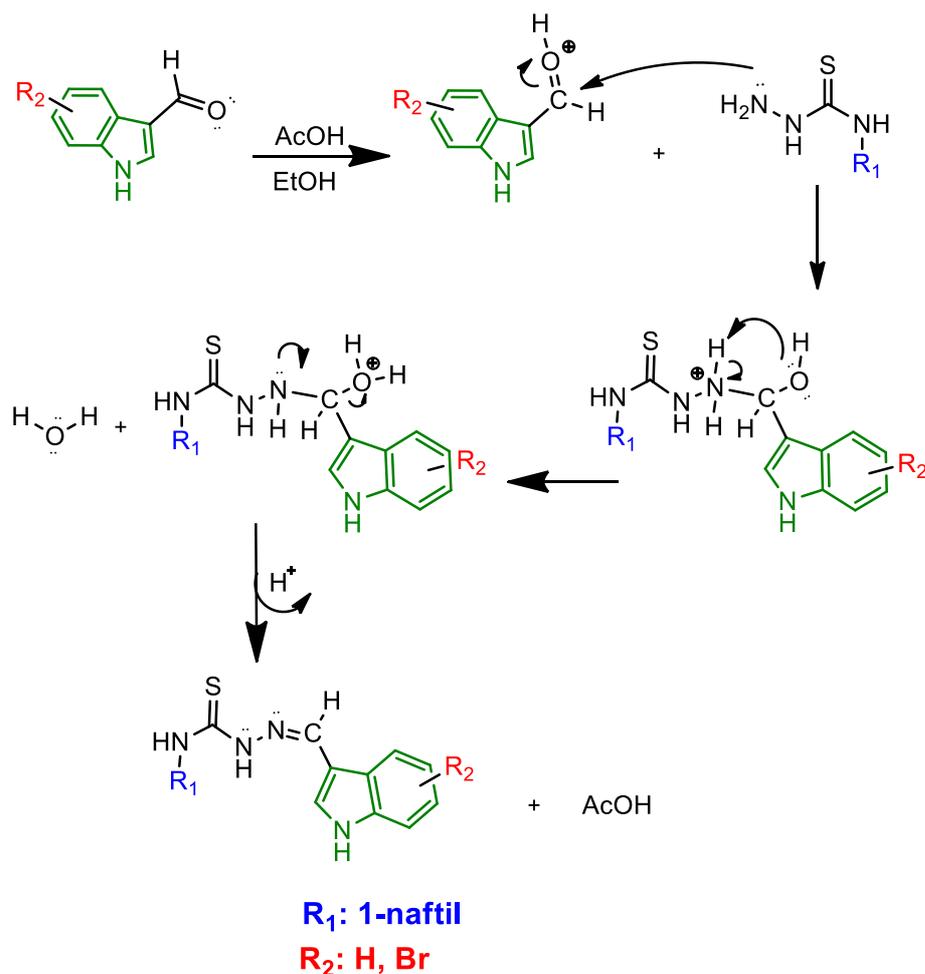


O mecanismo mostrado no esquema 3 acima representa a formação do primeiro composto intermediário: uma tiossemicarbazida (LT-34). Esta reação caracteriza-se por um ataque simultâneo do nitrogênio do hidrato de hidrazina ao carbono da tiocarbonila, desfazendo a ligação *pi* (π), a qual foi deslocada para o nitrogênio vizinho, conduzindo aos derivados tiossemicarbazônicos (TENÓRIO et al., 2005).

As tiossemicarbazidas previamente sintetizadas, serviram como intermediárias na obtenção das tiossemicarbazonas finais (LQIT/LT-50 e LQIT/LT-51). Para tal, foram utilizados os aldeídos aromáticos indol-3-carboxaldeído e o 5-bromo-3-indol-carboxaldeído, os quais reagiram, usando-se etanol como solvente, na presença de ácido acético glacial, à temperatura ambiente. O esquema 4 mostra a obtenção dos compostos intermediários tiossemicarbazonas, cuja etapa é caracterizada por uma reação de condensação. Neste

mecanismo, por meio da utilização do ácido acético, ocorre a ativação da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no nitrogênio da amina da tiossemicarbazida, ataca o carbono positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final (AQUINO et al., 2008).

Esquema 4. Mecanismo de formação dos compostos intermediários tiossemicarbazonas LQIT/LT-50 e LT-51.



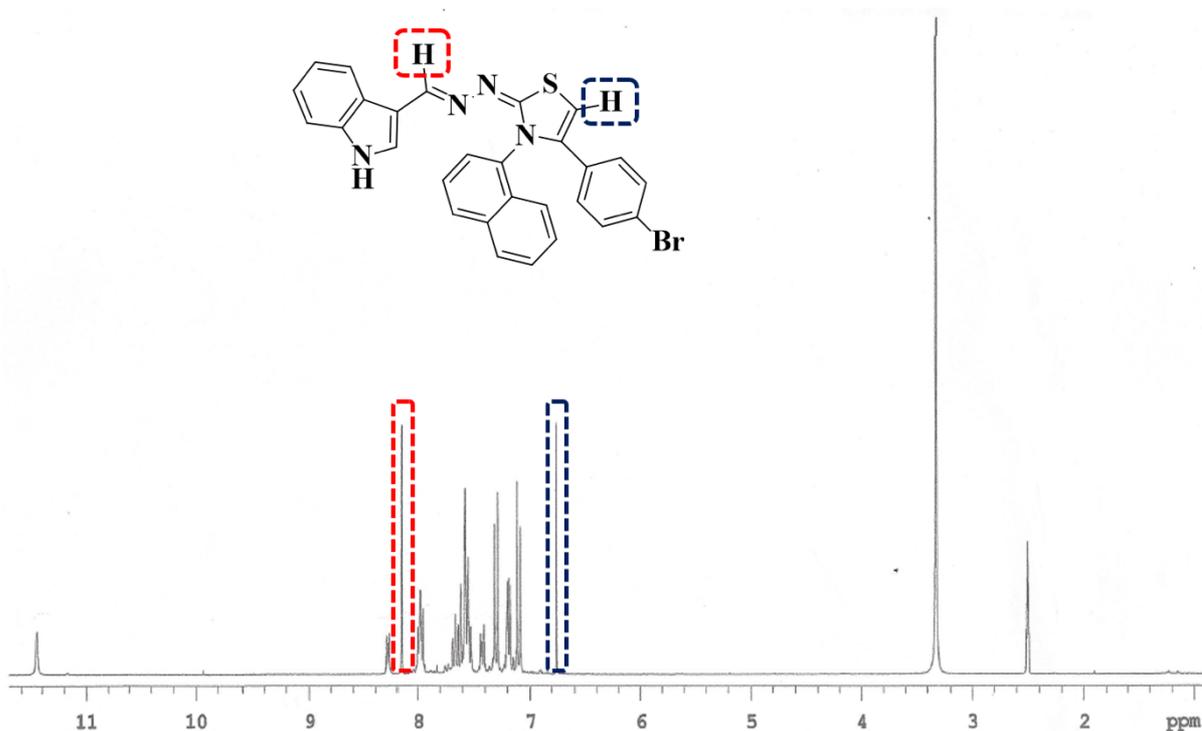
Por sua vez, as tiossemicarbazonas produzidas na etapa anterior foram usadas no procedimento final de obtenção dos derivados, a partir da reação com distintos reagentes (discriminados na metodologia da seção química).

4.1.1 Caracterização estrutural dos derivados indol-tiazólicos

No intuito de elucidar a estrutura química dos novos derivados LQIT/JF's sintetizados, foram realizadas análises de Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (^1H) e de Carbono (^{13}C) e infravermelho (IV). Nos espectros de RMN, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hertz (Hz). A espectroscopia de IR revelou bandas e estiramentos característicos relativos aos núcleos indol e tiazol. Já a espectroscopia de RMN elucidou os hidrogênios e carbonos da estrutura dos nossos compostos. A espectrometria de massas serviu como ferramenta na caracterização da massa molecular dos compostos obtidos. Para uma melhor análise, escolhemos o composto JF-251 para discorrer sobre a sua caracterização estrutural.

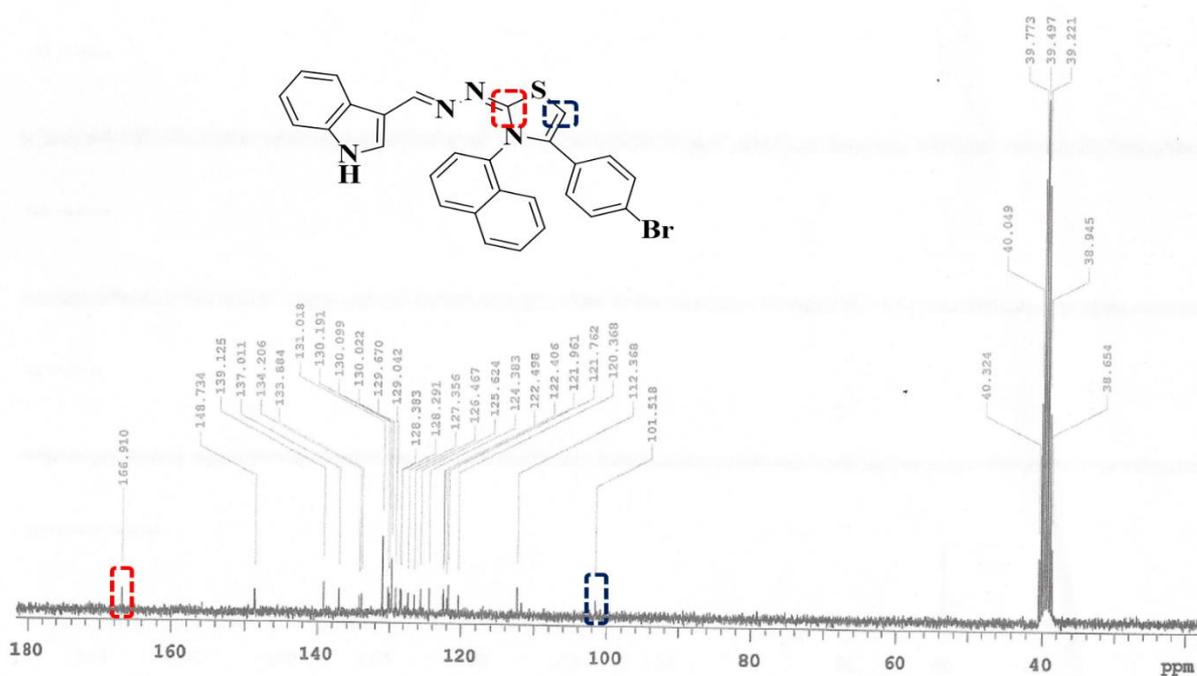
O espectro de RMN ^1H do composto JF-251 (Figura 30) revelou sinais referentes às porções aromáticas (indol, naftil, *p*-bromofenil) presentes na região de 7,10 ppm a 11,45 ppm. Além disso, foi possível constatar a presença de sinais diagnósticos para a formação do núcleo tiazólico, são eles: singleto em 6,76 ppm (destaque em azul), relativo ao CH do núcleo tiazol e outro singleto em 8,14 ppm (destaque em vermelho), relacionado ao hidrogênio da porção azometínica (N=CH). Vale ressaltar ainda a ausência do singleto em torno de 9,47 ppm (relativo ao intermediário tiossemicarbazona), que confirma o processo de ciclização (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 30. Espectro de RMN ^1H do composto JF-251.



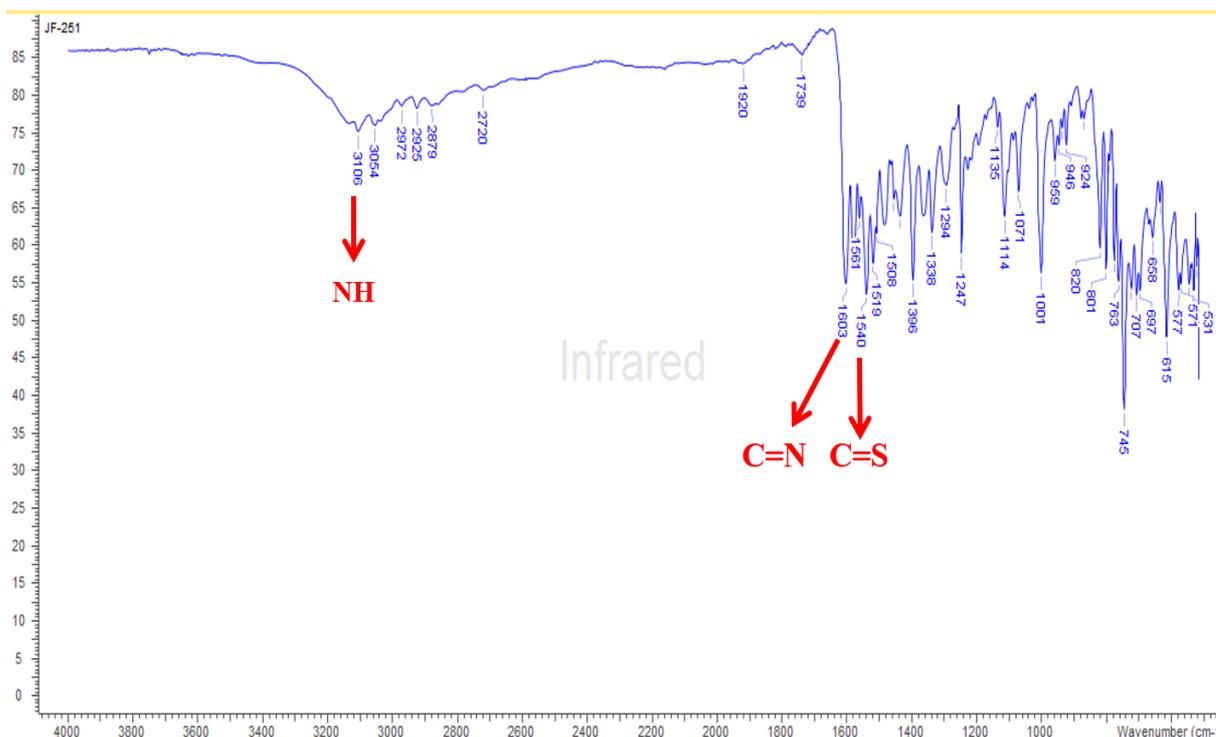
Por sua vez, o espectro de RMN ^{13}C (Figura 31) indicou os sinais diagnósticos da formação do núcleo tiazol, sendo eles: 101,5 ppm referente ao C5 (CH, destaque em azul) e 169,9 ppm, relacionado ao C2 (N=C-S, destaque em vermelho).

Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C do composto JF-251.

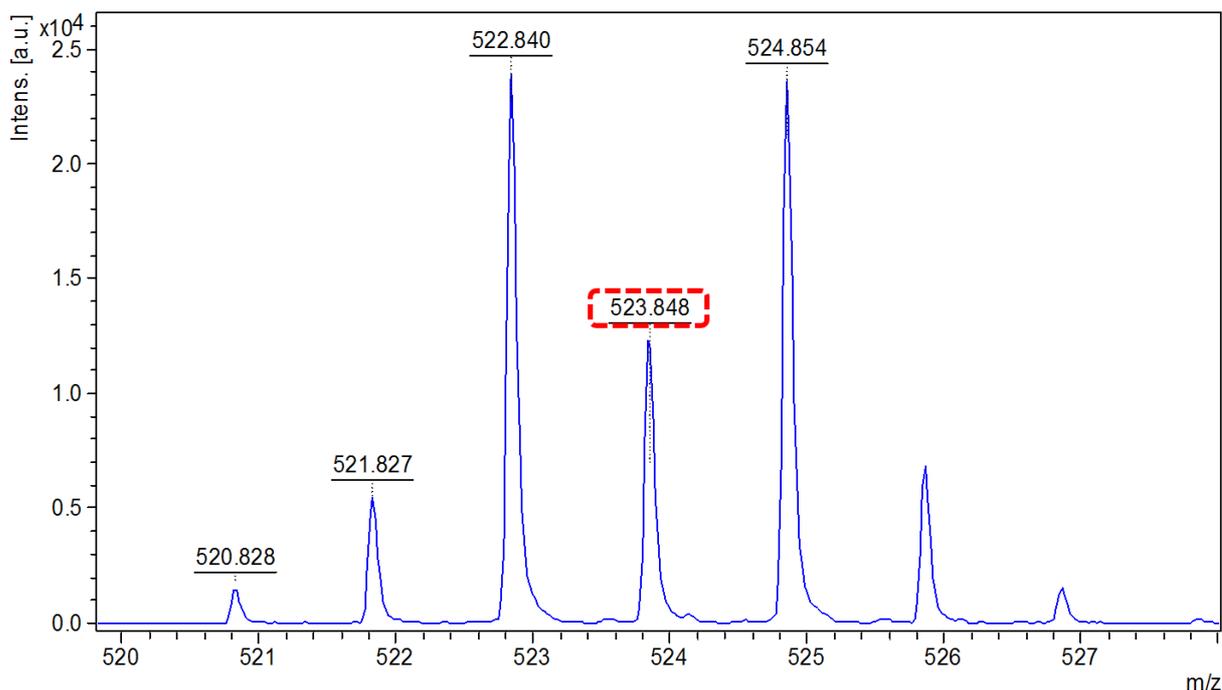


De modo complementar, a presença de algumas funções orgânicas foram verificadas a partir da espectroscopia de IV que apresentou as seguintes bandas de absorção: 3106 cm^{-1} (NH), 1581 cm^{-1} (CN) e 1540 cm^{-1} (CS), indicadas na Figura 32, a seguir.

Figura 32. Espectro de infravermelho do composto JF-251.

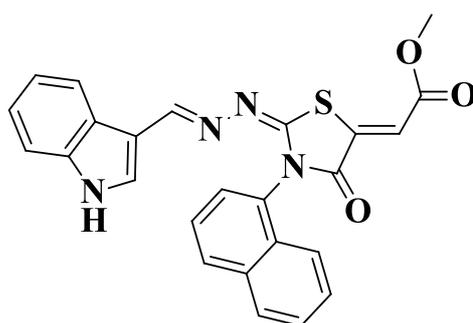


A espectrometria de massa apontou uma correspondência significativa entre a massa calculada do composto JF-251 ($523,5395$) e àquela obtida ($523,848$), conforme o espectro mostrado na Figura 33 abaixo:

Figura 33. Espectro de massas do composto JF-251.

4.1.1.1 Dados espectroscópicos, espectrométricos e físico-químicos dos derivados indol-tiazólicos

4.1.1.1.1 (*E*)-2 - (((*E*) - (1*H*-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) - 4-metil-3- (naftalen-1-il) - 2,3-di-hidrotiazol-5-carboxilato (JF-249)



Composto JF-249 obtido na forma sólida e de cor amarelada (C₂₅H₂₀N₄O₂S).

Rendimento: 65%. **Faixa de fusão:** 249-251°C. **Rf** 0,63 (*n*- hexano/acetato de etila, 1:1).

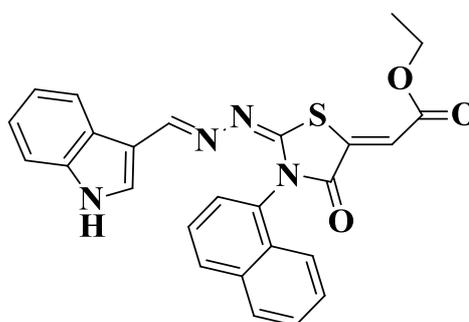
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 3,88 (s, 3H, OCH₃), 6,86 (s, 1H, CH), 7,38 (dd, *J* = 2,4 Hz/ 8,7 Hz, 1H, CH do indol), 7,46 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH do indol), 7,55-7,83 (m, 5H, CH do naftil; 2H, CH do indol), 8,07-8,15 (m, 2H, CH do naftil), 8,39 (s, 1H, N=CH), 8,40 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, CH do indol), 11,94 (s, 1H, NH do indol).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 52,5 (OCH₃), 110,9 (CH), 113,8 (C, naftil), 114,2 (CH, indol), 115,0 (C, tiazolidinona), 122,3 (CH, naftil), 124,1 (CH, indol), 125,4 (CH, indol), 125,7 (CH, naftil), 126,0 (CH, naftil), 127,2 (CH, naftil), 127,4 (CH, naftil), 128,3 (CH, indol), 129,2 (CH, naftil), 129,8 (C, naftil), 131,0 (CH, indol), 133,8 (C, indol), 134,3 (C, indol), 135,9 (C, indol), 141,6 (C, naftil), 155,8 (C, N=CH), 157,0 (N-C=O), 164,4 (C, C=O), 165,7 (S-C-N).

IV (KBr, cm^{-1}): 3335 (NH), 1700 (C=O), 1529 (C=S), 1574 (C=N).

MS (M+1): calculado = 454.5435; encontrado = 454.347.

4.1.1.1.2 (E) -2 - ((E) -2 - (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4-oxotiazolidin-5- ilideno) acetato (JF-250)



Composto JF-250 obtido na forma sólida e de cor amarelada (C₂₆H₂₀N₄O₃S).

Rendimento: 84%. **Faixa de fusão:** 261-263°C. **Rf** 0,59 (*n*- hexano/acetato de etila, 1:1).

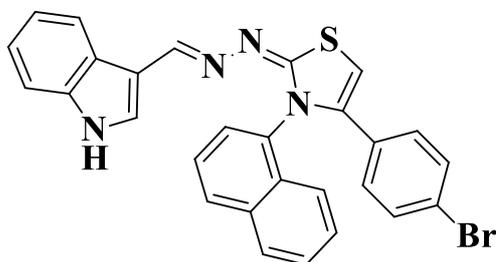
RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 11.86 (s, 1H, indólico), 8.58 (s, 1H, imínico), 8.18-8.21 (m, 1H, indólico), 7.94 (d, 1H, J= 2.4 Hz, indólico), 7.63 (t, 3H, J= 8.10 Hz, fenílico), 7.52 – 7.24 (m, 8H, indólico/naftílico/fenílico/tiazolínicos e vinílico), 3.44 (q, 2H, J= 7.2 Hz, etílico), 1.05 (t, 3H, J= 7.2 Hz, etílico).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 165.44 (Cq), 164.45 (Cq), 156.48 (Cq), 156.26 (CH), 141.83 (Cq), 137.23 (Cq), 133.86 (Cq), 133.45 (Cq), 131.10 (CH), 129.83 (Cq), 129.25 (Cq), 128.38 (CH), 127.46 (CH), 127.23 (CH), 126.69 (CH), 125.79 (CH), 124.36 (CH), 122.98 (CH), 122.38 (CH), 121.69 (CH), 121.13 (CH), 115.07 (CH), 112.24 (CH), 111.42 (CH), 61.46 (CH₂) e 14.07 (CH₃).

IV (KBr, cm^{-1}): 3395 (NH), 1716 (C=O), 1530 (C=S), 1578 (C=N).

MS (M+1): calculado = 468.5270; encontrado = 468.978.

4.1.1.1.3 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -4- (4-bromofenil) -3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol (JF-251)



Composto JF-251 obtido na forma sólida e de cor amarelada (C₂₈H₁₉BrN₄S).

Rendimento: 72%. **Faixa de fusão:** 249-250°C. **Rf** 0,64 (*n*- hexano/acetato de etila, 1:1).

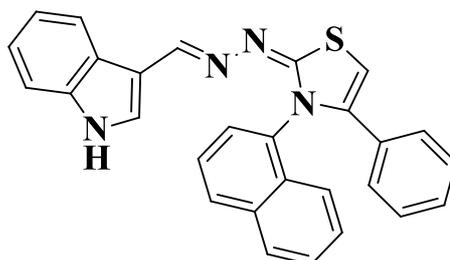
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 6,76 (s, 1H, CH do tiazol), 7,10 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH do *p*-bromofenil), 7,17-7,20 (m, 2H, CH do naftil), 7,30 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CH do *p*-bromofenil), 7,40-7,43 (m, 1H, CH do indol), 7,52-7,58 (m, 5H, CH do naftil), 7,61-7,66 (m, 1H, CH do indol), 7,95-8,00 (m, 2H, CH do naftil), 8,14 (s, 1H, N=CH), 8,26-8,29 (m, 1H, CH do indol), 11,45 (s largo, 1H, NH do indol).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 101,5 (CH, tiazol), 112,3 (CH, indol), 120,4 (CH, *p*-bromofenil), 121,7 (CH, indol), 121,9 (C, *p*-bromofenil), 122,4 (CH, naftil; C, *p*-bromofenil), 124,3 (CH, *p*-bromofenil), 125,6 (C, naftil), 126,4 (CH, naftil), 127,3 (CH, naftil), 128,2 (CH, naftil), 128,3 (CH, indol), 129,0 (CH, naftil), 129,6 (C, naftil), 130,0 (C, indol; CH, naftil), 130,1 (CH, indol), 133,8 (C, indol), 134,2 (C, naftil), 137,0 (C, indol), 139,1 (C, tiazol), 148,7 (N=CH), 166,9 (C, S-C-N).

IV (KBr, cm⁻¹): 3106 (NH), 1540 (C=S), 1581 (C=N).

MS (M+1): calculado = 523.4463; encontrado = 523.848.

4.1.1.1.4 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -3- (naftalen-1- il) -4-fenil-2,3-di-hidrotiazol (JF-252)



Composto JF-252 obtido na forma sólida e de cor marrom claro (C₂₈H₂₀N₄S).

Rendimento: 95%. **Faixa de fusão:** 264-265°C. **Rf** 0,41 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

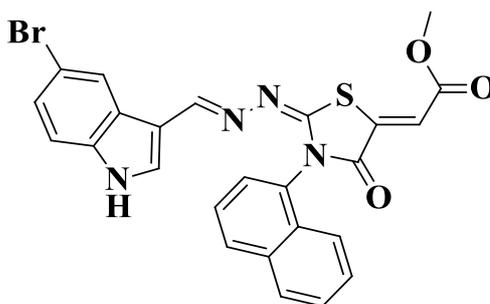
RMN 1H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 11.64 (s, 1H, indólico), 8.49 (s, 1H, indólico), 8.13 (s, 1H, imínico), 7.95 (d, 2H, J= 8.4 Hz, naftílico), 7.71 (d, 1H, J= 9.3 Hz, indólico), 7.62 (d, 1H, J= 7.8 Hz, naftílico), 7.60 (t, 1H, J= 7.5 Hz, naftílico) 7.57 (d, 1H, J= 7.5 Hz, naftílico), 7.55 (d, 2H, J= 7.8 Hz), 7.42 – 7.31 (dd, 2H, J= 8.7 Hz, indólico), 7.17 – 7.08 (m, 6H, fenílico/indólico), 6.75 (s, 1H, tiazolínicos).

RMN 13C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 101,5 (CH, tiazol), 112,3 (CH, indol), 120,4 (CH, *p*-bromofenil), 121,7 (CH, indol), 121,9 (C, *p*-bromofenil), 122,4 (CH, naftil; C, *p*-bromofenil), 124,3 (CH, *p*-bromofenil), 125,6 (C, naftil), 126,4 (CH, naftil), 127,3 (CH, naftil), 128,2 (CH, naftil), 128,3 (CH, indol), 129,0 (CH, naftil), 129,6 (C, naftil), 130,0 (C, indol; CH, naftil), 130,1 (CH, indol), 133,8 (C, indol), 134,2 (C, naftil), 137,0 (C, indol), 139,1 (C, tiazol), 148,7 (N=CH), 166,9 (C, S-C-N).

IV (KBr, cm⁻¹): 3107 (NH), 1542 (C=S), 1603 (C=N).

MS (M+1): calculado = 444.5502; encontrado = 444.311.

4.1.1.1.5 (*E*)-2-(((*E*)-(5-bromo-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazinilideno)-4-metil-3-(naftalen-1-il)-2,3-di-hidrotiazol-5-carboxilato (JF-253)



Composto JF-253 obtido na forma sólida e de cor alaranjada (C₂₆H₂₁BrN₄O₂S).

Rendimento: 85%. **Faixa de fusão:** 238°C. **Rf** 0,50 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

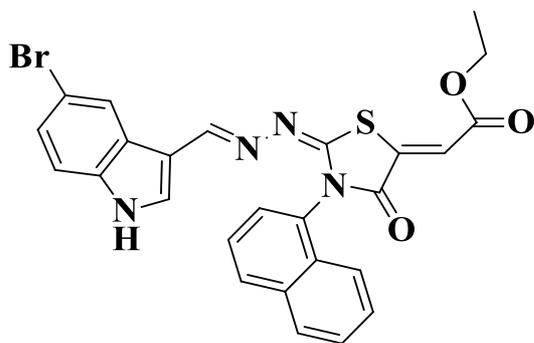
RMN 1H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 3,87 (s, 3H, OCH₃), 6,86 (s, 1H, CH), 7,45-7,48 (m, 1H, CH do indol), 7,55-7,78 (m, 5H, CH do naftil; 2H, CH do indol), 8,07-8,14 (m, 2H, CH do naftil), 8,22 (d, J = 2,0 Hz, 1H, CH do indol), 8,39 (s, 1H, N=CH), 11,74 (s, 1H, NH do indol).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 52,7 (OCH₃), 111,5 (CH), 114,8 (CH, indol), 115,5 (C, tiazolidinona), 122,4 (CH, naftil), 122,8 (C, indol), 125,1 (CH, naftil), 125,91 (CH, indol), 125,98 (CH, naftil), 126,8 (CH, naftil), 127,3 (CH, naftil), 127,5 (CH, naftil), 128,5 (CH, indol), 129,3 (CH, naftil), 129,9 (C, naftil), 131,1 (CH, indol), 133,5 (C, indol), 133,9 (C, indol), 135,7 (C, indol), 142,7 (C, naftil), 156,4 (C, N=CH), 156,5 (N-C=O), 164,5 (C, C=O), 166,3 (S-C-N).

IV (KBr, cm^{-1}): 3059 (NH), 1722 (C=O), 1528 (C=S), 1604 (C=N).

MS (M+1): calculado = 533.4395; encontrado = 533.376.

4.1.1.1.6 (E) -2- ((E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4- oxotiazolidin-5-ilideno) acetato (JF-254)



Composto JF-254 obtido na forma sólida e de cor amarelada (C₂₆H₁₉BrN₄O₃S).

Rendimento: 88%. **Faixa de fusão:** 232-233°C. **Rf** 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

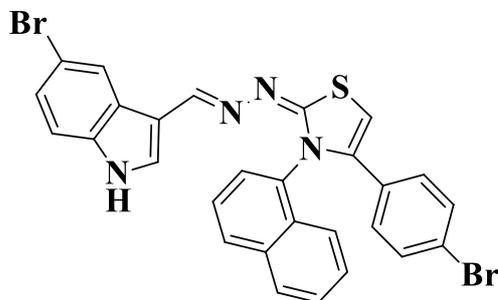
RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 1,34 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, OCH₃), 4,35 (q, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH₂), 6,83 (s, 1H, CH), 7,38 (d, $J = 2,4$ Hz/ 8,7 Hz, 1H, CH do indol), 7,45 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, CH do indol), 7,57-7,79 (m, 5H, CH do naftil; 1H, CH do indol), 7,83 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H, CH do indol), 8,07-8,15 (m, 2H, CH do naftil), 8,38 (s, 1H, CH do indol; 1H, N=CH), 11,94 (d, $J = 2,1$ Hz, NH do indol).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ ppm: 14,2 (OCH₃), 61,4 (CH₂), 110,9 (CH), 113,8 (C, naftil), 114,2 (CH, indol), 115,4 (C, tiazolidinona), 122,4 (CH, naftil), 124,0 (CH, indol), 125,5 (CH, indol), 125,8 (CH, naftil), 126,0 (CH, naftil), 126,7 (CH, naftil), 127,2 (CH, naftil), 127,4 (CH, naftil), 128,3 (CH, indol), 129,2 (CH, naftil), 131,0 (CH, indol), 133,8 (C, indol), 134,4 (C, indol), 135,9 (C, indol), 141,3 (C, naftil), 155,8 (N=CH), 156,9 (C, N-C=O), 164,4 (C, C=O), 165,2 (C, S-C-N).

IV (KBr, cm^{-1}): 3328 (NH), 1696 (C=O), 1542 (C=S), 1063 (C=N).

MS (M+1): calculado = 547.4231; encontrado = 548.803.

4.1.1.1.7 (E)-2-(((E)-(5-bromo-1H-indol-3-yl)metileno)-hidrazinilideno)-4-(4-bromofenil)-3-(naftalen-1-il)-2,3-di-hidrotiazol (JF-255)



Composto JF-255 obtido na forma sólida e de cor verde claro (C₂₈H₁₈Br₂N₄S).

Rendimento: 60%. **Faixa de fusão:** 285-286° C. **Rf** 0,47 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

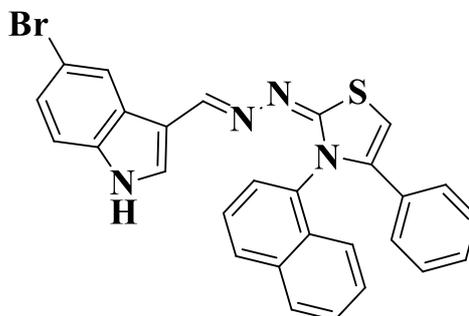
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 6,75 (s, 1H, CH), 7,10 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, CH do *p*-bromofenil), 7,18-7,21 (m, 1H, CH do indol), 7,29 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CH do *p*-bromofenil), 7,41-7,44 (m, 1H, CH do indol), 7,52-7,69 (m, 5H, CH do naftil; 1H, CH do indol), 7,95-7,99 (m, 2H, CH do naftil), 8,15 (s, 1H, N=CH), 8,27-8,30 (m, 1H, CH do indol), 11,45 (s largo, 1H, NH do indol).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 101,5 (CH), 111,8 (CH, indol), 112,4 (CH, indol), 120,4 (CH, *p*-bromofenil), 121,8 (C, *p*-bromofenil), 122,0 (CH), 122,4 (CH, naftil), 122,5 (C, *p*-bromofenil), 124,4 (CH, *p*-bromofenil), 125,6 (CH, naftil), 127,4 (CH, naftil), 128,3 (CH, indol), 129,1 (CH, naftil), 129,7 (C, naftil), 130,0 (C, indol), 130,1 (C, naftil), 130,2 (CH, naftil), 131,0 (CH, indol), 133,9 (C, indol), 134,2 (C, naftil), 137,0 (C, indol), 139,1 (C, indol), 148,7 (N=CH), 166,9 (S-C-N).

IV (KBr, cm⁻¹): 3107 (NH), 1540 (C=S), 1604 (C=N).

MS (M+1): calculado = 602.3423; encontrado = 603.3764

4.1.1.1.8 (E) -2- (((E) - (5-bromo-1H-indol-3-il) metileno) - hidrazinilideno) -3- (naftalen-1-il) -4-fenil-2,3-di-hidrotiazole (JF-256)



Composto JF-256 obtido na forma sólida e de cor verde claro (C₂₈H₁₉BrN₄S).

Rendimento: 60%. **Faixa de fusão:** 297° C. **Rf** 0,55 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4).

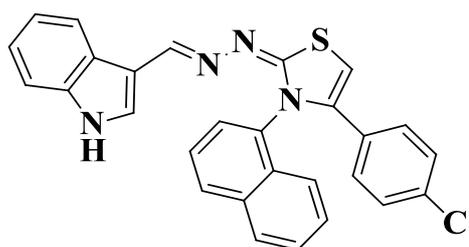
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.44 (s, 1H, indólico), 8.29 (m, 1H, indólico), 8.14 (s, 1H, imínico), 7.95 (t, 2H, J= 7.5 Hz, naftílico), 7.69 (d, 1H, J= 6.3 Hz, indólico), 7.60 – 7.51 (m, 5H, indólico/naftílico/fenílico), 7.43 – 7.41 (m, 1H, indólico), 7.21 – 7.07 (m, 6H, fenílico/indólico), 6.69 (s, 1H, tiazolínicos).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.14 (Cq), 148.55 (CH), 140.34 (Cq), 137.02 (Cq), 134.50 (Cq), 133.87 (Cq), 130.84 (CH), 130.34 (CH), 130.01 (Cq), 128.89 (Cq), 128.38 (CH), 128.32 (CH), 128.23 (CH), 127.99 (CH), 127.69 (CH), 127.25 (CH), 126.40 (CH), 125.59 (CH), 124.41 (Cq), 122.62 (CH), 122.40 (CH), 121.99 (Cq), 120.36 (CH), 112.43 (Cq), 111.76 (CH), 100.70 (CH).

IV (KBr, cm⁻¹): 3483 (NH), 1552 (C=S), 1599 (C=N).

MS (M+1): calculado = 523.4463; encontrado = 524.377.

4.1.1.1.9 (E) -2- (((E) - (1H-indol-3-il) metileno) hidrazinilideno) -4- (4- clorofenil) -3- (naftalen-1-il) -2,3-di-hidrotiazol (JF-257)



Composto JF-257 obtido na forma sólida e de cor amarelo escuro (C₂₈H₁₉ClN₄S).

Rendimento: 78%. **Faixa de fusão:** 149-150° C. **Rf** 0,67 (*n*- hexano/acetato de etila, 8:2).

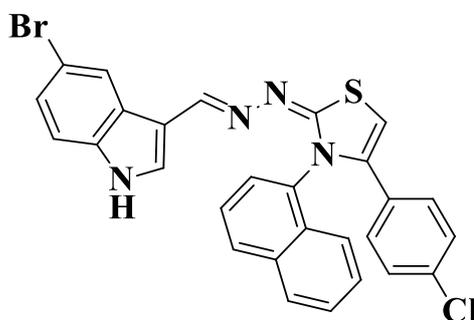
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): Em análise.

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): Em análise.

IV (KBr, cm⁻¹): 3347 (NH), 1531 (C=S), 1599 (C=N).

MS (M+1): calculado = 478.9953; encontrado = 479.802.

4.1.1.10 (*E*)-2-(((*E*)-(5-bromo-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazinilideno)-4-(4-clorofenil)-3-(naftalen-1-il)-2,3-di-hidrotiazol (JF-258)



Composto JF-258 obtido na forma sólida e de cor amarelada (C₂₈H₁₈BrClN₄S).

Rendimento: 83%. **Faixa de fusão:** 189-190° C. **Rf** 0,67 (*n*- hexano/acetato de etila, 8:2).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): Em análise.

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): Em análise.

IV (KBr, cm⁻¹): 3347 (NH), 1531 (C=S), 1599 (C=N).

MS (M+1): calculado = 557.8913; encontrado = 558.746.

4.2 SEÇÃO BIOLÓGICA

4.2.1 Estudos espectroscópicos de interação com o ctDNA

4.2.1.1 Ensaio espectroscópicos de absorção UV-vis

Inicialmente, foi realizada uma varredura de absorção de todos os compostos-testes na ausência do ctDNA, a fim de analisar o comportamento absorptivo de cada um destes no sistema tamponado em Tris HCl (0,1 M; pH 7,6), os quais apresentaram absorção numa faixa

de comprimento de onda entre 300-420 nm, o que já era presumido por se tratar de substâncias cuja estrutura química é constituída, entre outras características, de anéis aromáticos, heterociclos insaturados e com grupos de átomos portadores de pares de elétrons desemparelhados (KUMAR, 2006; LAKOWICZ, 2006). Os comprimentos de onda e a eficiência da absorção dependem tanto da estrutura da molécula como do meio onde está a molécula, fazendo da espectroscopia uma ferramenta útil para caracterizar pequenas e grandes macromoléculas, bem como efetuar estudos de interação entre estas (ANEJA et al., 2018; GANESHPIANDIAN et al., 2014; LAFAYETTE et al., 2017; SALEM et al., 2016; WANG et al., 2011).

A partir disto, foram realizados os estudos de interação dos LQIT/JFs na presença de quantidades crescentes de ctDNA (0-100µM), onde foram observadas alterações espectrais nos comportamentos absorptivos dos compostos, desvelando a ocorrência dos efeitos: (a) hipocrômico, correspondente a uma diminuição no perfil absorptivo (GAO et al., 2010), (b) hiperacrômico, definido como o aumento da intensidade absorptiva (SHAHABADI; HEIDARI, 2012), (c) batocrômico, observado quando há mudanças de máximos de absorção para um comprimento de onda mais longo (região do desvio para o vermelho) (JANOVEC et al., 2011) e (d) hipsocrômico, quando há deslocamento do máximo de absorção para menor comprimento de onda (região do desvio para o azul) (JANNESARI et al., 2013). Estes efeitos podem indicar a formação do complexo DNA-ligante, bem como ajudar na elucidação do mecanismo responsável pelo processo de interação de moléculas pequenas com o DNA, através do envolvimento de uma forte interação do empilhamento entre os pares de bases de DNA com um ligante (ALMEIDA et al., 2015; BHATTACHARJEE et al., 2018; HANYU et al., 2012; JANGIR et al., 2011; KARAMI et al., 2017; LIU et al., 2018; QAIS; AHMAD, 2017; SANI et al., 2018; TIAN et al., 2017).

Todos os comprimentos de onda de máxima absorção dos compostos livres e ligados, bem como outros dados espectrofotométricos dos derivados LQIT/JF's, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Informações espectroscópicas de absorção UV-vis dos compostos LQIT/JF's livres e conjugados ao ctDNA

Derivado	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercromismo (%) ^a	Hipocromismo (%) ^b	Kb (M ⁻¹)
JF-249	313	309	04	64.34	-	1.24x10 ⁶
JF-250	317	316	01	28	-	2.55x10 ⁶
JF-251	364	358	06	-	4.72	2.08x10 ⁵
JF-252	367	366	01	23.63	-	6.99x10 ⁶
JF-253	325	320	05	62	-	6.89x10 ⁵
JF-254	311	311	-	21.71	-	1.36x10 ⁶
JF-255	360	360	-	65.82	-	3.12x10 ⁶
JF-256	348	363	15	71.87	-	1.11x10 ⁶
JF-257	422	410	12	-	23.80	5.10x10 ⁵
JF-258	411	384	27	17.30	-	8.52x10 ⁴

^aHipercromismo resultante da formação de complexo entre os derivados LQIT/JFs e 100 μM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

^bHipocromismo resultante da formação de complexo entre os derivados LQIT/JFs e 100 μM de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

Em consonância com a tabela acima, pode-se observar que os únicos casos de hipocromismo foram apresentados pela interação dos compostos JF-251 e o JF-257 com o ctDNA, os quais tiveram suas características espectrais de absorção alteradas, apresentando uma diminuição do perfil absorptivo de 4.72% e 23.80%, respectivamente. O efeito hipocrômico é geralmente atribuído à interação entre o estado eletrônico do complexo e as bases do DNA (ALEKSI; KAPETANOVIC, 2014; BAS et al., 2018; KOVVURI et al., 2017). A inserção dos halogênios bromo e cloro na posição *para* do anel aromático do benzeno, na porção lateral do núcleo tiazólico, foi crucial à ocorrência deste efeito espectroscópico,

provavelmente devido à interação destes substituintes com a dupla hélice do ctDNA, através de fortes interações hidrofóbicas ou não-covalentes entre os estados eletrônicos do cromóforo e os pares de bases do DNA, levando a uma diminuição na energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, o que pode ter afetado as propriedades absorptivas destes derivados, minimizando sua absorbância (GANESHPANDIAN et al., 2014; LI et al., 2010; RESCIFINA et al., 2014; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; YU et al., 2017).

Foi verificado também que em ambos os casos acima mencionados ocorreu o efeito hipsocrômico (desvio do pico máximo de absorção para a região do azul) com uma variação do pico de absorção de 06 nm e 12 nm para os JF-251 e JF-257, respectivamente. Esse resultado indica, por sua vez, a importância do substituinte *p*-cloro-benzilideno para a ocorrência de um desvio para o azul mais acentuado quando comparado ao substituinte *p*-bromo-benzilideno do JF-251, provavelmente devido ao fato do átomo cloro ter aumentado as propriedades hidrofóbicas do ligante. Além disso, o referido halogênio pode conduzir o ligante a um dipolo ligeiramente alterado, aumentando assim as interações dipolo-dipolo no local de ligação, podendo operar como um aceitador de ligação de hidrogênio (ALMEIDA et al., 2015; BENNER; IHMELS; PITHAN, 2014).

Além do efeito hipsocrômico ter sido menor para o JF-251, é possível verificar que a constante de afinidade (K_b) também foi menor para este derivado, indicando uma menor interação com o ctDNA quando comparado ao JF-257. As constantes calculadas para estes compostos foram 2.08×10^5 e 5.10×10^5 , respectivamente. A explicação pode estar no fato do JF-251 possuir um átomo de bromo na posição *para* do anel benzênico, pois, por se tratar de um átomo muito volumoso, é capaz de diminuir a interação com o ctDNA em virtude de um impedimento estérico (LAFAYETTE et al., 2017), resultado este indicativo de uma melhor afinidade do ctDNA com um *p*-cloro-benzilideno (JF-257) do que com um *p*-bromo-benzilideno (JF-251).

Tais resultados corroboram os achados de (ALMEIDA et al., 2015), haja vista os valores das constantes de afinidade encontrados para os mesmos substituintes acoplados a derivados de acridina-tiossemicarbazona que foram de 1×10^6 para o *p*-cloro-benzilideno e de 9.91×10^4 para o *p*-bromo-benzilideno, comprovando uma afinidade do ctDNA mais elevada pelo substituinte cloro em relação ao bromo, afetando positivamente a habilidade do ligante de interagir com o ctDNA.

À vista dos resultados supracitados concernentes ao efeito hipsocrômico com desvio do máximo de absorção para o azul (efeito hipsocrômico), bem como pelo valores encontrados para as constantes de afinidade dos derivados JF-251 e JF-257 para com o ctDNA, através das

titulações realizadas pela técnica espectroscópica de absorção UV-vis, infere-se que o modo de interação desses compostos com o ctDNA é por via ligação aos sulcos, mediante interação de van der Waals e interação de ligação de hidrogênio (interações hidrofóbicas ou não-covalentes), na formação do complexo ctDNA-ligante, cujos comportamentos espectrais apresentados são similares aos descritos na literatura para esse modelo de interação (ALMEIDA et al., 2017; NEPALI et al., 2014; REHMAN et al., 2015; RESCIFINA et al., 2014; SAMA et al., 2018; SHI et al., 2015; WANG et al., 2018; ZHU et al., 2014).

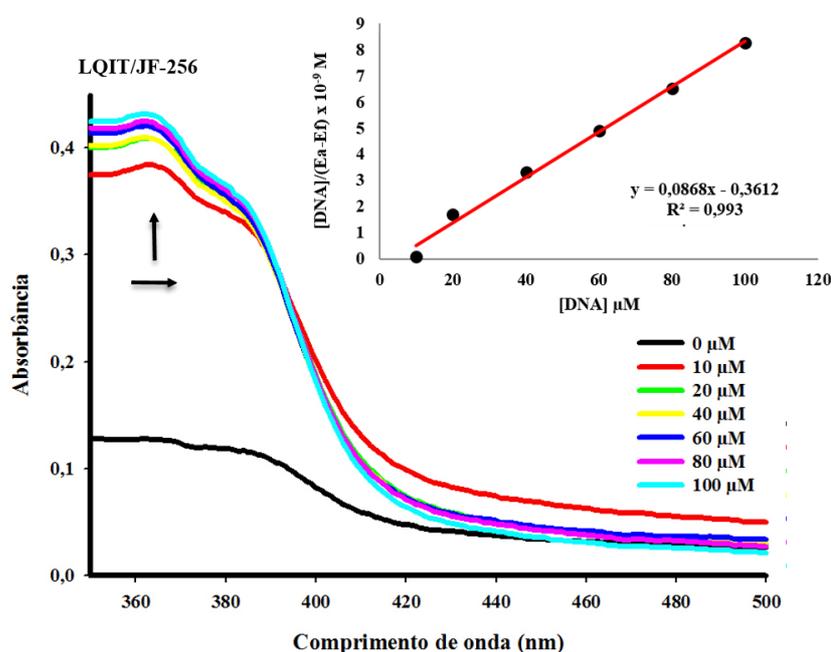
Continuando a análise da interação dos derivados indol-tiazólicos com o ctDNA, ainda com respaldo na Tabela 1, podemos observar a ocorrência do efeito hipercrômico (ampliação da absorção de luz dos compostos-testes) em concentrações crescentes do ctDNA para a maior parte dos compostos testados, exibindo uma ordem crescente de hipercromia na sequência $258 < 254 < 252 < 250 < 253 < 249 < 255 < 256$. Ambos efeitos, hipercrômico e hipocrômico são característicos das alterações na conformação da estrutura da dupla hélice do DNA após a interação com os ligantes (LAFAYETTE et al., 2013). O modo intercalativo de ligação é caracterizado por hipocromismo e alteração do comprimento de onda para a região do vermelho, indicando uma forte interação de empilhamento entre os pares de base do DNA e o cromóforo aromático dos compostos (HAQUE et al., 2018; PARVEEN et al., 2016; PAWAR; OTTOOR, 2018; SANKARGANESH et al., 2018; SILVA et al., 2013; TOKALA et al., 2018; WANG et al., 2018, 2011; ZHOU et al., 2018), enquanto hipercromismo com pouco ou nenhum desvio para o vermelho está associado à ligação eletrostática ou por interação ao sulco (maior ou menor) do DNA (ANEJA et al., 2018; SAMA et al., 2018; SHAHABADI; MAGHSUDI, 2014; ZHOU et al., 2018).

O hipercromismo observado pode ter surgido devido a várias interações não covalentes, cujo aumento da intensidade de absorção após a adição de concentrações crescentes do ctDNA pode ser associado a uma maior exposição dos elétrons, ou seja, uma redução do empilhamento de bases desta biomolécula, demonstrando se tratar de uma interação não-intercalativa, porquanto as características exibidas apontam uma interação no sulco menor no ctDNA, em circunstância de uma sobreposição dos estados eletrônicos do cromóforo da molécula com as bases nitrogenadas dos sulcos desta biomolécula (ALI et al., 2018b; KARAMI et al., 2017; QAIS; AHMAD, 2017; STANICOVÁ; VEREBOVÁ; BENES, 2018).

Pode-se notar que o derivado que exibiu um maior efeito hipercrômico foi o JF-256 (Figura 34), com 71.87%, apresentando também um deslocamento do pico máximo de absorção para a região do vermelho (efeito batocrômico) com uma variação de 15 nm,

indicando uma maior estabilidade do complexo ctDNA-ligante. Esses resultados demonstram que a inserção do substituinte benzeno ao núcleo do tiazol, bem como a adição de um bromo ao núcleo indólico foram cruciais à modificação da estrutura da dupla hélice, resultando em maior exposição dos elétrons dos compostos, bem como na redução do empilhamento destes, sinais estes indicativos de uma interação nos sulcos do ctDNA (ARSHAD et al., 2017; IKHLAS; AHMAD, 2018; PARVEEN et al., 2016).

Figura 34. Espectros de absorção do LQIT/JF-256 na presença de quantidades crescentes do ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM . As setas (\uparrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{DNA}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



A ocorrência desses efeitos corroboram os achados de Mirzaei-Kalar (2018), os quais realizaram um estudo de interação do fármaco atorvastatina com o DNA, através de técnicas espectroscópicas como absorção UV-vis e emissão fluorescente, além da viscosidade. Pela técnica de absorção de luz, os resultados revelaram também os efeito hiperacrômico (18%) e batocrômico ($\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$), a partir dos quais foi proposto o modo de interação do complexo ctDNA-atorvastatina por via ligação estável no interior dos sulcos.

Ainda nessa perspectiva, foi observado que a maioria dos compostos que apresentaram hiperromia, também apresentaram desvio do pico máximo de absorção para a região do azul (efeito hipsocrômico), com exceção do JF-254 e JF-255 que não apresentaram desvio nem para a região do azul nem para a região do vermelho (permanecendo em 311 nm e 360 nm, respectivamente) e do JF-256 que apresentou efeito batocrômico. Portanto, a ordem crescente de hipsocromia, em nm, permaneceu da seguinte forma: 250 = 252 ($\Delta\lambda = 01$) < 249 ($\Delta\lambda = 04$)

$< 253 (\Delta\lambda = 05) < 256 (\Delta\lambda = 15) < 258 (\Delta\lambda = 27)$. Percebe-se que o composto que apresentou maior efeito hipsocrômico foi o JF-258, indicando a relevância da inserção do substituinte *p*-cloro-fenil acoplado ao núcleo tiazólico, bem como um bromo ao núcleo do indol para a geração desse efeito, uma vez que a presença desses halogênios conjugados a estes grupos farmacofóricos foram cruciais à deslocalização do pico de absorção para uma menor faixa de absorção de UV.

O efeito acima relatado, provavelmente, ocorre devido à presença de elementos químicos portadores de pares de elétrons livres, os quais interagem com os elétrons em ressonância dos anéis aromáticos, aumentando a densidade eletrônica destes núcleos, causando um desenrolamento da dupla hélice, bem como o seu desempilhamento, conseqüente e concomitantemente, expondo as bases nitrogenadas, mediante o estabelecimento de ligações de hidrogênio ou ligações de van der Waals, comportamentos estes atrelados a uma interação via sulco (GUP; GÖKÇE; DILEK, 2015; KRISHNA et al., 2018; RAJALAKSHMI et al., 2011).

No que diz respeito ao cálculo do Kb, que revela a intensidade da afinidade do ctDNA por um determinado ligante, a ordem crescente, considerando todos os dez derivados LQIT/JF's, ficou determinada conforme a seguinte sequência: $258 < 251 < 257 < 253 < 256 < 249 < 254 < 250 < 255 < 252$. Logo, verifica-se que o derivado JF-252 apresentou a maior constante de afinidade com o ctDNA quando comparado com os demais, alcançando o valor 6.99×10^6 , sugerindo a importância do anel fenílico acoplado ao anel do tiazol, bem como do núcleo indólico não substituído. Sugere-se que este composto é capaz de induzir uma mudança na conformação helicoidal da estrutura do ctDNA, mediante a formação do complexo ctDNA-ligante com extensa força, possivelmente devido à ocorrência do efeito de ressonância, peculiar dos aromáticos que proporciona uma transferência de cargas, promovendo a reatividade do núcleo tiazólico e conseqüente estabilização da interação com o ctDNA, supostamente, através de ligações hidrofóbicas. Compostos contendo anéis aromáticos típicos, como pirrol, furano ou benzeno como cadeia lateral com liberdade de torção, podem se ligar ao sulco do DNA, produzindo pouco ou nenhum rearranjo estrutural da hélice do DNA, ao contrário dos intercaladores, características essas norteadoras de um modo de interação deste derivado nos sulcos do ctDNA (ALEKSI; KAPETANOVIC, 2014).

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2017) cujo composto que apresentou o maior valor calculado de Kb com o ctDNA foi o portador de um naftil como substituinte de uma tiossemicarbazona. Este composto também era portador de um núcleo indol não substituído similarmente ao JF-256, reforçando a importância da presença de anéis

aromáticos como agentes intensificadores da afinidade com o DNA. No referido estudo também foi usada a técnica espectroscópica de absorção UV-vis, entre outras. Krishna et al. (2018) também avaliou a interação de três compostos com o ctDNA, através de técnicas espectroscópicas como a absorção UV-vis, obtendo constantes de afinidade também na magnitude de 10^6 , a partir das quais foi proposto que valores mais altos de constantes de ligação podem ser ocasionados em função da presença de anéis aromáticos, o que pode facilitar a interação dos complexos com as bases do DNA através da interação $\pi \rightarrow \pi$ não-covalente, sugerindo, desta forma, uma interação dessas moléculas nos sulcos do ctDNA.

No tocante aos compostos portadores de ésteres carboxílicos, é possível observar que os derivados providos do elemento bromo na posição 5 do indol (JF-253 e JF-254) apresentaram uma menor capacidade de elevar suas propriedades absorptivas e também uma menor afinidade, quando expostos a quantidades crescentes de ctDNA (Tabela 1), em comparação com aqueles que não o possuem (JF-249 e JF-250). Esse resultado indica que a presença do referido halogênio, na citada posição do anel indol, desfavorece o efeito hiper-crômico e a afinidade dos derivados por esta biomolécula. Ademais, os compostos que possuem o etil-acetileno como substituinte (JF-250 e JF-254) apresentaram uma melhor afinidade para o ctDNA, em comparação com os portadores do metil-acetileno (JF-249 e JF-253), possivelmente, por possuírem mais elétrons livres, facilitando a ocorrência do empilhamento de elétrons π , ampliando a afinidade com esta biomacromolécula.

Contudo, o derivado JF-255 mostrou um dos maiores graus de afinidade com o ctDNA ($K_b = 3.12 \times 10^6$), mesmo havendo a presença do bromo tanto acoplado à posição 5 do indol, quanto fazendo parte do substituinte *p*-bromo-benzilideno ligado ao núcleo tiazólico. Esses resultados hipotetizam o favorecimento ou não da adição de halogênios na interação com o DNA, uma vez que o citado composto é semelhante ao JF-251 ($K_b = 2.08 \times 10^5$), o qual é desprovido do bromo na posição 5 do indol, entretanto, também portador do substituinte *p*-bromo-benzilideno. Tal característica é importante ao ponto de revelar uma grande diferença na afinidade destes compostos com o ctDNA, podendo estes halogênios serem empregados complementarmente a fim de aumentar a afinidade da interação de um ligante com o DNA, como BENNER; IHMELS; PITHAN, 2014 propuseram para o halogênio cloro, alegando que este elemento pode aumentar as propriedades hidrofóbicas do ligante.

Os demais derivados LQIT/JF's 249, 250, 253, 254 e 255, como descrito anteriormente, também apresentaram efeitos hiper-crômico e hipsocrômico com diferentes intensidades, indicando a formação do complexo ctDNA-ligante com interação característica de ligação ao sulcos.

Pode ser observado ainda que, com exceção do derivado JF-255, todos os compostos providos de um bromo na posição 5 do núcleo indólico, desvelaram constantes de afinidade menores em comparação com os compostos portadores do indol não substituído, confirmando os achados de LAFAYETTE et al. (2017), os quais alegaram que a presença do átomo bromo na posição 5 do anel indol diminui o poder de interação com o ctDNA, provavelmente devido ao impedimento estérico representado pelo volume de bromo.

Por fim, é aceito que a dupla hélice do DNA é estabilizada pela ligação de pequenos ligantes, tanto no sulco maior ou menor como número de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals com os grupos funcionais nas bordas dos pares das bases nitrogenadas desta biomacromolécula (GUP; GÖKÇE; DILEK, 2015). Os ligantes do sulco do DNA desempenham um papel fundamental no desenho e na terapia do câncer. Grandes avanços são conseguidos com a concepção e síntese de ligantes que interagem ao sulco menor e alguns compostos promissores avançaram para os ensaios clínicos (ALI; BHATTACHARYA, 2014).

Ainda nesse contexto, estudos mostram que ligantes no sulco menor do DNA, por exemplo, são munidos de uma maior capacidade de estabilizar suas interações com o DNA, por se tratarem de pequenas moléculas que chegam a proteger esta biomacromolécula do efeito de atividades mutagênicas, mediante a ocorrência de tal estabilidade durante a formação do complexo DNA-ligante, por meio de ligação direta ao seu sulco (BURAKA et al., 2014; CHANDRAN; GHOSHDASTIDAR; SENAPATI, 2012).

4.2.1.2 Ensaios espectroscópicos de emissão fluorescente

Para confirmar o mecanismo de interação dos novos compostos sintetizados, decidimos explorar a possibilidade destes derivados deslocarem a sonda fluorescente intercalativa brometo de etídio (BE), uma vez formado o complexo EB-DNA. Os resultados relativos a estes ensaios estão detalhados, a seguir.

4.2.1.2.1 Estudos de competição com o brometo de etídio (BE)

A intensidade da emissão do BE isolado é extinta pelo(a) tampão/água circundante. No entanto, na presença de DNA, devido a sua forte intercalação entre os pares de base desta biomolécula, a emissão do complexo BE-DNA é identificada. Caso algum ligante interaja com o DNA mais fortemente que o BE, a emissão será diminuída, em vista do deslocamento

do BE ou pela formação de um complexo ternário (GANESHPANDIAN et al., 2014; LI et al., 2010; SRIVASTANA et al., 2013; SURESH et al., 2018; THOTA et al., 2016).

A intensidade da fluorescência do aduto BE-ctDNA teve seu pico máximo em torno de 595 nm. Após a inserção de quantidades crescentes dos derivados ao complexo (10-100 μM), observou-se uma atenuação da emissão fluorescente nas titulações realizadas. Os dados espectroscópicos emissivos dos novos derivados indol-tiazólicos livres e conjugados ao complexo BE-ctDNA estão detalhados na Tabela 2, seguidamente.

Tabela 2. Informações espectroscópicas de emissão fluorescente dos compostos LQIT/JF's livres e na presença do complexo BE-ctDNA.

Derivado	λ_{Exc} (nm) ^a	λ_{Emi} (nm) ^a	$\lambda_{máx}$ livre (nm) ^b	$\lambda_{máx}$ ligado (nm) ^b	$\Delta\lambda$ (nm) ^b	Bandas Exc_Emi (nm) ^b	Hipocromismo (%) ^c	Ksv (M ⁻¹) ^d
JF-249	304	340	595	595	-	5_5	6.73	0.54x10 ⁴
JF-250	402	352	595	595	-	5_5	13.50	0.38x10 ⁴
JF-251	358	447	595	595	-	5_5	9.62	0.43x10 ⁴
JF-252	344	423	595	595	-	5_5	15.10	0.77x10 ⁴
JF-253	322	440	595	595	-	5_5	11.43	0.74x10 ⁴
JF-254	358	458	595	595	-	5_5	12.28	0.62x10 ⁴
JF-255	360	414	595	595	-	5_5	12.62	0.69x10 ⁴
JF-256	347	435	595	595	-	5_5	22.34	0.77x10 ⁴
JF-257	420	464	595	595	-	5_5	9.57	0.52x10 ⁴
JF-258	360	460	595	595	-	5_5	4	0.42x10 ⁴

^aDados relativos ao perfil emissivo dos compostos livres (na ausência do complexo BE-ctDNA).

^bDados relativos ao perfil emissivo do complexo BE-ctDNA na presença de diferentes concentrações dos compostos-testes (10-100 μ M).

^cHipocromismo resultante da formação da interação entre os derivados LQIT/JFs com o complexo BE-ctDNA em comparação com os ligantes livres.

^dConstante de supressão de Stern–Volmer (Ksv) obtida com base nos dados de fluorescência com o ctDNA.

Considerando os dez compostos usados neste teste, podemos observar que a diminuição da fluorescência do complexo BE-ctDNA atingiu um percentual de, no mínimo, 4% para o JF-258 e de, no máximo, 22.34% para o JF-256 (Tabela 2), mostrando, portanto, uma competição fraca dos derivados com o BE na interação com o ctDNA (ANITHA et al., 2013). O potencial supressor emissivo apresentado pelos derivados LQIT/JF's é relativamente menor que os intercaladores de DNA já bem reportados na literatura (NAFISI et al., 2006), os quais podem minimizar a emissão do complexo BE-DNA com percentuais maiores de supressão, como descrito por Almeida et al. (2016) (39%) e por Wang et al. (2013) (43.2%).

A exígua supressão da intensidade fluorescente do sistema observado, bem como a constatação de nenhum desvio do pico máximo de emissão deve-se a três possíveis razões segundo Zhu et al. (2014): (a) a ligação do BE com os derivados pode ter acontecido, causando a extinção da fluorescência do sistema BE-ctDNA; (b) os compostos competiram com o BE, substituindo-o no complexo e intercalando-se ao ctDNA, logo, diminuindo a concentração de BE conjugado ao DNA; e (c) um novo complexo derivados-BE-ctDNA foi formado como resultado da interação dos compostos-testes com aduto BE-ctDNA, conduzindo à diminuição da intensidade do referido complexo.

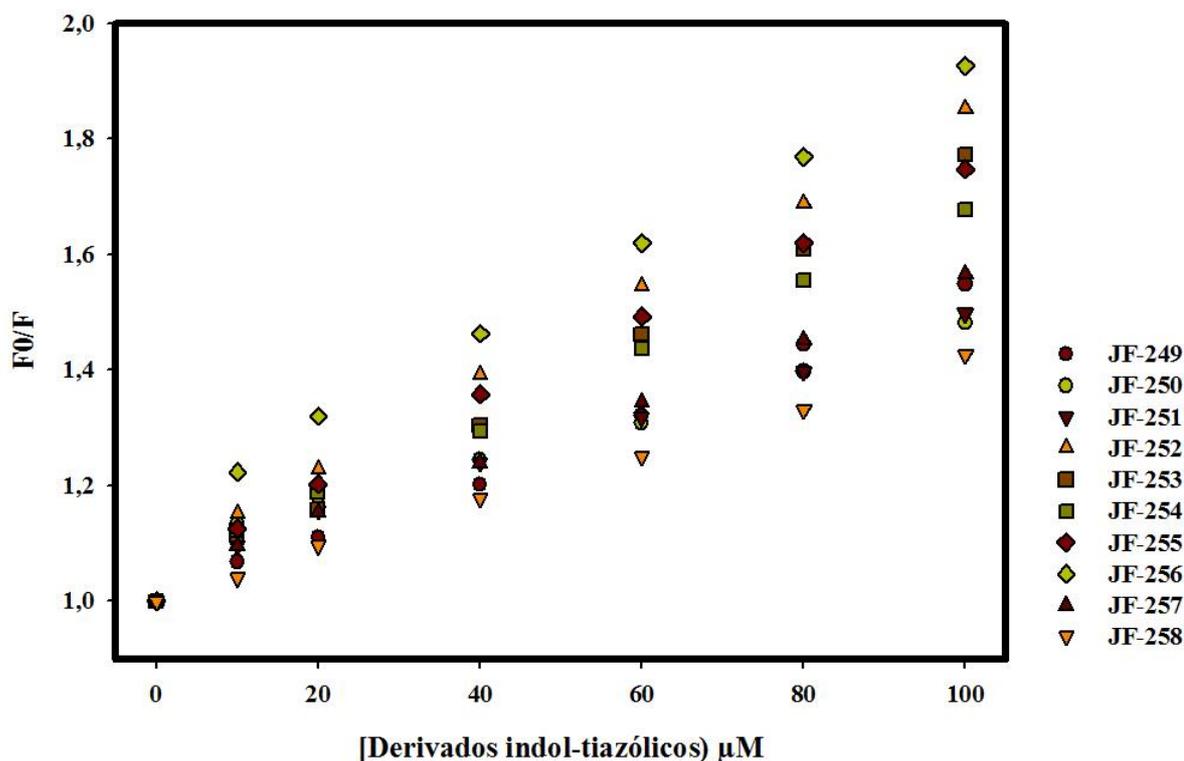
Neste trabalho, os espectros emissivos do BE na presença dos compostos foram analisados e foi inferido que não houve interação entre estes, pois não houve alteração na fluorescência do BE, desconsiderando-se a primeira suposição. A segunda hipótese seria a mais provável, uma vez que os derivados indol-tiazólicos competem com o BE para ligar-se ao DNA, acarretando na diminuição da fluorescência. Porém, sabe-se que a constante de ligação do BE com o DNA é de 5.16×10^5 (GENG et al., 2013), e nenhum dos derivados apresentou valor da constante superior a este valor (Tabela 1), refutando a ideia da substituição do BE no complexo por algum dos compostos usados neste ensaio.

Desta forma, deduzimos que a terceira hipótese é a premissa mais provável para explicar a supressão fluorescente observada, de maneira que os derivados interagem com o sistema BE-ctDNA formando um novo complexo derivados-BE-ctDNA menos fluorescente, indicando que a ligação dos compostos ocorre através de interações nos sulcos (LAFAYETTE et al., 2017). A ligação de complexos nos sulcos do DNA, em determinadas circunstâncias, pode conduzir à extinção da emissão de BE (BI; ZHANG; QIAO, 2008), o que concretiza que os derivados analisados estão ligados ao DNA pelo modo de ligação nos sulcos. Os dados percentuais relativos ao hipocromismo do teste de supressão fluorescente do sistema acima mencionado podem ser analisados também na Tabela 2.

A magnitude da extinção fluorescente do complexo BE-ctDNA foi analisada através

da equação de Stern-Volmer, a partir do cálculo da constante de supressão de fluorescência (K_{sv}) (Tabela 2), no intuito de compreender quantitativamente o comportamento da supressão emissiva reproduzida pelos compostos-testes. Observa-se que a ordem crescente da supressão fluorescente do complexo supracitado, considerando os valores da K_{sv} de todos os derivados LQIT/JF's, ficou determinada consoante a sequência: 250 < 258 < 251 < 257 < 249 < 254 < 255 < 253 < 252 = 256. A eficiência do referido processo de extinção fluorescente foi delineado, utilizando-se das constantes de supressão fluorescente, a partir dos valores encontrados para a intensidade de emissão relativa (F_0/F), versus a concentração dos derivados LQIT/JF (Q) (LAKOWICZ, 2006) (Figura 35).

Figura 35. Intensidade de fluorescência relativa dos novos derivados indol-tiazólicos LQIT/JF's em contato com o complexo ctDNA-BE, em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6).

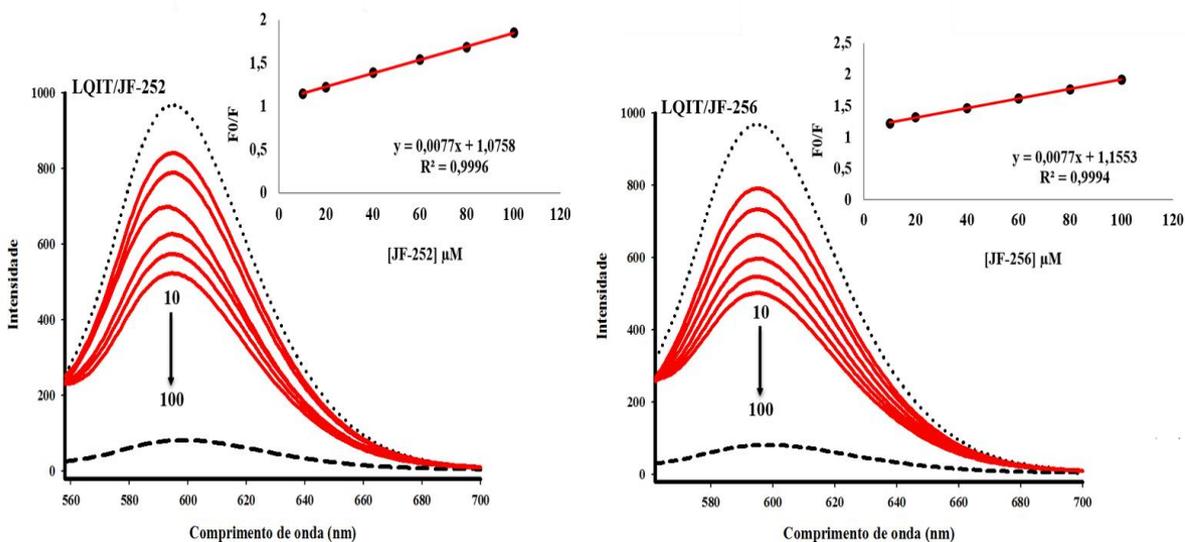


Mesmo não havendo uma supressão fluorescente tão enfática dos derivados com o complexo BE-ctDNA, o composto que, simultaneamente, apresentou a característica de maior supressor fluorescente, fato corroborado pelo K_{sv} , foi o derivado JF-256 (fenil não-substituído, com um bromo na posição 5 do anel indólico) cujos dados relativos ao percentual de extinção emissiva e à constante de supressão fluorescente foram de 22.34% e 0.77×10^4 , respectivamente, indicando que o anel fenílico não-substituído ligado ao núcleo tiazólico e o halogênio bromo acoplado ao indol colaboraram na dissipação da emissão do aduto BE-

ctDNA, provavelmente devido a uma eficiente transferência de elétrons entre o ligante excitado e as bases de ctDNA, retratando a ocorrência da interação entre este derivado e o ctDNA (ALMEIDA et al., 2015). Resultado semelhante foi encontrado por Almeida et al. (2016), porquanto descobriram que dentre os composto testados, o que apresentou maior supressão fluorescente quando ligado ao complexo BE-ctDNA foi um derivado também portador de um anel benzênico não substituído, o qual exibiu maior taxa de hiperromismo (13.97%), quando comparado com o outro composto usado na pesquisa.

É possível observar na Tabela 2 que os derivados LQIT/JF's 252 e 256 apresentaram o mesmo valor para a constante de supressão fluorescente ($K_{sv} = 0.77 \times 10^4$), contudo, o JF-256 mostrou um maior percentual de hipocromismo (22.34%), em relação ao JF-252 (15.10%). Isso indica que a presença do bromo na posição 5 do núcleo indólico foi crucial para ampliar a propriedades supressoras emissivas do JF-256, provavelmente, por se tratar de um grupo químico estericamente volumoso. Os espectros de ambos são mostrados na Figura 36, a seguir.

Figura 36. Espectros de emissão do BE (20 μ M) livre (----) e ligado ao ctDNA (100 μ M) na ausência (.....) e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 252, 255 e 256 (—). A seta (\downarrow) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ M) à temperatura ambiente. Inseto: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Ademais, quando comparamos os compostos JF-251 e JF-252 (indol não substituído), portadores de um bromo-*p*-benzilideno e de um fenil não substituído, respectivamente, bem como os derivados JF-255 e JF-256 (indol substituído), portadores de um bromo-*p*-benzilideno e de um fenil não substituído, respectivamente, averiguamos que tanto os valores

do hipocromismo quanto das constantes de supressão indicam que a presença do bromo, seja ligado ao núcleo indol, seja acoplado ao benzeno, reduz o potencial supressor da fluorescência exibida pelo complexo BE-ctDNA. Este resultado indica que a presença de um grupo volumoso pode afetar as propriedades supressoras de emissão fluorescentes do referido sistema, como observado nos estudos realizados por Faulhaber et al. (2011).

Ainda com relação à atuação dos halogênios nos efeitos supressores dos derivados indol-tiazólicos, é observável na Tabela 2 que a maior parte dos compostos portadores do bromo na posição 5 do anel indólico (LQIT/JF's 253, 254, 255, 256 e 258) tiveram os maiores valores percentuais de extinção emissiva e da constante de supressão fluorescente, o que confirma e, ao mesmo tempo, reforça a hipótese mencionada acima sobre este halogênio, a respeito da contribuição de sua propriedade química estérica volumosa na supressão da fluorescência do complexo BE-ctDNA.

A única exceção constatada foi o JF-258 que mostrou tais valores menores quando comparado com o JF-257 (indol não substituído). No entanto, ambos portam um átomo de cloro na posição *para* do anel benzênico. É possível observar que o derivado JF-258, portador de ambos os halogênios, teve um menor perfil supressor emissivo, supostamente devido ao fato de tanto o cloro quanto o bromo, em virtude das características de ambos serem retiradores de elétrons, diminuírem a densidade eletrônica do composto, minimizando sua reatividade e, conseqüentemente, interferindo na sua capacidade supressora emissiva do sistema BE-ctDNA quando comparado com o JF-257, o qual porta apenas um átomo de cloro na posição *para* do benzeno, o que acarretou numa menor desativação eletrônica do composto-teste, melhorando sua reatividade quando comparado com o JF-258 (indol substituído), melhorando a capacidade do derivado de suprimir a fluorescência do complexo BE-ctDNA.

Almeida et al. (2015) também encontraram achados similares, uma vez que, dos compostos testados, o que apresentou maior perfil de supressão fluorescente foi um derivado cloro-*p*-benzilideno, em relação a outro derivado portador de um bromo-*p*-benzilideno, fato confirmado pelos dados do percentual de hipocromismo e pela constante K_{sv} . Ademais, dentre os compostos testados, foi inferido que aqueles portadores de uma cadeia lateral provida de um fenil ou de um naftil apresentaram significativa diminuição de suas propriedades emissivas quando colocadas em contato com concentrações crescentes de ctDNA, desvelando a importância dos anéis aromáticos na promoção deste efeito.

Os resultados dos fenômenos espectroscópicos concernentes à supressão da emissão fluorescente, usando o BE como sonda fluorescente, representam o modo de interação entre os novos derivados indol-tiazólicos com o ctDNA, ratificando com os resultados da

espectroscopia de absorção eletrônica (LAFAYETTE et al., 2017). Tantos os efeitos analisados a partir das propriedades absorptivas UV-vis e fluorescentes, bem como a análise dos valores das constantes de afinidade (K_b) e supressão fluorescente (K_{sv}) indicam a ocorrência de interação entre os novos derivados e o ctDNA através da ligação aos sulcos. Os resultados apontam também que os composto mais eficiente na ligação ao ctDNA *in vitro* foram os derivados LQIT/JF's 252 (indol não substituído e com um fenil não substituído) e 256 (indol substituído e com um fenil não substituído).

4.2.1.3 Ensaio espectroscópicos de dicroísmo circular

A análise espectral do dicroísmo circular (DC) é outra técnica relevante e muito utilizada para explorar as mudanças conformacionais induzidas na estrutura secundária do ctDNA a partir da interação de pequenas moléculas ou mesmo de fármacos com o DNA (SHI et al., 2015; YASEEN et al., 2014). Em geral, o espectro de DC da dupla fita do ctDNA na sua forma B destra exibe um pico na banda positiva em 275 nm, devido ao empilhamento de bases π - π e o pico da banda negativa a 245 nm, devido à sua elipticidade, enquanto que o DNA em sua forma A mostra uma banda positiva característica a 260 nm e banda negativa a 210 nm (SALEM et al., 2016; ZHAO et al., 2014).

Os compostos não exibiram nenhum comportamento espectral considerável pelo DC quando livres na solução tampão em Tris-HCl (pH 7.6; 0,1 M), porquanto são moléculas desprovidas de quiralidade. Contudo, quando conjugados com o DNA promoveram alterações espectrais no DC das amostras de ctDNA, as quais, inicialmente, exibiram picos nas bandas positivas em 275 e 277 nm e nas bandas negativas em 245 e 247 (dado o fato de duas soluções-estoque terem sido usadas neste ensaio), como já reportado na literatura (ALI et al., 2018; PARVEEN et al., 2016; SARWAR et al., 2015). Ademais, os dados espectroscópicos de DC dos novos derivados indol-tiazólicos livres e conjugados ao ctDNA estão detalhados na Tabela 3, seguidamente.

Tabela 3. Informações espectroscópicas da interação dos compostos LQIT/JFs conjugados ao ctDNA pela técnica de dicroísmo circular.

Derivado	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^a	Hiper cromismo (%) ^{a,c}	Hipo cromismo (%) ^{a,d}	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^b	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^b	$\Delta\lambda$ (nm) ^b	Hiper cromismo (%) ^{b,c}	Hipo cromismo (%) ^{b,d}
JF-249	275	275	-	-	7.38	247	245	02	19	-
JF-250	277	275	02	22.45	-	245	247	02	-	53
JF-251	277	272	05	25.25	-	245	245	-	39.72	-
JF-252	275	276	01	-	1.74	247	248	01	16.85	-
JF-253	277	275	02	16.31	-	245	245	-	-	33.35
JF-254	277	273	04	33.30	-	245	247	02	36.24	-
JF-255	275	280	05	-	12.67	247	243	04	22.25	-
JF-256	275	274	01	-	11	247	243	04	26	-
JF-257	277	276	01	33	-	245	244	01	33.96	-
JF-258	277	273	04	31.25	-	245	245	-	36.72	-

^aDados relativos à banda positiva do ctDNA antes e após a interação com os compostos testes.

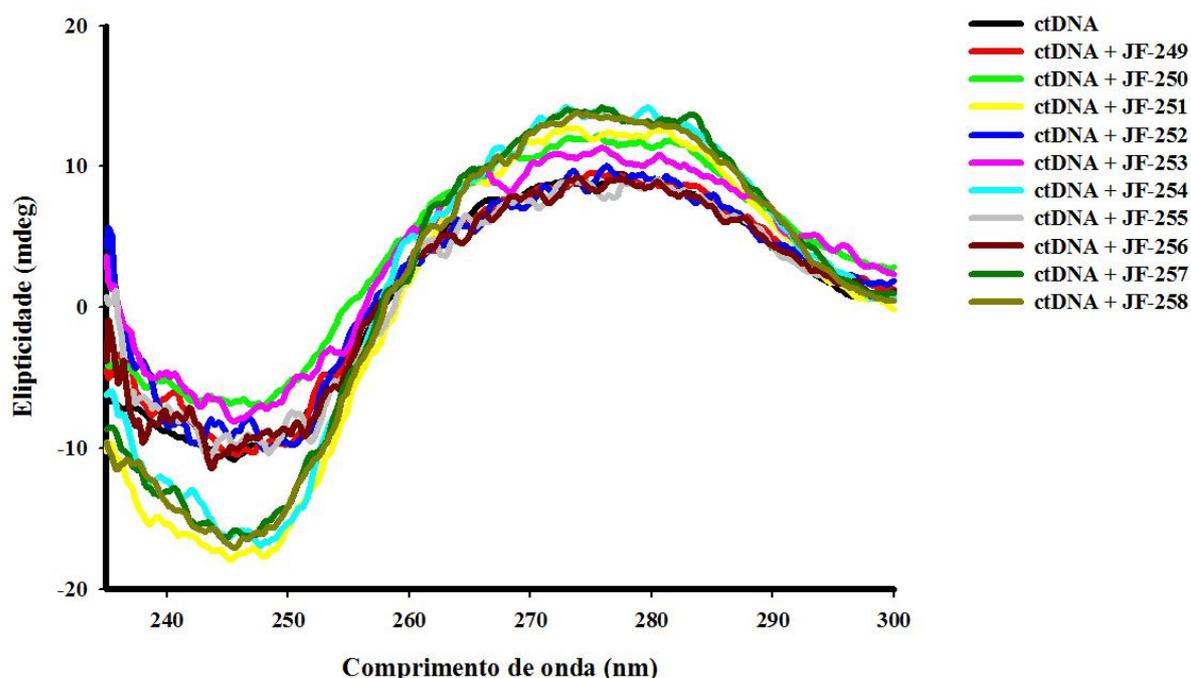
^bDados relativos à banda negativa do ctDNA antes e após a interação com os compostos testes.

^cHiper Cromismo resultante da formação do complexo entre os derivados LQIT/JFs fixados em 25 μM com 100 μM de ctDNA em comparação com o ctDNA livre.

^dHipocromismo resultante da formação do complexo entre os derivados LQIT/JFs fixados em 25 μM com 100 μM de ctDNA em comparação com o ctDNA livre.

Os espectros de dicroísmo circular do ctDNA, fixado em 100 μM , na ausência e na presença dos compostos testados fixados em 25 μM são mostrados na Figura 37, abaixo:

Figura 37. Espectros de DC do ctDNA (100 μM) na ausência e na presença de todos os compostos-testes LQIT/JF's fixados numa concentração de 25 μM , à temperatura ambiente.



A partir dos dados obtidos é notório que os derivados testados provocaram diversos tipos de alterações nos espectros de DC do ctDNA, ao passo da formação do complexo ligante-ctDNA, nas condições fisiológicas propostas, visto que apresentaram a ocorrência dos efeitos espectroscópicos: hipocromismo (diminuição do pico máximo de absorção), hiperromismo (aumento do pico máximo de absorção), hipsocromismo (desvio do pico máximo de absorção para a região do azul) e batocromismo (desvio do pico máximo de absorção para a região do vermelho) para ambas as bandas positiva e negativa exibidas pelo ctDNA em sua forma destra B.

Constata-se que os seguintes compostos exibiram hiperromismo, em ordem crescente: 253 < 250 < 251 < 258 < 257 < 254, para a banda positiva e 252 < 249 < 255 < 256 < 257 < 254 < 258 < 251, para a banda negativa. Quanto ao efeito hipocrômico, a seguinte ordem crescente foi estabelecida: 252 < 249 < 256 < 255, para a banda positiva e 253 < 250, para banda negativa. Quanto ao efeito hipsocrômico, obtivemos a seguinte ordem crescente dos derivados: 256 = 257 < 250 = 253 < 254 = 258 < 251, para a banda positiva e 257 < 249 <

255 = 256, para a banda negativa. Concernente ao efeito batocrômico, constatou-se a seguinte ordem crescente: $252 < 255$, para a banda positiva e $252 < 250 = 254$, para a banda negativa.

De forma geral, os novos derivados indol-tiazólicos apresentaram alterações não tão significativas nos espectros de DC do ctDNA, quando conjugados, com baixa porcentagem de hipo/hipercromismo e com um mínimo de perturbação dos picos para a direita (batocromismo) ou para a esquerda (hipsocromismo). Sabe-se que moléculas intercalantes são conhecidas por perturbar os espectros de DC do DNA significativamente, enquanto ligação não-intercalativa como interação nos sulcos tem efeito irrelevantes nos espectros de DC do ctDNA (HUSAIN et al., 2013).

Observa-se que os compostos portadores do anel benzênico, provido ou não do elemento bromo na posição *para*, JF-252, JF-255 e JF-256 apresentaram hipocromismo na banda positiva, comportamento sugestível da ocorrência de um enfraquecimento na interação existente entre o empilhamento das pares de bases do ctDNA (LI et al., 2013). Notou-se também a presença de um hipercromismo na banda negativa, com desvio para o vermelho para os dois primeiros derivados acima mencionados, indicando um possível desenrolamento das hélices do ctDNA, após a formação do complexo derivado-ctDNA (HAQUE et al., 2018).

Resultados semelhantes foram encontrados por (KOVVURI et al., 2017), os quais investigaram o efeito de novos derivados β -carbolínicos na conformação do DNA através de várias técnicas, incluindo o DC. O comportamento espectral do ctDNA também mostrou hipocromismo na banda positiva e hipercromismo na banda negativa, com leve batocromismo. Foi reportado que tais alterações espectrais foram ocasionadas em virtude do desenrolamento da dupla hélice do ctDNA, ao interagirem com os derivados propostos, ponderando que o batocromismo é uma indicação de uma boa interação com esta biomacromolécula. Tais achados corroboram a importância do núcleo indol na interação com o ctDNA, como agente facilitador da formação do complexo ctDNA-ligante, provocando alterações na conformação desta biomolécula.

Os compostos JF-254, JF-257, JF-258, JF-251, JF-250 e JF-253 apresentaram um hipercromismo na banda positiva do ctDNA, causando também desvios do pico máximo de absorção para o azul e para o vermelho, possivelmente, devido à estabilização da forma B desta biomolécula, uma vez que estudos da ligação de pequenas moléculas com DNA pode resultar tanto na estabilização quanto na desestabilização da dupla hélice, afetando, assim, a sua estrutura secundária (SALEM et al., 2016; SARWAR et al., 2017).

No tocante aos derivados JF-250 e JF-253, pode-se observar que estes, ao interagirem com o ctDNA, acarretaram uma alteração no perfil espectral deste, mediante à ocorrência do

efeito hiperacrômico em ambas as suas bandas positiva e negativa, com leves desvios do pico máximo de absorção para o vermelho e para o azul em ambas as bandas para o JF-250 e desvio para o azul da banda positiva para o derivado JF-253. Nesse prisma, resultados similares foram encontrados por Lafayette et al. (2013), cujos estudos de interação com o ctDNA foram realizados usando novos derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos, os quais mostraram também alterações no perfil espectral do ctDNA com efeito hiperacrômico em ambas as suas bandas, em especial um derivado portador do núcleo tiazolidínico (analogamente ao JF-250), responsável também por um deslocamento do pico máximo para a região do azul, indicando o papel significativo das tiazolidinonas na interação com o ctDNA, corroborando os efeitos aqui discriminados.

A maioria dos compostos apresentou efeito hipsocrômico tanto para a banda positiva quanto para a banda negativa, sobretudo, os compostos JF-251, JF-255 e JF-256. Coincidentemente, dos que apresentaram efeito batocrômico, os mais evidentes foram os JF-255 e o JF-252, confirmando a relevância do anel benzênico acoplado ao núcleo tiazólico e ao núcleo indólico, portando ou não um bromo na posição *para* do referido anel, nas mudanças conformacionais da estrutura secundária do ctDNA, mostrando uma maior afinidade, como evidenciado nos estudos anteriores de absorvidade e de fluorescência.

Foi evidenciado para os derivados JF-251, JF-254, JF-257 e JF-258 um hiperacromismo em ambas as bandas espectrais do ctDNA, com desvio do pico máximo de absorção para a região do vermelho ou para a região do azul. Resultados semelhantes também foram encontrados por Jumbri et al. (2016), os quais testaram compostos associados ao elemento bromo e sua interação com o ctDNA, utilizando-se de várias técnicas espectroscópicas, inclusive o DC. A partir dos resultados, foi observado que, além da atração eletrostática, interações hidrofóbicas causaram a condensação do DNA levando a uma estrutura mais compacta, inferindo um modo de ligação não intercalativo.

Parveen et al. (2016) também acharam resultados análogos aos apresentados por estes quatro compostos supracitados (JF-251, JF-254, JF-257 e JF-258). Foram testados 2 isolados de novas isoflavonas e sua interação com o ctDNA através do DC, entre outras técnicas biofísicas. Ambos os isolados alteraram o perfil espectral do ctDNA, ao serem conjugados, exibindo aumentos na intensidade absorptiva nos picos da banda positiva e negativa, cujo modo de interação reportado foi ligação aos sulcos do ctDNA e as modificações conformacionais na estrutura secundária desta biomolécula foram associadas a uma conversão do tipo B para uma estrutura mais condensada, característica intrínseca da forma A.

No que se refere aos derivados LQIT/JF's 249, 250, 252, 253, 255 e 256, é possível notar que estes compostos perturbaram levemente o DC do ctDNA, causando efeitos hipocrômico e hipercrômico em suas bandas positiva e negativa, respectivamente, além de provocarem efeitos batocrômico e hipsocrômico para os picos máximos de ambas as bandas, o que corrobora a formação de um complexo ctDNA-ligante, presumivelmente, devido a uma interação nos sulcos do ctDNA, cujas modificações parciais da estrutura secundária do ctDNA podem estar concatenadas à conversão da sua forma destra B para a sua forma A, mais compacta (ALI et al., 2018; LIU et al., 2015; QAIS; AHMAD, 2017; SAMA et al., 2018; SARWAR et al., 2015, 2017b; SHI et al., 2015).

4.2.1.4 Estudos hidrodinâmicos de Viscosidade

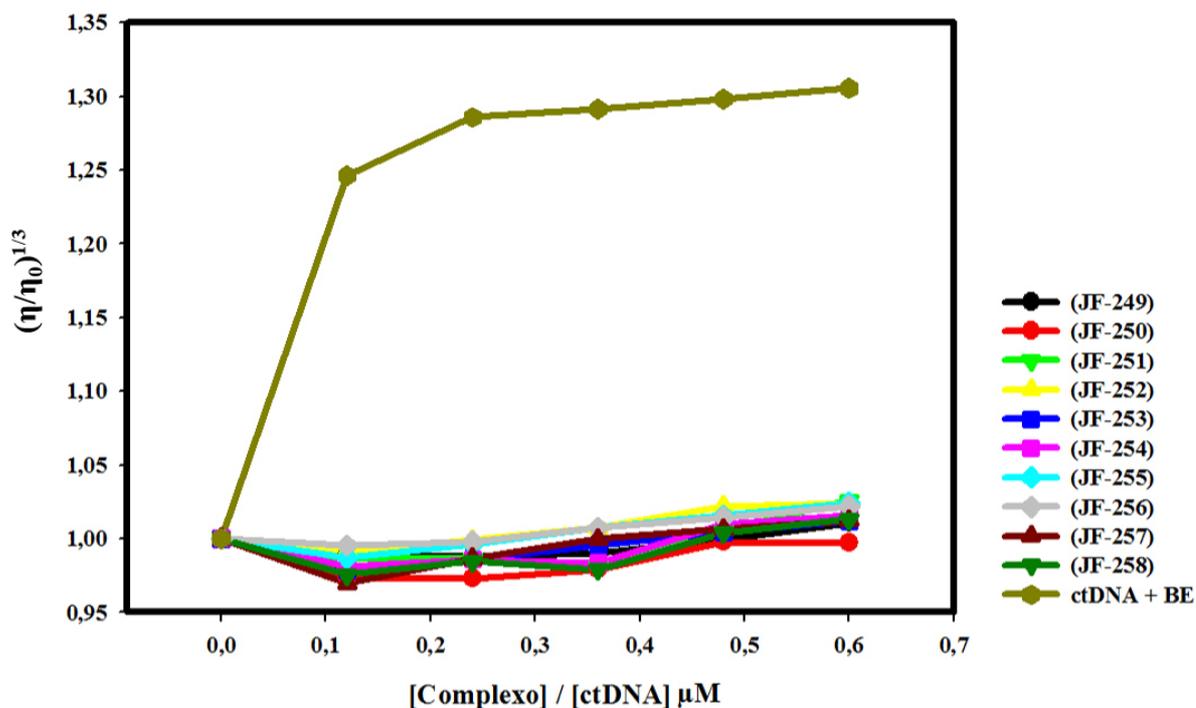
As medidas de viscosidade são sensíveis às mudanças conformacionais no comprimento efetivo do DNA, o que pode predizer se o modo de interação DNA-ligante se dá via intercalação, ligação ao sulcos ou interação eletrostática, conforme as propriedades hidrodinâmicas analisadas por este método (GANESHPIANDIAN et al., 2014). Geralmente, quando uma molécula interage com o DNA via intercalação clássica, a distância entre os pares de bases adjacentes aumentam, causando alongamento, desenrolamento e endurecimento das hélices, usualmente, acompanhada de uma ampliação expressiva na viscosidade relativa da solução de DNA (ALI et al., 2018; PARVEEN et al., 2016). Normalmente, quando a intercalação for do tipo parcial ou não-clássica, há a ocorrência de uma dobra ou torção nas hélices deste biopolímero, reduzindo seu comprimento efetivo e, consequentemente, a sua viscosidade relativa (QAIS; AHMAD, 2017; SRIVASTANA et al., 2013).

Por sua vez, os compostos que interagem via ligação ao sulcos se conjugam ao DNA devido ao efeito de interações de van der Waals ou por ligações de hidrogênio, provocando mínimas ou nenhuma alteração no comprimento efetivo do DNA, gerando, a partir disto, insignificantes mudanças ou mesmo nenhuma modificação na viscosidade relativa do DNA, assim como ocorre nas interações eletrostáticas (LIU et al., 2015a; SAMA et al., 2018; SANI et al., 2018; SHAHABADI; HEIDARI, 2012; SHI et al., 2015).

Os dados de viscosidade demonstram que os derivados provocaram pequenas alterações na viscosidade relativa do ctDNA, à medida que se forma o complexo JF-ctDNA, nas condições fisiológicas propostas, ocasionando um leve aumento, ou uma diminuição seguida de um aumento superficial nessa propriedade intrínseca da referida biomolécula. A

partir dos dados obtidos e analisados, foi possível constatar que os compostos geraram alteração na viscosidade relativa do ctDNA na seguinte ordem crescente: 250 < 249 < 253 < 257 < 258 < 254 < 256 < 252 < 255 < 251 (Figura 38).

Figura 38. Viscosidade relativa do ctDNA (100 μM) livre e conjugado aos derivados LQIT/JF's e ao brometo de etídio (BE), nas mesmas concentrações (0-60 μM), à uma temperatura de 25° C, em Tris HCl (0,1 M e pH 7,6), onde η e η_0 correspondem à viscosidade do ctDNA na presença e na ausência do ligante, respectivamente.



Observa-se que os compostos portadores do anel fenílico acoplado ao núcleo tiazólico, principalmente os que são providos de um *p*-bromofenil, independentemente de possuírem ou não o referido halogênio na posição 5 do anel indólicos (JF-251, JF-252, JF-255 e JF-256) promoveram maior perturbação da viscosidade relativa do ctDNA, mesmo que superficial, o que indica a importância do substituinte *p*-bromo-benzilideno na condução deste efeito. Esses resultados corroboram com os obtidos anteriormente, a partir dos quais foi possível constatar que os referidos derivados apresentaram uma maior afinidade pelo ctDNA, sobretudo os derivados LQIT/JF's 252, 255 e 256, supostamente, em virtude da ocorrência de mais interações hidrofóbicas e mais empilhamentos de elétrons π que geram efeitos que conduzem ao modo de interação via ligação ao sulcos.

Em linhas gerais, os novos derivados indol-tiazólicos causaram alterações insignificantes na viscosidade relativa do ctDNA, quando conjugados. Dados prévios indicam que moléculas ligantes ao sulcos são conhecidas por perturbarem irrelevantemente tal

propriedade do DNA (KOVVURI et al., 2017; MIRZAEI-KALAR, 2018). Resultados similares foram encontrados por Salem et al. (2016), cujos estudos de viscosidade utilizando diferentes heterocíclicos, revelaram que um dos derivados testados (isômero espirocíclico 1,2-difenil espiro [di-hidroacridina-9 '(10'H), 5- (1,2,4-triazolidin)] -3-tiona) alterou suavemente a viscosidade relativa do DNA, indicando uma interação nos sulcos desta biomolécula.

Parveen et al. (2016) conduziram uma investigação a respeito do modo de interação existente entre duas isoflavonas isoladas da planta *Cassia siamea* com o DNA, usando para este fim várias técnicas, inclusive a viscosidade, a partir da qual foi observado que nenhum dos novos isolados aumenta significativamente a viscosidade relativa da referida biomolécula, concluindo-se que o modo de interação destes com o DNA ocorre por via não-intercalante. Através das outras técnicas foi possível prever que uma das isoflavonas estudadas interage nos sulcos, enquanto a outra era por ligações eletrostáticas. Ademais, um estudo conduzido por Liu et al. (2015a), no qual foi utilizado um derivado do alcaloide curcumina (4,4-dimetilcurcumina) como ligante para desvendar o modo de interação deste com o DNA, realizou medições viscosimétricas, cujos resultados indicaram um aumento exíguo na viscosidade relativa desta biomolécula, inferindo um modo de interação via ligação aos sulcos.

Esses resultados também corroboram com diversas pesquisas de interação entre o DNA com substâncias comercializadas e fármacos usados clinicamente, pois através do método da viscosidade foi possível notar que tais substâncias não geraram um impacto relevante na viscosidade do DNA, depreendendo-se, portanto, uma interação nos sulcos deste biopolímero, como pode ser ratificado nos estudos realizados utilizando como ligantes a metformina (SHAHABADI; HEIDARI, 2012), a metildopa (SHAHABADI; MAGHSUDI, 2014), o gefitinib (Figura 17B) (SHI et al., 2015), a esculetina (SARWAR et al., 2015), a cefotaxima (Figura 17A) (QAIS; AHMAD, 2017), a pirezepina (RAHMAN et al., 2017), o sulindaco (HUSAIN et al., 2017), a atorvastatina (MIRZAEI-KALAR, 2018), a procaína (ALI et al., 2018a) e o ácido clorogênico (THOMAS; SUKUMARAN; SUDARSANAKUMAR, 2018).

Ainda nessa perspectiva, para consolidar com mais veemência o modo de interação entre o DNA e um determinado ligante, muitos estudos têm utilizado sondas fluorescente cujo modo de interação com esta biomolécula já é bem elucidado para comparar os efeitos ocasionados na viscosidade relativa do DNA pelo(s) ligante(s) proposto(s) com aqueles promovidos pela sonda escolhida, como por exemplo o BE (BARVE et al., 2009; KOVVURI et al., 2017; KUMARAVEL et al., 2018; PAWAR; OTTOOR, 2018; TOKALA et al., 2018),

considerado um clássico intercalador (LEPECQ; PAOLETTI, 1967). Com isso, também foi utilizado o BE como intercalador clássico nos estudos de viscosidade com os derivados indol-tiazólicos, a fim de se estabelecer um grau de comparação entre as modificações nas propriedades viscosimétricas do ctDNA acarretadas por esta sonda à medida em que o complexo BE-ctDNA era formado, em relação àquelas originadas pelo complexo JF's-ctDNA. A referida comparação entre as perturbações na viscosidade relativa do ctDNA geradas pelos complexos supracitados estão graficamente representadas na Figura 38.

É possível constatar que os compostos-testes provocaram uma irrelevante alteração na viscosidade do ctDNA, quando comparado à expressiva variação desta propriedade gerada pela sonda intercalante usada no referido ensaio (BE). Com base nisso, podemos prever que todos os derivados deste estudo se comportam como ligantes que interagem nos sulcos do DNA (RAJALAKSHMI et al., 2011; SARWAR et al., 2017; SRIVASTANA et al., 2013).

Portanto, os resultados desvelados pelos novos derivados indol-tiazólicos por meio da técnica de viscosidade corroboram aqueles revelados pelas técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis, emissão fluorescente com BE e DC, os quais conduzem à determinação do modo de ligação entre os compostos-testes com o ctDNA mediante ligação aos sulcos, o que comprova a importância de usar várias técnicas diferentes para elucidar modos de interação ligante-ctDNA.

4.2.2 Estudos espectroscópicos de interação com a soroalbumina bovina (BSA)

Logo em seguida, serão mostrados e discutidos os resultados referentes a interação dos derivados indólicos-tiazólicos com a BSA mediante a utilização das técnicas espectroscópicas de Absorção UV-vis e Emissão Fluorescente.

4.2.2.1 Ensaio espectroscópico de Absorção UV-vis

A técnica espectroscópica de absorção de UV-vis é um meio confiável de entender a conformação e alterações na estrutura secundária de proteínas, uma vez formado o complexo proteico-ligante. É um método simples, mas eficaz para detectar a formação de complexos e estudar a interação proteína-droga (EBRAHIMPOUR et al., 2017; KARAMI et al., 2017; LOU et al., 2017). Em virtude da ocorrência de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis fenílicos dos aminoácidos aromáticos da BSA (triptofano, tirosina e fenilalanina), é possível notar a

formação de um pico de absorção em 280 nm, que pode ser influenciado por espécies que podem interagir com esta proteína (CAO et al., 2018; MOHAMADI et al., 2015). Os dados espectroscópicos referentes à absorção UV-vis da BSA livre e conjugada aos derivados LQIT/JF's estão detalhados na Tabela 4.

Tabela 4. Informações espectroscópicas de absorção UV-vis da BSA livre e conjugada com os derivados LQIT/JF's.

Derivado	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercromismo (%)^a	Kb (M⁻¹)
JF-249	278	279	01	36.20	1.19x10 ⁵
JF-250	279	279	-	64.17	1.30x10 ⁵
JF-251	279	278	01	63.20	1.24x10 ⁵
JF-252	278	278	-	40.32	1.20x10 ⁵
JF-253	278	278	-	49.12	1.30x10 ⁵
JF-254	279	278	01	61.68	1.33x10 ⁵
JF-255	278	278	-	28.15	1.12x10 ⁵
JF-256	278	278	-	54.90	1.46x10 ⁵
JF-257	278	278	-	58.84	1.25x10 ⁵
JF-258	278	279	01	66.78	1.60x10 ⁵

^aHipercromismo resultante da interação da albumina fixada em 20 μM com concentrações variadas dos compostos-testes (5-40 μM) em comparação com a albumina livre.

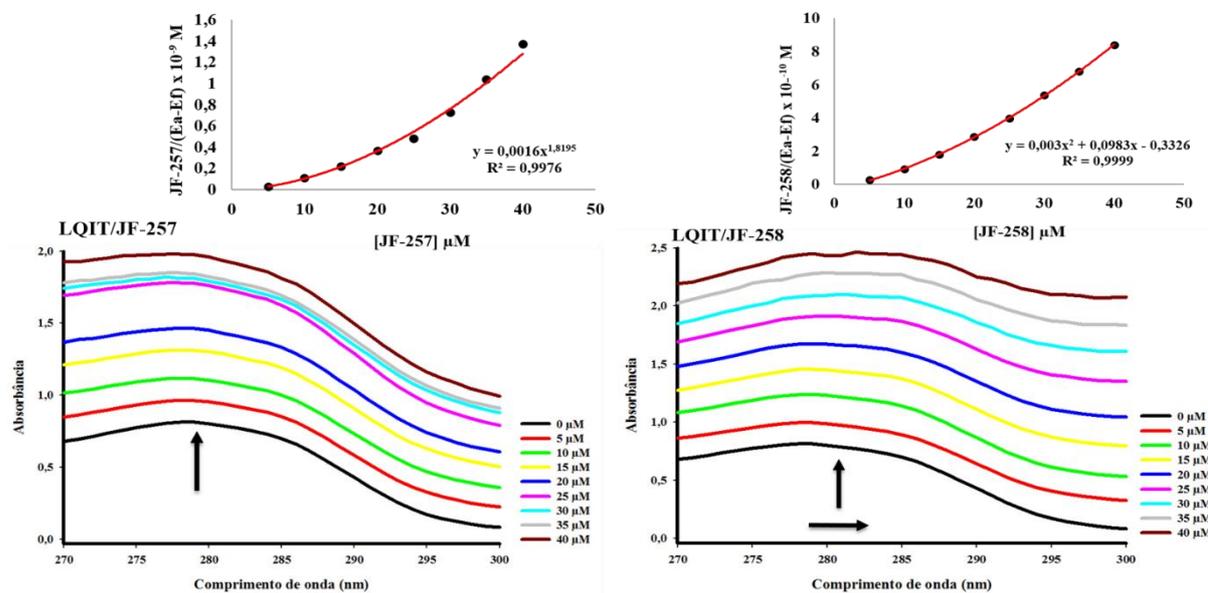
A proteína BSA apresentou pico máximo de absorção em 278 nm ou em 279 nm, como já era esperado, porquanto os picos monitorados com aproximação de 280 nm são característicos da presença de residuais dos aminoácidos aromáticos peculiares da BSA (KARTHIKEYAN; BHARANIDHARAN; KESHERWANI, 2015; SHAHRAKI; SHIRI; MANSOURI-TORSHIZI, 2016; SIDDIQUI et al., 2018). As variações na intensidade e na posição do pico máximo de absorção da BSA foram utilizadas para investigar a interação dos derivados indol-tiazólicos com esta biomolécula. A partir disto, após a interação da BSA na presença de quantidades crescentes dos compostos-testes (0-40 μM), pôde-se observar alterações espectrais nos comportamentos absorptivos da BSA, desvelando a ocorrência dos efeitos: hipercrômico, batocrômico, e hipsocrômico, os quais podem indicar a formação do

complexo BSA-ligante, dadas as mudanças observadas na faixa de 280 nm, indicando que o a proximidade dos resíduos de aminoácidos aromáticos é alterada (DRAVECZ et al., 2018).

Segundo os dados da tabela acima relativos ao hipercromismo, é estabelecida a seguinte ordem crescente resultante deste efeito: 255 < 249 < 252 < 253 < 256 < 257 < 254 < 251 < 250 < 258. Pode-se notar, portanto, que o composto responsável pelo maior efeito hipercrômico da interação com a BSA foi o derivado JF-258, indicando que a inserção dos halogênios cloro na posição *para* do anel aromático do benzeno, na porção lateral do núcleo tiazólico, e bromo na posição 5 do anel indólico foi crucial à ocorrência deste efeito. A interação destes compostos com os aminoácidos aromáticos intrínsecos da BSA, mediante fortes interações hidrofóbicas ou não-covalentes, pode levar a um aumento na energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e resultar na perturbação da estrutura secundária da BSA após a adição do derivado, culminando no aumento das propriedades absorptivas da BSA (KARAMI et al., 2017).

Ainda nessa perspectiva, nota-se também que a capacidade absorptiva da BSA aumentou após a interação com o JF-258, mesmo quando comparado com outros derivados portadores do anel benzênico não-substituídos (LQIT/JF's 252 e 256), como também com o JF-257, que também é portador de um cloro na posição *para* benzeno, mas ausente de um bromo na posição 5 do núcleo indol. Esses achados indicam que a presença de ambos os halogênios nas porções laterais do JF-258 foi substancialmente significativa no melhoramento da capacidade absorptiva da BSA, apontando que a adição de quantidades crescentes, sobretudo, deste composto removeu os resíduos de aminoácidos aromáticos para o meio aquoso, principalmente o Trp-213 e o Trp-214, os quais, originalmente, estão situados em bolsões hidrofóbicos, propiciando uma maior exposição destes e de outros aminoácidos aromáticos presentes na BSA, uma vez alterada a sua estrutura terciária (SAMARI et al., 2012). Os espectros de absorção UV-Vis resultantes da interação entre os derivados JF-257 e JF-258 e a BSA são mostrados na Figura 39, a seguir:

Figura 39. Espectros de absorção da BSA (20 μM) na presença de quantidades crescentes dos LQIT/JF's 257 e 258 (0-40 μM). As setas (\uparrow), (\leftarrow) e (\rightarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{LQIT/JF}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Curiosamente, a comparação do percentual calculado do efeito hiperacrômico resultante da interação entre o composto JF-258 e a BSA (66.78%) com o valor gerado do mesmo processo interativo com o JF-255 (28.15%), revela que os valores foram os extremos da escala crescente de hiperacromismo mostrada acima, mesmo ambos sendo portadores de um bromo na posição 5 do núcleo indol, diferindo apenas no halogênio inserido na posição *para* do anel benzênico da outra porção lateral, sendo o cloro para o JF-258 e o bromo para o JF-255, respectivamente. Tais resultados sugerem que o impedimento estérico característico do bromo, quando presente em ambas as extremidades das porções laterais de um dado composto, pode diminuir consideravelmente a reatividade do anel benzênico, possivelmente, por causa de uma redução na energia de transição entre os elétrons π durante a formação do complexo BSA-ligante, gerando, conseqüentemente, uma menor capacidade absorptiva desta biomolécula.

O resultado acima mostrado pode ser corroborado também quando comparamos o efeito hiperacrômico absorptivo da BSA quando exposta com os compostos JF-251 e JF-255, os quais diferem apenas pela ausência e presença do bromo na posição 5 do anel indólico, respectivamente. Observa-se que justamente pelo fato do JF-251 não ser portador deste halogênio em uma de suas porções laterais, seu efeito hiperacrômico tem um valor muito mais elevado (63.20%) em relação ao JF-255 (28.15%), possivelmente, por se tratar de um elemento muito volumoso, e quando inserido nas extremidades das porções laterais do

referido derivado pode ter minimizado a capacidade absorptiva da BSA, uma vez decorrido o processo de interação.

Concernente aos derivados portadores de ésteres carboxílicos, pode-se inferir a partir dos dados da Tabela 4, que os compostos que apresentam o dietil-acetileno (JF-250 e JF-254) exibiram uma maior capacidade de elevar o perfil absorptivo da BSA, quando comparados com os portadores do substituinte dimetil-acetileno (JF-249 e JF-253). Este resultado indica uma maior contribuição do grupo etila na reprodução do efeito hipercrômico, ao interagir com esta biomolécula, possivelmente, por se tratar de um grupo alquila com um carbono a mais que o grupo metila, influenciando diretamente na transição de elétrons π , gerando mais efeitos eletrônicos o que potencializa o hipercromismo constatado.

Foi verificado também, a leve ocorrência do efeito hipsocrômico (deslocamento do pico máximo de absorção para o azul) para os derivados JF-251 e JF-254, com uma variação de 01 nm para ambos e do efeito batocrômico (deslocamento do pico máximo de absorção para o vermelho) para os compostos JF-249 e JF-258, também com uma variação de 01 nm. Esses efeitos apontam para uma maior estabilização da formação do complexo BSA-ligante, acarretando mudanças na conformação e na polaridade do microambiente ao redor dos residuais de aminoácidos aromáticos presentes nos sítios da BSA, efeitos resultantes da inserção dos derivados na estrutura desta proteína plasmática (EBRAHIMIPOUR et al., 2017; JANNESARI et al., 2013).

Mesmo após decorrido o processo de interação, os demais derivados não alteraram o pico máximo de absorção da BSA, permanecendo intacto o que indica a preservação do microambiente em torno dos cromóforos da BSA, mesmo depois da interação com os derivados LQIT/JF's 250, 252, 253, 255, 256 e 257 (BANIPAL et al., 2016; KAUR et al., 2018; XU et al., 2013).

No que diz respeito a constante de afinidade (K_b) da BSA para com os derivados, é possível observar na Tabela 4 acima os valores calculados, que em ordem crescente gera a seguinte sequência: $255 < 249 < 252 < 251 < 257 < 250 = 253 < 254 < 256 < 258$. Percebe-se que o composto que apresentou maior afinidade com a BSA também foi o mesmo que apresentou o maior efeito hipercrômico e desvio de 01 nm para o vermelho (efeito batocrômico): o derivado LQIT/JF-258 ($K_b = 1.60 \times 10^5$), indicando a relevância da presença de halogênios conjugados aos grupos farmacofóricos indol e tiazol na deslocalização do pico máximo de absorção para uma faixa de absorção de UV maior.

Tais efeitos, provavelmente, ocorreram pela presença de halogênios, os quais são portadores de pares de elétrons livres, que interagiram com os elétrons em ressonância dos

aneis aromáticos dos aminoácidos Trp, Tyr e Phe da BSA aumentando a densidade eletrônica destes núcleos, o que pode implicar numa interação de natureza não-covalente. Essa interação pode ocorrer através do empilhamento π - π entre os anéis aromáticos do derivado e os anéis fenólicos da BSA acima citados, localizados na cavidade de ligação da BSA (CHEN; ZHANG; LIU, 2013).

Do mesmo modo que no resultado observado no efeito hipercrômico discutido acima, o derivado JF-257 apresentou uma menor afinidade com a BSA, como também foi responsável por um menor efeito hipercrômico quando comparado ao JF-258, mesmo sendo também portador do substituinte *p*-cloro-benzilideno. Este achado indica que a presença do bromo na posição 5 do indol foi fundamental para aprimorar tanto o efeito hipercrômico, quanto a afinidade com esta biomolécula.

É possível constatar que o composto JF-255 obteve a menor constante de afinidade com a BSA ($K_b = 1.12 \times 10^5$), corroborando com o resultado do referido derivado para o efeito hipercrômico. Portanto, há uma similitude em ambos os resultados para o dado composto, a partir da interação com a BSA, sugerindo que a presença do bromo em ambas as porções laterais do composto citado foi crucial tanto na diminuição da capacidade absorptiva da BSA, quanto na afinidade desta para com este derivado, provavelmente, em função de suas propriedades químicas estéricas, conforme antes discutido.

Contudo, o derivado JF-251, portador de um *p*-bromo-benzilideno e de um núcleo indol não substituído na outra porção lateral, melhorou levemente a afinidade com a BSA ($K_b = 1.24 \times 10^5$), quando comparado com o JF-255, portador do bromo em ambas as porções laterais ($K_b = 1.12 \times 10^5$). Semelhantemente aos resultados encontrados nos valores da constante de afinidade dos derivados com o ctDNA (Tabela 1), o derivado JF-251 apresentou também uma menor afinidade com a BSA ($K_b = 1.24 \times 10^5$) em comparação com o JF-257 (1.25×10^5). A mesma explicação dada para o ctDNA pode ser aplicada para a BSA. O fato do JF-251 possuir um átomo de bromo na posição *para* do anel benzênico pode minimizar a afinidade do composto pela BSA, por se tratar de um átomo muito volumoso, sendo capaz de diminuir a interação com a BSA em virtude de um impedimento estérico, resultado este indicativo de uma melhor afinidade também da BSA com um *p*-cloro-benzilidino (JF-257) do que com um *p*-bromo-benzilideno (JF-251).

Ainda nesse aspecto, podemos constatar que o JF-256 apresentou também uma grande afinidade com a BSA ($K_b = 1.46 \times 10^5$), ficando atrás apenas do JF-258 ($K_b = 1.60 \times 10^5$), os quais diferem na presença de um anel benzênico não-substituído e de um *p*-cloro-benzilideno, respectivamente. Porém, ambos possuem um bromo na posição 5 do anel indólicos com maior

afinidade pela BSA em comparação com a vitamínica C, cujo valor de K_b é de 1.39×10^4 , segundo estudos realizados por ALSAMAMRA; ABUSHARKH; ABUTEIR, 2018.

O referido derivado JF-256 exibiu um maior efeito hipercrômico no processo de interação com o ctDNA (Tabela 1), aumentando em 71.87% o perfil absorptivo desta biomolécula acompanhado de um deslocamento do pico máximo de absorção para a região do vermelho (efeito batocrômico) com uma variação de 15 nm, indicando uma maior estabilidade do complexo ctDNA-ligante, como discutido anteriormente. Esses resultados corroboram que a inserção do substituinte benzeno não-substituído ao núcleo tiazólico, bem como a adição de um bromo ao núcleo indólico são importantes, pois, supostamente, são responsáveis por uma maior exposição dos elétrons, o que contribui tanto para o aumento da absorptividade do ctDNA, quanto na afinidade deste derivado pela BSA.

4.2.2.2 Ensaios espectroscópicos de supressão da emissão fluorescente

A análise qualitativa dos compostos químicos ligados à BSA pode ser realizada através de estudos de supressão de fluorescência, uma técnica sensível, eficaz e muito utilizada no intuito de se investigar a interação entre um determinado ligante e esta biomolécula, pois é capaz de prever possíveis alterações em seu respectivo espectro de fluorescência, uma vez ocorrida a formação do complexo entre estes (KAUR et al., 2018; LIU et al., 2018; RUDRA et al., 2016, 2017). Essa extinção resulta da redução do rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo induzido por uma interação com uma molécula extintora. Um aumento na concentração do extintor irá mascarar o fluoróforo, causando perturbações no ambiente molecular deste, o que pode gerar alterações nos espectros de fluorescência na ausência e presença de um extintor (ALSAMAMRA; ABUSHARKH; ABUTEIR, 2018; KARAMI et al., 2017; METI et al., 2014; THOTA et al., 2016).

Geralmente, a fluorescência endógena da albumina deve-se a presença de três aminoácidos aromáticos, os quais correspondem aos resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina (ARUMUGAM; SUBRAMANIAN; MALAICHAMY, 2016; EBRAHIMPOUR et al., 2017; PAWAR; OTTOOR, 2018). Quando excitada em torno de 280 nm, a BSA exibe uma forte emissão fluorescente em torno de 340 nm, causada principalmente pelo triptofano, porque a fluorescência da tirosina é praticamente extinta se estiver em meio ionizado ou próximo a um grupo carboxila, amino ou mesmo a um resíduo de triptofano e a fenilalanina possui um rendimento quântico muito baixo (CAO et al., 2018; GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; MOHAMADI et al., 2017; QIN; YIN; SHEN, 2015; SHI et al., 2018).

Os residuais de triptofano (Trp) são mais sensíveis às mudanças no microambiente, por este motivo, é amplamente utilizado como uma sonda fluorescente endógena para pesquisar a interação de ligação entre proteínas e protótipo/fármacos (CHEN et al., 2015; GOUVEIA et al., 2018; LIU et al., 2018; SHI et al., 2016a). O Trp-134 está localizado na superfície da BSA, no subdomínio IA, uma região mais hidrofílica (JANA et al., 2012), enquanto o Trp-212 está localizado dentro de um sítio de ligação hidrofóbico da proteína, no subdomínio IIA (EBRAHIMPOUR et al., 2017; ROY et al., 2017). A emissão fluorescente da BSA depende da exposição dos resíduos de Trp à polaridade do solvente e de grupos extintores que o circundam (ARUMUGAM; SUBRAMANIAN; MALAICHAMY, 2016). Mudanças na conformação da proteína, rearranjos moleculares, formação de complexos ou mesmo à ocorrência de colisões, acarretam uma transferência de energia ou desnaturação detectadas pela supressão fluorescente, técnica que pode indicar os mecanismos, constantes e sítios de ligação entre a BSA e seu ligante (DOMÍNGUEZ; CORTÉS-FIGUEROA; MELÉNDEZ, 2017; MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018; THOTA et al., 2016). Por isso, medições da extinção de fluorescência foram realizadas para investigar ainda mais as interações dos novos derivados indol-tiazólicos com a BSA.

Neste estudo, a BSA ainda livre revelou picos de emissão fluorescente em comprimentos de onda em 341 e 342 nm quando excitada em 285 nm. Os derivados LQIT/JF's, em solução tampão de Tris-HCl (pH 7,6; 0,1 M) não apresentaram qualquer emissão na região de 300-400 nm, onde as albuminas séricas têm forte fluorescência sobre excitação em torno de 280 nm (BALAKRISHNAN et al., 2018; GOUVEIA et al., 2018). Já quando conjugada aos derivados LQIT/JF's, esta biomacromolécula apresentou picos emissivos de 339 nm a 347 nm, indicando êxito na interação BSA-JF's. Foi constatado que o percentual de supressão fluorescente atingiu valores de 43.72% a 95.90% (Tabela 5).

Seguidamente, os dados espectroscópicos da emissão fluorescente da BSA, em função de concentrações variadas dos derivados são detalhados na Tabela 5.

Tabela 5. Informações espectroscópicas de emissão fluorescente da BSA livre e conjugada aos compostos LQIT/JF's.

Derivado	λ_{exc} (nm)	Bandas Exc_Emi (nm)	$\lambda_{máx}$ livre (nm)	$\lambda_{máx}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipo cromismo (%) ^a	K_{sv} (M ⁻¹) ^b
JF-249	285	2.5_2.5	342	345	03	43.72	3.28x10 ⁴
JF-250	285	2.5_2.5	341	347	06	50.12	5.86x10 ⁴
JF-251	285	2.5_2.5	341	339	02	85.80	11.06x10 ⁴
JF-252	285	2.5_2.5	342	340	02	62.67	5.75x10 ⁴
JF-253	285	2.5_2.5	342	347	05	71.54	10.26x10 ⁴
JF-254	285	2.5_2.5	341	346	05	57.29	5.58x10 ⁴
JF-255	285	2.5_2.5	342	341	01	70	7.05x10 ⁴
JF-256	285	2.5_2.5	342	341	01	87.50	6.64x10 ⁴
JF-257	285	2.5_2.5	343	343	-	50	3.44x10 ⁴
JF-258	285	2.5_2.5	343	343	-	72	7.23x10 ⁴

^aHipocromismo resultante da interação da albumina fixada em 20 μ M com concentrações variadas dos compostos-testes (5-40 μ M) em comparação com a albumina livre.

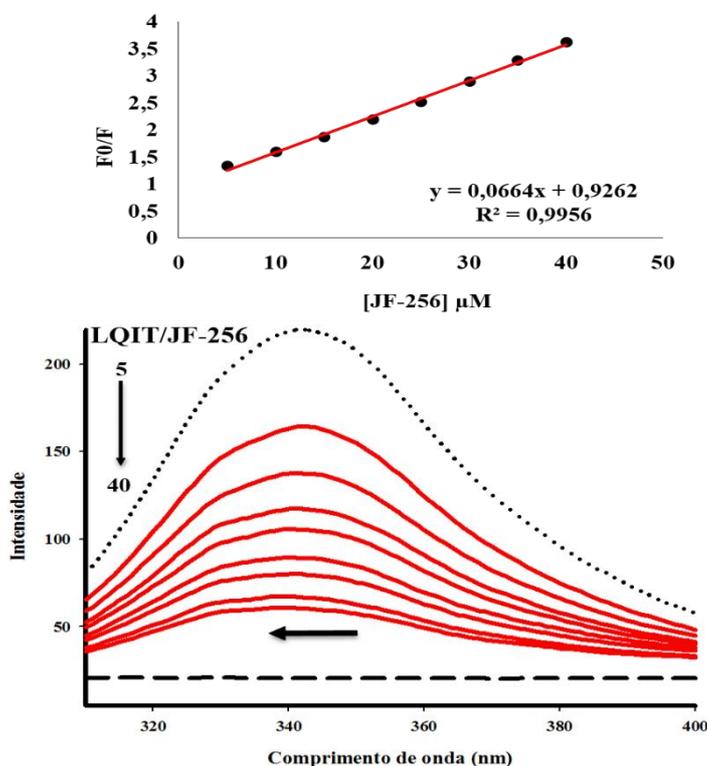
^bConstante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) obtida com base nos dados de fluorescência com a BSA.

As variações na intensidade e na posição do pico máximo de supressão fluorescente da BSA foram utilizadas para investigar a interação dos derivados indol-tiazólicos com esta biomolécula. Os espectros de fluorescência da BSA apresentaram alterações, mostrando diminuição das suas propriedades emissivas, reiterando a relevância dos substituintes na reprodução deste efeito o que confirma o processo de interação dos derivados com a BSA, indicando que todos os derivados LQIT/JF's foram capazes de extinguir a fluorescência intrínseca da BSA (LIU et al., 2018; METI et al., 2014).

Pode-se notar, portanto, que o composto responsável pelo maior efeito hipocrômico da emissão fluorescente da BSA foi o derivado JF-256 (Figura 40), indicando que a inserção do halogênio bromo na posição 5 do anel indólico, bem como a presença de uma anel benzênico não-substituído, na outra porção lateral, foi crucial à provocação de mudanças no ambiente do triptofano de BSA, a partir da formação do complexo BSA-ligante (DAHIYA; PAL, 2018; GANESHPANDIAN et al., 2014; KARAMI et al., 2017), quando comparado com os outros

compostos também portadores ou não do bromo na posição 5 do indol ou providos de substituições no anel benzênico na outra porção lateral, como o JF-255, JF-252 e o JF-257, respectivamente.

Figura 40. Espectros de supressão fluorescente da BSA (20 μM) na ausência (.....) e na presença e na presença do derivado LQIT/JF-256 (—). A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (---). As setas (\downarrow) e (\rightarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), à temperatura ambiente, e o efeito batocrômico, respectivamente. Inseto: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.



Esses resultados são similares aos apresentados nos estudos de emissão fluorescente para o complexo ctDNA-BE, no qual o composto que exibiu uma maior expressividade no referido ensaio, responsável pelo maior perfil hipocrômico, foi justamente o derivado JF-256, revelando um percentual de hipocromismo de 22.34% (Tabela 5).

Diferentemente dos resultados obtidos nos estudos de interação a partir da absorção UV-vis, o composto JF-258 não apresentou o melhor efeito supressor, o que infere no desfavorecimento do substituinte *p*-cloro-benzilideno no processo de supressão fluorescente da BSA, dado o fato da presença desse substituinte ser a única diferença entre o referido composto e o JF-256. Semelhante aos resultados obtidos pelos ensaios espectroscópicos de absorção UV-visível, o derivado JF-251 apresentou melhores resultados, quando comparado ao JF-255. Lembrando que a diferença entre ambos reside no fato deste último portar um

bromo na posição 5 do indol, enquanto o primeiro não o possui, apontando que a presença do bromo nas porções laterais do composto não contribui significativamente no que concerne à supressão emissiva da BSA.

A comparação dos compostos portadores de substituintes gerados a partir de reações com distintas acetofenonas (JF-251, JF-252, JF-255, JF-256, JF-257 e JF-258), com os compostos com substituintes gerados a partir de reações com diferentes ésteres carboxílicos, revela que estes últimos apresentaram uma menor capacidade extintora da emissão fluorescente da BSA, mostrando a importância das acetofenonas na promoção de alterações na estrutura terciária desta proteína, levando a mudanças no ambiente de triptofano da BSA provavelmente devido formação do complexo BSA-ligante (CANOVIC et al., 2017; DOMÍNGUEZ; CORTÉS-FIGUEROA; MELÉNDEZ, 2017; THOTA et al., 2016).

Com exceção do derivado JF-255, é possível observar que todos os compostos providos do halogênio bromo na posição 5 do anel indólico (JF-253, JF-254, JF-256 e JF-258) obtiveram os resultados mais eficazes no tocante à capacidade de suprimir a fluorescência da BSA, em relação aos respectivos derivados similares que não o possuem (JF-249, JF-250, JF-252, JF-257), com exceção do JF-251. Tais resultados sugerem que o impedimento estérico característico do bromo, bem como seu caráter hidrofóbico, quando presente em pelo menos uma das extremidade das porções laterais de um dado composto, pode contribuir circunstancialmente em alterações nas propriedades da BSA, elevando-as ou minimizando-as, dependendo dos grupos/núcleos químicos aos quais o referido halogênio esteja ligado.

Ganeshpandian et al. (2014) fizeram testes de supressão fluorescente com a BSA, utilizando compostos providos de substituintes hidrofóbicos, como o piridil. De acordo com as titulações efetuadas, foi observado que as amostras portadoras de um maior número destes grupos elevavam a hidrofobicidade, o que favoreceu a afinidade com a BSA e, subsequentemente, exibiram os melhores resultados no tocante à capacidade supressora emissiva da fluorescência dos triptofanos da BSA, em relação a outras que não o possuíam ou que o apresentavam com um número menor. Os derivados LQIT/JF's testados neste trabalho são providos de anéis heterocíclicos nitrogenados (núcleos indol e tiazol), o que contribui relevantemente com a hidrofobicidade, auxiliando, portanto no processo de interação com a BSA, sobretudo, se estiverem ligados a grupos substituintes que compartilham da mesma propriedade físico-química de hidrofobicidade como é o caso do halogênio bromo.

No que concerne aos derivados portadores de ésteres carboxílicos, pode-se inferir pela Tabela 5, que os compostos que apresentam o dietil acetileno (JF-250 e JF-254) exibiram uma maior capacidade de suprimir a fluorescência da BSA, quando comparados com ao portador

do substituinte dimetil acetileno (JF-249). No entanto, excepcionalmente, o derivado JF-253, portador de um bromo na posição 5 do anel indólico e de um dimetil acetileno na outra porção lateral, apresentou uma relevante eficiência na reprodução do efeito hipocrômico durante o processo de interação com a BSA.

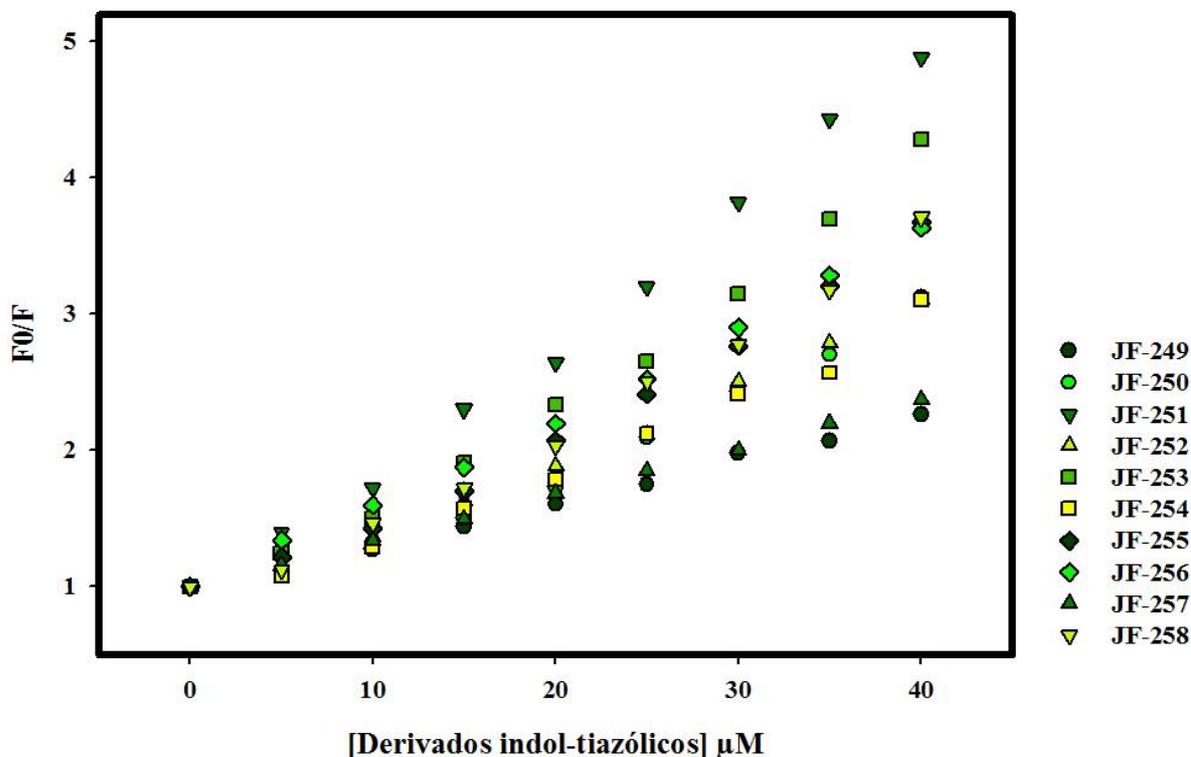
Os dados da Tabela 5 revelam também a leve ocorrência do efeito hipsocrômico (deslocamento do pico máximo de emissão fluorescente para o azul) para os derivados JF-255, JF-256 ($\Delta\lambda = 01$ nm para ambos), JF-251 e JF-252 ($\Delta\lambda = 02$ nm para ambos) e do efeito batocrômico (deslocamento do pico máximo de emissão fluorescente para o vermelho) para os compostos JF-249 ($\Delta\lambda = 03$ nm) JF-243, JF-254 ($\Delta\lambda = 05$ nm para ambos) e JF-250 ($\Delta\lambda = 06$ nm). Os derivados JF-257 e JF-258 não foram capazes de causar nenhum tipo de desvio do pico máximo de emissão fluorescente da BSA.

Nesse aspecto, é reportado na literatura que o deslocamento do pico máximo de supressão para a região do vermelho (efeito batocrômico) implica na formação de complexos de BSA, que alteram a polaridade do microambiente dos triptofanos intrínsecos, podendo ocorrer a transferência destes para uma região mais hidrofílica (CANOVIC et al., 2017; JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2016; LIU et al., 2018). Já a ocorrência de desvios para o azul podem anunciar a formação do complexo BSA-ligante, sugerindo que os residuais de triptofano estão num microambiente mais polar ou mais hidrofóbico, comparado com aquele em que a BSA livre está inserida, ocasionando a extinção da fluorescência desta biomolécula (LI et al., 2011; MAKARSKA-BIALOKOZ, 2018; PAUL et al., 2017; SASMAL et al., 2018).

Entretanto, a ausência de deslocamento do pico máximo de emissão dos triptofano, a 340 nm, estabelecido o processo de interação da BSA com um determinado ligante, é uma característica indicativa de ligação próxima aos resíduos de triptofano sem, contudo, perturbar o microambiente que o cerca, uma vez que não estão sendo expostos a qualquer alteração na polaridade de seu microambiente (BELATIK et al., 2012a; CHAVES et al., 2018; DRAVECZ et al., 2018).

No que diz respeito a constante de supressão fluorescente (K_{sv}) da BSA, determinada por regressão linear da intensidade de emissão relativa (F_0/F), em função das concentrações crescentes dos derivados indol-tiazólicos (LAKOWICZ, 2006) (Figura 41), é possível observar na Tabela 5 os valores calculados para cada composto, a partir dos quais pode-se depreender a seguinte sequência de ordem crescente: $249 < 257 < 254 < 252 < 250 < 256 < 255 < 258 < 253 < 251$.

Figura 41. Intensidade de fluorescência relativa dos novos derivados indol-tiazólicos LQIT/JF's, no complexo BSA-ligante, em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6).



Percebe-se que o composto que apresentou uma maior constante de supressão fluorescente ao interagir com a BSA também foi o mesmo responsável pelo desvio do pico de máximo de emissão fluorescente para o azul, em 2nm, o derivado LQIT-JF-251 (11.06×10^4). Ou seja, a presença do halogênio bromo ligado ao anel benzênico neste composto contribuiu na supressão da emissão fluorescente desta proteína plasmática, uma vez que o seu similar, o JF-255, portador também de outro bromo ligado na posição 5 do indol, teve uma capacidade extintora da emissão fluorescente da BSA menos expressiva.

Sasmal et al. (2018) realizaram testes de emissão da fluorescência intrínseca da BSA, a fim de investigar o modo de interação da sonda fluorescente um conjugado à base de fenantreno-pireno, sendo sua estrutura química repleta de anéis aromáticos condensados, além de portar um heterociclo portador de dois nitrogênios, semelhante ao esqueleto dos derivados LQIT/JF's estudados neste trabalho. Os resultados encontrados pelo citado grupo de pesquisa foram semelhantes aos mostrados pelo derivado JF-251, porquanto, após o processo de interação, a intensidade de emissão da BSA diminuiu consideravelmente, provocando também um pequeno deslocamento do pico máximo para o azul ($\Delta\lambda = 4 \text{ nm}$), cujos achados os

levaram a inferir que a substância testada se liga fortemente à BSA e que o microambiente em torno das unidades de Trp presente na BSA são modificadas durante o processo de interação.

Ainda nessa perspectiva, é possível reiterar a importância do bromo, uma vez que os derivados que geraram os maiores valores para o K_{sv} são, principalmente, os que possuem ligado na posição 5 do anel indólico (JF-253, JF-254, JF-255, JF-256 e JF-258) ou ligado ao anel benzênico (JF-251), em comparação à aqueles que não o possuem em sua estrutura química molecular (JF-249, JF-250, JF-252 e JF-257), possivelmente, pelo fato do bromo promover maior hidrofobicidade ao meio, propiciando uma maior interação com as cavidades hidrofóbicas da BSA, favorecendo o processo de extinção da supressão de sua fluorescência natural, possivelmente, por ocasionar mudanças conformacionais na estrutura secundária desta biomacromolécula (CHEN; ZHANG; LIU, 2013; HAZRA; DEY; ANIMESH, 2018; PAWAR; OTTOOR, 2018).

Gouveia et al. (2018) avaliaram a interação da BSA com protótipos acridínicos portadores de diferentes parasubstituintes ligado ao anel benzênico. Foi observado que o composto que apresentou o maior valor para a constante de supressão fluorescente (K_{sv}) portava um grupo hidrofóbico, consolidando a importância de grupos lipofílicos no processo de interação com esta proteína plasmática.

Diferentemente dos resultados obtidos a partir dos estudos de absorção UV-vis, os derivados JF-257 e JF-258 não exibiram uma capacidade notável da supressão da fluorescência da BSA, nem apresentaram um valor de K_{sv} expressivo, desvelando que a presença do substituinte *p*-cloro-benzilideno desfavorece o potencial extintor da fluorescência desta biomolécula.

Curiosamente, o derivado JF-256, o qual obteve uma maior perfil de supressão da fluorescência da BSA, não apresentou o maior valor para a constante de supressão. Este possui apenas um bromo na posição 5 do núcleo indólico. Já o JF-251, como discutido previamente, apresentou o maior valor do K_{sv} e o segundo maior percentual de hipocromismo, revelando que a presença do bromo ligado ao anel benzênico é ainda mais crucial na geração dos efeitos responsáveis pela supressão do complexo BSA-ligante, que a sua existência na posição 5 do anel indólico, melhorando sua capacidade até quando comparado com o JF-255, portador deste halogênio em ambas as posições acima mencionadas.

À luz dos efeitos constatados nos estudos de interação dos derivados LQIT/JF's com a BSA usando as técnicas espectroscópicas de absorção UV-vis e supressão da emissão fluorescente, a partir da quais foram evidenciadas nítidas alterações nos espectros absorptivos e

emissivos, pode-se depreender os novos derivados indol-tiazólicos são promissores candidatos à fármacos, uma vez que interagem significativamente com a BSA, dada a constatação da formação do complexo BSA-ligante (ARUMUGAM; SUBRAMANIAN; MALAICHAMY, 2016; BELATIK et al., 2012b; SHI et al., 2016b; SINGH; MITRA, 2018; WU et al., 2018).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os novos dez derivados indol-tiazólicos foram sintetizados exitosamente com a rota de síntese proposta e suas estruturas químicas foram elucidadas adequadamente através das técnicas de caracterização utilizadas.

No que concerne aos estudos de ligação com o ctDNA, mediante as técnicas empregadas, foi observado que o modo de interação entre os novos derivados indol-tiazólicos e o ctDNA é via ligação aos sulcos desta biomolécula. Pela técnica espectroscópica de absorção UV-Vis, foi possível observar que os compostos JF-252 e JF-255 (não-substituído e dissustituído com bromo, respectivamente) apresentaram as maiores constantes de afinidade com esta biomolécula ($K_b = 6.99 \times 10^6$ e 3.12×10^6 , respectivamente). Por meio da técnica espectroscópica de deslocamento do BE por emissão fluorescente, notou-se que os compostos JF-252 e JF-256 (não-substituído e monossustituído com bromo, respectivamente) apresentaram a maior constante de supressão fluorescente do complexo BE-ctDNA ($K_{sv} = 0.77 \times 10^4$, para ambos).

Estudos de dicroísmo circular demonstraram que os derivados JF-254 e JF-251 (ambos monossustituídos com bromo) foram os que propiciaram maior alteração nas bandas positiva e negativa do ctDNA, exibindo 33,30 % e 39,75 % de hipercromismo, respectivamente.

Através das medições de viscosidade, foi possível averiguar que os derivados JF-252 e JF-256 foram os compostos que mais alteraram a viscosidade relativa do ctDNA, mas foi insignificante comparado às alterações ocasionadas pelo BE, uma sonda intercalante.

No que diz respeito aos estudos de ligação com a BSA, medidas de absorção UV-Vis demonstraram os compostos JF-258 e JF-256 (dissustituído com cloro e bromo e monossustituído com bromo, respectivamente) apresentaram o maior valor para a constante de afinidade com esta biomolécula ($K_b = 1.60 \times 10^5$ e 1.46×10^5 , respectivamente).

No tocante à supressão da emissão fluorescente da BSA, os derivados JF-251 e JF-253 (ambos monossustituídos com bromo) apresentaram os maiores valores para a constante de supressão fluorescente ($K_{sv} = 11.06 \times 10^4$ e 10.26×10^4 , respectivamente).

Ainda nesse contexto, pode-se predizer que os derivados indol-tiazólicos apresentam a habilidade de suprimir a emissão fluorescente intrínseca da BSA.

Em geral, pode-se predizer que o composto JF-256 foi o derivado mais promissor, por ter a capacidade de interagir significativamente com ambas as biomacromoléculas usadas nessa pesquisa, sendo um forte candidato a um fármaco antitumoral.

Os resultados indicam os novos derivados indol-tiazólicos propostos são promissores, dada a sua capacidade em interagir com biomacromoléculas de interesse científico como o ctDNA e a BSA, comprovando que a inserção dos substituintes propostos foram relevantes na contribuição dos efeitos verificados, os quais devem ser investigados com mais meticulosidade por meio de técnicas adicionais e determinar seu mecanismo de ação, uma vez que seu potencial antineoplásico já é bem reportado e serão investigados em testes futuros.

6 PERSPECTIVAS

- Investigar a atividade antitumoral dos novos derivados indol-tiazóilcos, analisando suas propriedades antiproliferativas *in vitro* com linhagens de células tumorais bem como seu potencial citotóxico em células não transformadas;
- Realizar testes *in silico*, como o docking molecular para corroborar os sítios de ligação entre as biomoléculas e os derivados testados;
- Realizar estudos de interação com outras sondas fluorescentes para consolidar os resultados encontrados neste trabalho;
- Realizar estudos alusivos ao potencial destes compostos em inibir a ação da enzima topoisomerase II α .

REFERÊNCIAS

- ABD-ELZAHER, M. M. et al. Synthesis , anticancer activity and molecular docking study of Schiff base complexes containing thiazole moiety. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 85–96, 2016.
- ABDEL-MAKSOUUD, M. S. et al. Design, synthesis, in vitro anticancer evaluation, kinase inhibitory effects, and pharmacokinetic profile of new 1,3,4-triarylpyrazole derivatives possessing terminal sulfonamide moiety. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 97–109, 2018.
- ABDI, K. et al. Interaction of 5-Fluorouracil and its derivatives with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 107, p. 20–26, 2012.
- AGRAWAL, N.; MISHRA, P. The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 5, p. 1309–1344, 2018.
- AL-SHEMARY, R. K. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Schiff Bases and Their Co(II), Cu(II), Ni(II) Chelates from Derivative Containing Indole Moiety Bearing-Triazole Ring. **European Chemical Bulletin**, v. 6, n. 10, p. 433–439, 2017.
- ALEKSI, M. M.; KAPETANOVIC, V. An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA – Drug Interactions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 61, p. 555–573, 2014.
- ALEXANDER, C. M. et al. Multifunctional DNA-Gold Nanoparticles for Targeted Doxorubicin Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1261–1271, 2014.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA Binders in Clinical Trials and Chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 16, p. 4506–4521, 2014.
- ALI, M. S. et al. Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: a multi spectroscopic and molecular modelling study. **RSC Advances**, v. 8, p. 9083–9093, 2018a.
- ALI, M. S. et al. Human serum albumin binding to the biologically active labdane diterpene “leoheterin”: Spectroscopic and in silico analysis. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 182, p. 9–17, 2018b.
- ALIZADEH, B. H. et al. Spectroscopic and Molecular Docking Studies on DNA Binding Interaction of Podophyllotoxin. v. 29, n. 2, p. 121–127, 2018.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 13023–13042, 2015.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, 2016.

ALMEIDA, S. M. V et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538–1556, 2017.

ALSAMAMRA, H.; ABUSHARKH, S.; ABUTEIR, M. Comparative Studies on the Interaction of Human and Bovine Serum Albumins with Vitamin C. **European Journal of Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 17–22, 2018.

ALTINTOP, M. D. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of a New Series of Thiazole-Based Anticancer Agents as Potent Akt Inhibitors. **Molecules**, v. 23, p. 1–17, 2018.

AMIT, C. et al. Chemistry of anticancer thiazole compounds. **Advanced Journal of Pharmacie and Life Science Research**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.

AMNERKAR, N. D.; BHONGADE, B. A.; BHUSARI, K. P. Synthesis and biological evaluation of some 3-thiazole-2-amines and their Schiff bases. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 4–11, 2014.

AMROABADI, M. K. et al. Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and apo-human serum transferrin as a drug carrier protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 263–271, 2018.

ANEJA, B. et al. N-Substituted 1,2,3-Triazolyl-Appended Indole-Chalcone Hybrids as Potential DNA Intercalators Endowed with Antioxidant and Anticancer Properties. **Medicinal Chemistry & Drug Discovery**, v. 3, p. 2638–2645, 2018.

ANITHA, P. et al. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium (II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 129, p. 17–26, 2013.

AQUINO, T. M. et al. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones 5-thiazolidineacetic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 446–456, 2008.

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

ARUMUGAM, S. S.; SUBRAMANIAN, N.; MALAICHAMY, I. New insights into the dimerization and site-specific cooperative interaction of Azure B with model transport proteins by spectroscopic and computational studies. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 164, p. 212–225, 2016.

ASADI, Z. et al. Substituted effect on some water-soluble Mn(II) salen complexes: DNA binding, cytotoxicity, molecular docking, DFT studies and theoretical IR & UV studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 278–294, 2018.

AURAS, B. L. et al. Synthesis, spectroscopic/electrochemical characterization and DNA interaction study of novel ferrocenyl-substituted porphyrins. **Applied Organometallic**

Chemistry, v. 32, n. 5, p. 1–12, 2018.

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.

BALAKRISHNAN, G. et al. Synthesis, photophysics and the binding studies of rhenium(I) diimine surfactant complexes with serum albumins: A spectroscopic and docking study approach. **Journal of Luminescence**, n. 205, p. 51–60, 2018.

BANDINI, M. Electrophilicity: the “dark-side” of indole chemistry. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, p. 5206–5212, 2013.

BANIPAL, T. S. et al. Exploring thermodynamics and conformational aspects of nicotinic acid binding with bovine serum albumin: A detailed calorimetric, spectroscopic and molecular docking study. **RSC Advances**, v. 41, n. 6, p. 34754–34769, 2016.

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

BARVE, A. et al. Mixed-Ligand Copper (II) Maltolate Complexes: Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage, and Cytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 9120–9132, 2009.

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

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

BELATIK, A. et al. Locating the Binding Sites of Pb (II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012b.

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

BHATTACHARJEE, P. et al. Therapeutic potential of harmaline, a novel alkaloid, against cervical cancer cells in vitro: Apoptotic induction and DNA interaction study. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 6, n. 04, p. 1–8, 2018.

BI, S.; ZHANG, H.; QIAO, C. Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, p. 123–129, 2008.

BÍBLIA SAGRADA. Antigo Testamento. **Salmos 126:2**. Tradução em Português. 4ª Edição. Barueri-SP: João Ferreira de Almeida, 2011. 3-1664.

BIRMANN, P. T. et al. 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole, a new selenium compound elicits an antinociceptive and anti-inflammatory effect in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 827, p. 71–79, 2018.

BISWAL, S. et al. Indole: the molecule of diverse biological activities. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 1, p. 2–7, 2012.

BOZOGLAN, B. K.; TUNÇ, S.; DUMAN, O. Investigation of neohesperidin dihydrochalcone binding to human serum albumin by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 155, p. 198–204, 2014.

BURAKA, E. et al. DNA-binding studies of AV-153, an antimutagenic and DNA repair-stimulating derivative of 1,4-dihydropyridine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 200–207, 2014.

CAMARGO, R. C. et al. Spectral and computational features of the binding between riparins and human serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 81–88, 2018.

CANKILIÇ, M. Y.; YURTTAŞ, L. Study on the Antimicrobial Effects of Novel Thiazole Derivatives. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, p. 654–659, 2017.

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.

CAO, X. et al. Characterization of interaction between scopolamine and bovine serum albumin: spectroscopic and molecular docking methods. **RSC Advances**, v. 8, p. 25519–25525, 2018.

CARVALHO, J. et al. Study of the interaction between indole-based compounds and biologically relevant G-quadruplexes. **Biochimie**, v. 135, p. 186–195, 2017.

CHADHA, N.; SILAKARI, O. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 134, p. 159–184, 2017.

CHANDRAN, A.; GHOSHDASTIDAR, D.; SENAPATI, S. Groove Binding Mechanism of Ionic Liquids: A Key Factor in Long-Term Stability of DNA in Hydrated Ionic Liquids? **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 20330–20339, 2012.

CHANDRAPPA, S. et al. Synthesis and in vivo anticancer and antiangiogenic effects of novel thioxothiazolidin-4-one derivatives against transplantable mouse tumor. **Medicinal Chemistry Research**, v. 19, p. 236–249, 2010.

CHAUBET, G. et al. A tandem aza-Friedel-Crafts reaction/Hantzsch cyclization: a simple procedure to access polysubstituted 2-amino-1,3-thiazoles. **Tetrahedron**, v. 67, n. 26, p. 4897–4904, 2011.

CHAVES, O. A. et al. Synthesis, tyrosinase inhibition and transportation behavior of novel β -enamino thiosemicarbazide derivatives by human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 280–290, 2018.

CHEN, D. et al. Interaction and sonodynamic damage activity of acridine red (AD-R) to bovine serum albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 160, p. 245–253, 2015.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; LIU, C. Study on the interaction between a water-soluble dinuclear nickel complex and bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Biometals**, p. DOI 10.1007/s10534-013-9663-x, 2013.

CIVENNI, G. et al. EC-70124, a novel glycosylated indolocarbazole multi-kinase inhibitor, reverts tumorigenic and stem cell properties in prostate cancer by inhibiting STAT3 and NF- κ B. **Molecular Cancer Therapeutics**, p. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0791, 2016.

COHEN, G.; EISESBERG, H. Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes. **Biopolymers**, v. 8, p. 45–55, 1969.

DAHIYA, V.; PAL, S. The effect of paracetamol on 5 fluorouracil and bovine serum albumin interaction: a biophysical study. **AIP Conference Proceedings**, v. 1953, n. 1, p. 140012-1-140012-4, 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.

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

DIXIT, B. A review on the effects of CMPF binding with human serum albumin. **Bioinformatics Review**, v. 3, n. 9, p. 9–18, 2017.

DOMÍNGUEZ, M.; CORTÉS-FIGUEROA, J. E.; MELÉNDEZ, E. Biological Interaction of Molybdenocene Dichloride with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 1, p. 152–157, 2017.

DONDONI, A. Heterocycles in organic synthesis: thiazoles and triazoles as exemplar cases of synthetic auxiliaries. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, p. 3366–3385, 2010.

DRAVECZ, G. et al. Identification of the binding site between Bovine Serum Albumin and ultrasmall SiC fluorescent biomarkers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 13419–13429, 2018.

DUA, R. et al. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUAN, L.-M. et al. Design and discovery of 2-(4-(1 H-tetrazol-5-yl)-1 H-pyrazol-1-yl)-4-(4-phenyl) thiazole derivatives as cardioprotective agents via inhibition of PDE3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 18, p. 6111–6117, 2015.

DUTTA, D. et al. Cell penetrating thiazole peptides inhibit c-MYC expression via site-specific targeting of c-MYC G-quadruplex. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 11, p. 5355–5365, 2018.

EBRAHIMPOUR, S. Y. et al. Synthesis and structure elucidation of novel salophen-based dioxo-uranium(VI) complexes: In-vitro and in-silico studies of their DNA/BSA-binding properties and anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 172–186, 2017.

EL-NAKKADY, S. S. et al. Synthesis, molecular docking study and antitumor activity of novel 2-phenylindole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 387–398, 2012.

FARAHAT, A. A. et al. Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1590–1596, 2018.

FARES, S. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel benzofuran-N- heterocyclic hybrids as anticancer agents. **Journal of American Science**, v. 13, n. 11, p. 65–76, 2017.

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.

FRAGOSO, V. M. DA S. et al. Verifying the competition between haloperidol and Biperiden in serum albumin through a model based on spectrofluorimetry. **AIP Conference Proceedings**, v. 130003, p. 10–14, 2017.

FU, X. et al. Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, HSA interaction and cytotoxicity of a new copper (II) complex derived from 2- (2 -pyridyl) benzothiazole and glycyglycine. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, v. 276, p. 83–95, 2013.

GALI, R. et al. One-pot multicomponent synthesis of indole incorporated thiazolylcoumarins and their antibacterial, anticancer and DNA cleavage studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 106–112, 2014a.

GALI, R. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Indolylmethylene benzo [h] thiazolo [2,3- b] quinazolinones: Synthesis, characterization and evaluation of anticancer and antimicrobial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4239–4242, 2014b.

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

GANESHPIANDIAN, M. et al. Mixed ligand copper (II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 202–212, 2014.

GAO, C. et al. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 7507–7514, 2010.

GENG, S. et al. Spectroscopic and molecular modeling study on the interaction of ctDNA with 3'-deoxy-3'-azido doxorubicin. **Journal of Luminescence**, v. 141, p. 144–149, 2013.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22518–22538, 2014.

GOMTSYAN, A. Heterocycles in drugs and drugs discovery. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 48, n. 1, p. 12–15, 2012.

GOU, Y. et al. Developing anti-cancer copper (II) pro-drugs based on the nature of cancer cells and human serum albumin carrier IIA subdomain Developing anti-cancer copper (II) pro-drugs based on the nature of cancer cells and human serum albumin carrier IIA subdomain. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 3597–3609, 2015.

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

GROZAV, A. et al. Cytotoxicity and Antioxidant Potential of Novel 2-(2-((1 H -indol-5yl)methylene)-hydrazinyl)-thiazole Derivatives. **Molecules**, v. 22, p. 1–12, 2017.

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.

GUO, X. et al. One-pot solid phase pyrolysis synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots and the interaction with human serum albumin. **Journal of Luminescence**, v. 196, p. 100–110, 2017.

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

GUPTA, S. et al. Synthesis and bio-evaluation of indole-chalcone based benzopyrans as a promising antiligase and antiproliferative agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1981–1996, 2017.

HANYU, L. et al. Synthesis, characterization , fluorescence and DNA-binding studies of europium (III) pirates complexes with amide-based 2 ,3-dihydroxynaphthalene derivatives. **Journal of Rare Earths**, v. 30, n. 4, p. 297–303, 2012.

HAQUE, L. et al. Structural alteration of low pH, low temperature induced protonated form of DNA to the canonical form by the benzophenanthridine alkaloid nitidine: Spectroscopic exploration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1106–1112, 2018.

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

2017.

HASSAN, G. S. et al. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino) -4-phenyl-1,3-thiazole analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6318–6323, 2012.

HAZRA, M.; DEY, S. K.; ANIMESH, P. Synthesis, characterization and biological activity of copper (II) complex with nso-donor ligand. **International Journal of Current Research in Life Sciences**, v. 07, n. 02, p. 911–914, 2018.

HE, H. et al. Synthesis, antitumor activity and mechanism of action of novel 1,3-thiazole derivatives containing hydrazide-hydrazone and carboxamide moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 14, p. 3263–3270, 2016.

HE, J. et al. Prognostic Effect of Albumin-to-Globulin Ratio in Patients with solid tumors: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 19, p. 4002–4010, 2017.

HUANG, H. et al. Study on the Interaction of Retinoic Acids to Human Serum Albumin by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy. **Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2017.

HUSAIN, M. A. et al. Naproxen intercalates with DNA and causes photocleavage through ROS generation. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 6569–6580, 2013.

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

IKHLAS, S.; AHMAD, M. Binding studies of guggulsterone-E to calf thymus DNA by multi-spectroscopic, calorimetric and molecular docking studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 402–408, 2018.

INMAN, M.; MOODY, C. J. Indole synthesis – something old, something new. **Chemical Science**, v. 4, p. 29–41, 2013.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; PANAHI-AZAR, V.; SAJEDI, S. Interaction of glutathione with bovine serum albumin : Spectroscopy and molecular docking. **Food Chemistry**, v. 202, p. 426–431, 2016.

JANA, S. et al. Binding interaction between plasma protein bovine serum albumin and flexible charge transfer fluorophore: A spectroscopic study in combination with molecular docking and molecular dynamics simulation. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 19–27, 2012.

JANGIR, D. K. et al. FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 105, n. 2, p. 143–148, 2011.

JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry &**

Photobiology, B: Biology, v. 114, p. 38–43, 2012.

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

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

JAUMOT, J.; GARGALLO, R. Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. **Current Pharmaceutics Design**, v. 18, p. 1900–1916, 2012.

JUMBRI, K. et al. Binding energy and biophysical properties of ionic liquid-DNA complex : Understanding the role of hydrophobic interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 1197–1203, 2016.

KARAMI, K. et al. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro cytotoxicities of new organometallic palladium complexes with biologically active β -diketones; Biological evaluation probing of the interaction mechanism with DNA/Protein and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1154, p. 480–495, 2017.

KARIMABAD, M. N. et al. The novel Indole-3-formaldehyde (2-AITFEI-3-F) is involved in processes of apoptosis induction? **Life Sciences**, v. 181, p. 31–44, 2017.

KARTHIKEYAN, S.; BHARANIDHARAN, G.; KESHERWANI, M. Insights into the Binding of thiosemicarbazone derivatives with Human Serum Albumin: Spectroscopy and Molecular Modelling studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 34, n. 6, p. 1264–1281, 2015.

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

KAUR, H.; GOYAL, A. A Review On Thiazole As Anticancer Agents. **International Journal of Pharmaceutics & Drug Analysis**, v. 6, n. 5, p. 509–522, 2018.

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

KELLY, P. M. et al. Synthesis, antiproliferative and pro-apoptotic activity of 2-Phenylindoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4075–4099, 2016.

KHATIK, G. L. et al. A Retrospect Study on Thiazole Derivatives as the Potential Anti-diabetic Agents in Drug Discovery & Developments. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 14, p. 1–15, 2017.

KOVVURI, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new β -carboline-bisindole compounds as DNA binding, photocleavage agents and topoisomerase I inhibitors. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, v. 143, p. 1563–1577, 2017.

KRISHNA, P. M. et al. Synthesis, structural studies, molecular docking and DNA binding studies of 4N- substituted hydrazinecarbothioamides. **Journal of Molecular Structure**, v. 1175, p. 97–104, 2018.

KUBBA, A. A. R. M.; RAHIM, N. A. H. Synthesis and antimicrobial evaluation of new-[2-amino-4-(4-chloro-/4-bromophenyl)-1,3-thiazole derivatives. **Journal of Pharmacy Research**, v. 12, n. 1, p. 145–150, 2018.

KUMAR, Subodh. Spectroscopy of Organic Compounds. **Organic Chemistry**, p. 1-36.

KUMARAVEL, G. et al. Exploring the DNA interactions, FGF growth receptor interaction and biological screening of metal (II) complexes of NNN donor ligand derived from 2 (aminomethyl) benzimidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.116, 2018.

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

LACZKOWSKI, K. Z. et al. Synthesis, molecular docking, ctDNA interaction, DFT calculation and evaluation of antiproliferative and anti- *Toxoplasma gondii* activities of 2, 4-diaminotriazine-thiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 4, p. 1131–1148, 2018.

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

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

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

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

LEONI, A. et al. Bioenergetics : Open Access Imidazo [2 , 1-b] Thiazole : Introduction , Current and Perspective. **Bioenergetics**, v. 6, n. 1, p. 59–61, 2017.

LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 87–106, 1967.

LI, D. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Effect of pH on the interaction of vitamin B12 with bovine serum albumin by spectroscopic approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 83, n. 1, p. 598–608, 2011.

LI, H. et al. Interaction study of ciprofloxacin with human telomeric DNA by spectroscopy and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 107, p. 227–234, 2013.

LI, X. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Novel DNA intercalators without basic side chains as efficient antitumor agents : Design , synthesis and evaluation of benzo- [c , d] -indol-malononitrile derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 3279–3284, 2010.

LI, X.; WANG, S. Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. **New Journal of Chemistry**, v. 39, p. 386–395, 2014.

LIANG, G.-W. et al. Interaction between Saikosaponin D, Paeoniflorin, and Human Serum Albumin. **Molecules**, v. 23, p. 1–18, 2018.

LIU, B. et al. In vitro study on the interaction of 4 , 4-dimethylcurcumin with calf thymus DNA. **Journal of Luminescence**, v. 166, p. 48–53, 2015a.

LIU, J. et al. Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin : a spectroscopic study in combination with molecular docking technology. **RSC Advances**, v. 8, p. 7280–7286, 2018.

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

LOU, Y. et al. Characterizing the binding interaction of fungicide boscalid with bovine serum albumin (BSA): A spectroscopic study in combination with molecular docking approach. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 173, p. 589–597, 2017.

LU, X. et al. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 164–171, 2012.

LUO, Y. et al. Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of some thiazolylbenzimidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 417–422, 2011.

LYU, L. et al. One-pot, two-step synthesis and photophysical properties of 2-(5-phenylindol-3-yl)benzimidazole derivatives. **RSC Advances**, v. 7, p. 49374–49385, 2017.

MABKHOT, Y. N. et al. Stereoselective synthesis , X - ray analysis, computational studies and biological evaluation of new thiazole derivatives as potential anticancer agents. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 56, p. 1–9, 2018.

MAKARSKA-BIALOKOZ, M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 23–32, 2018.

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

MARCO-CONTELLES, J.; SORIANO, E. "The Medicinal Chemistry of Hybrid-Based Drugs Targeting Multiple Sites of Action". **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 2714–2715, 2011.

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

MARTÍNEZ, V. R. et al. Azilsartan and its Zn (II) complex. Synthesis, anticancer mechanisms of action and binding to bovine serum albumin. **Toxicology in Vitro**, v. 48, p. 205–220, 2018.

MARTINS, P. et al. Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. **Molecules**, v. 20, p. 16852–16891, 2015.

MATOS, M. J. Learning from nature: the role of albumin in drug delivery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 6–9, 2018.

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

MELEDDU, R. et al. Isatin thiazoline hybrids as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 130–136, 2016.

METI, M. D. et al. Multi-spectral characterization & effect of metal ions on the binding of bovine serum albumin upon interaction with a lincosamide antibiotic drug , clindamycin phosphate. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 324–330, 2014.

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

MOHAMADI, M. et al. A mononuclear diketone-based oxido-vanadium(IV) complex: structure, DNA and BSA binding, molecular docking and anticancer activities against MCF - 7, HPG-2, and HT- 29 cell lines. **RSC Advances**, v. 5, n. 122, p. 101063–101075, 2015.

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. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 85–95, 2017.

MOHAMMAD, H. et al. Synthesis and antibacterial evaluation of a novel series of synthetic phenylthiazole compounds against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).

European Journal of Medicinal Chemistry, v. 94, p. 306–316, 2015.

MOHAMMED, Y. H. E. et al. The Novel 4-Phenyl-2-Phenoxyacetamide Thiazoles modulates the tumor hypoxia leading to the crackdown of neoangiogenesis and evoking the cell death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1826–1839, 2017.

MOHAREB, R. M.; ABDALLAH, A. E. M.; AHMED, E. A. Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiazole derivatives obtained from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile. **Acta Pharmaceutica**, v. 67, p. 495–510, 2017.

MORAES, A. D. T. O. et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 5388–5396, 2018.

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

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOR, S. T. Pharmacokinetic Study on the Mechanism of Interaction of Sulfacetamide Sodium with Bovine Serum Albumin: A Spectroscopic Method. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 31, p. 120–128, 2010.

NAM, M. et al. Indole-Substituted Benzothiazoles and Benzoxazoles as Selective and Reversible MAO - B Inhibitors for Treatment of Parkinson 's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 1519–1529, 2017.

NARSIMHA, S. et al. Indole-2-carboxylic acid derived mono and bis 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles: Synthesis, characterization and evaluation of anticancer, antibacterial, and DNA-cleavage activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 6, p. 1639–1644, 2016.

NASKAR, A. et al. Effect of bovine serum albumin immobilized Au–ZnO–graphene nanocomposite on human ovarian cancer cell Atanu. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 734, p. 66–74, 2017.

NASTASA, C. et al. Synthesis of New N -Substituted 5-Arylidene-2 , 4- thiazolidinediones as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. **Arch Pharm Chemistry in Life Sciences**, v. 00, p. 1–10, 2013.

NEPALI, K. et al. Rational approaches , design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 422–487, 2014.

NI, Y.; WEI, M.; KOKOT, S. Electrochemical and spectroscopic study on the interaction between isoprenaline and DNA using multivariate curve resolution-alternating least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 622–628, 2011.

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

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

OLIVEIRA, J. F. DE et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148–156, 2015.

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

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

Organização Mundial da Saúde, **Cancer**. Disponível em <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em 07 de Janeiro de 2019.

OUF, S. A. et al. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity Evaluation of Some Novel Arylazothiazoles. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 00, n. 00, p. 4–10, 2017.

OZEN, C. et al. Thiazolidinedione or Rhodanine: A Study on Synthesis and Anticancer Activity Comparison of Novel Thiazole Derivatives. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 415–427, 2017.

PAREKH, N. M. et al. Investigation of anticancer potencies of newly generated Schiff base imidazolylphenylheterocyclic-2-ylmethylenethiazole-2-amines. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 3, p. 602–606, 2017.

PARK, J. et al. New imidazo [2,1-b] thiazole derivatives: Synthesis, in vitro anticancer evaluation, and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5769–5777, 2011.

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

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

PAUL, A.; BHATTACHARYA, S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. **Chemistry and Biology**, v. 102, n. 2, p. 212–231, 2012.

PAUL, S. et al. Interaction of Serum Albumins with Fluorescent Ligand 4-Azido Coumarin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking Studies. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 15392–15404, 2017.

PAWAR, C. D. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel ethyl 2-(2-(4-substituted) acet- amido)-4-substituted-thiazole-5-carboxylate derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 15, p. 3525–3528, 2016.

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

PEARCE, B. S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design. **Therapeutics**, p. 66–70, 2017.

PEI, X.; ZHANG, J. U. N.; LIU, J. I. E. Clinical applications of nucleic acid aptamers in cancer (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, n. 9, p. 341–348, 2014.

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

PRECUPAS, A. et al. Interaction of Caffeic Acid with Bovine Serum Albumin is Complex: Calorimetric, Spectroscopic and Molecular Docking Evidence. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 15003–15015, 2017.

PUBCHEM. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 22 de novembro de 2018.

QAIS, F. A.; AHMAD, I. In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 193–205, 2017.

QIN, M.; YIN, T.; SHEN, W. The Interaction Between Crystal Violet and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 1623–1629, 2015.

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

RAJALAKSHMI, S. et al. Anomalous behavior of pentacoordinate copper complexes of dimethylphenanthroline and derivatives of terpyridine ligands: Studies on DNA binding, cleavage and apoptotic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 608–617, 2011.

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

RATHER, M. A. et al. Design and synthesis of indolopyridone hybrids as new antituberculosis agents. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 330–334, 2017.

REDDY, M. V. B. et al. Synthesis and antioxidant activity of new thiazole analogues possessing urea , thiourea, and selenourea functionality. **Synthetic Communications**, v. 45,

n. 22, p. 2592–2600, 2015.

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

RESCIFINA, A. et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 95–115, 2014.

ROY, A. et al. Underlying molecular interaction of bovine serum albumin and linezolid: A biophysical outlook. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 2, p. 387–397, 2017.

ROY, S. et al. Binding interaction of phosphorus heterocycles with bovine serum albumin: A biochemical study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 1, p. 19–26, 2016.

RUDRA, S. et al. Binding affinities of Schiff base Fe(II) complex with BSA and calf-thymus DNA: Spectroscopic investigations and molecular docking analysis Suparna. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 166, p. 84–94, 2016.

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

SAID, M.; ELSHIHAWY, H. Synthesis , anticancer activity and structure-activity relationship of some anticancer agents based on Cyclopenta (b) thiophene scaffold. **Parkistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 885–892, 2014.

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

SALAT, K.; MONICZEWSKI, A.; LIBROWSKI, T. Nitrogen, oxigen or sulfur containing heterocyclic compounds as analgesic drugs used as modulators of the nitroxidative stress. **Mini-Reviews in Medicine Chemistry**, v. 13, p. 335–352, 2013.

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

SAMA, F. et al. Synthesis, structure and DNA binding properties of a homodinuclear Cu(II) complex: An experimental and theoretical approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1176, p. 283–289, 2018.

SAMARI, F. et al. Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt (II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins : A Spectroscopic Approach. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 3454–3464, 2012.

SANI, F. D. et al. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations. **Journal of**

Luminescence, v. 203, p. 599–608, 2018.

SANKARGANESH, M. et al. New bio-sensitive and biologically active single crystal of pyrimidine scaffold ligand and its gold and platinum complexes: DFT, antimicrobial, antioxidant, DNA interaction, molecular docking with DNA / BSA and anticancer studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 144–156, 2018.

SANTANA, T. I. DE S. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2017.

SANTOS, T. A. R. DOS et al. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555–560, 2016.

SARANGI, P. K. N. et al. Cytotoxic investigation of some newly synthesized quinoline-thiazole based azo compounds. **Indian Journal of Chemistry**, v. 56, p. 1256–1264, 2017.

SARKAR, S.; BHATTACHARJEE, P.; BHADRA, K. DNA binding and apoptotic induction ability of harmalol in HepG 2: Biophysical and biochemical approaches. **Chemico-Biological Interactions**, v. 258, p. 142–152, 2016.

SARWAR, T. et al. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, v. 11, p. 522–531, 2015.

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

SASMAL, M. et al. Domain-Specific Association of a Phenanthrene–Pyrene–Based Synthetic Fluorescent Probe with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Analysis. **ACS Omega**, v. 3, p. 6293–6304, 2018.

SAUNDANE, A. R.; VIJAYKUMAR, K.; VAJJINATH, A. V. Synthesis of novel 2-amino-4-(5'-substituted 2'-phenyl-1H-indol-3'-yl)-6-aryl-4H-pyran-3-carbonitrile derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 1978–1984, 2013.

SAYED, M. T. EL et al. Indoles as anti-cancer agents. **Advances in Modern Oncology Research**, p. 20–35, 2015.

SERAFIM, V. D. L. et al. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 6, p. 1141–1155, 2018.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 406–410, 2012.

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of antihypertensive drug; methyldopa with calf thymus DNA. **Molecular**

BioSystems, n. 10, p. 338–347, 2014.

SHAHRAKI, S.; SHIRI, F.; MANSOURI-TORSHIZI, H. Biophysical and Molecular Docking Studies of Human Serum Albumin Interactions with a Potential Anticancer Pt (II) Complex. **Biomacromolecular Journal**, v. 2, n. 1, p. 65–77, 2016.

SHAHRI, P. A. et al. Human serum albumin–amlodipine binding studied by multi-spectroscopic, zeta-potential, and molecular modeling techniques. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, n. 1, p. 223–243, 2017.

SHAIKH, I. et al. Study of Antimicrobial and Antifungal Activity of the Bis- Indole Derivatives of 2-Phenyl-1-H-Indole. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 3, p. 34–37, 2018.

SHERER, C.; SNAPE, T. J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 552–560, 2015.

SHI, J. et al. Characterization of interaction of calf thymus DNA with gefitinib: Spectroscopic methods and molecular docking. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B : Biology**, v. 147, p. 47–55, 2015.

SHI, J. et al. Binding interaction of ramipril with bovine serum albumin (BSA): Insights from multi-spectroscopy and molecular docking methods. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B : Biology**, v. 164, p. 103–111, 2016a.

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

SHI, J. et al. Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir , a HIV protease inhibitor. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 362–371, 2018.

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

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

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

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

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J. S. Tandem mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 32, p. 247–266, 2013.

SINGH, H. et al. Ultrasound promoted one pot synthesis of novel fluorescent triazolyl spirocyclic oxindoles using DBU based task specific ionic liquids and their antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 145–154, 2014.

SINGH, I. R.; MITRA, S. Interaction of chlorpropamide with serum albumin: Effect on advanced glycated end (AGE) product fluorescence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 569–577, 2018.

SINGH, P. Structural optimization of indole based compounds for highly promising anti-cancer activities : Structure activity relationship studies and identification of lead molecules. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 440–450, 2014.

SINGLA, R. et al. Synthesis and biological evaluation of novel indole- xanthendione hybrids as selective estrogen receptor modulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 266–277, 2017.

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

SOLOMON, V. R.; HU, C.; LEE, H. Hybrid pharmacophore design and synthesis of isatin – benzothiazole analogs for their anti-breast cancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 21, p. 7585–7592, 2009.

SONG, J. U. et al. Structure-based design and biological evaluation of novel 2- (indol-2- yl) thiazole derivatives as xanthine oxidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 950–954, 2016.

SRIVASTANA, A. K. et al. DNA cleavage activity and cytotoxicity of mononuclear and trinuclear Cu (II) complexes containing 1H-pyrazole-3, 5-dicarboxylic acid as ligand. **Indian Journal of Chemistry**, v. 52, p. 835–844, 2013.

STANICOVÁ, J.; VEREBOVÁ, V.; BENES, J. Interaction of a potential anticancer agent hypericin and its model compound emodin with DNA and bovine serum albumin. **in vivo**, v. 32, p. 1063–1070, 2018.

SURESH, N. et al. Anti-proliferative activity , molecular modeling studies and interaction with calf thymus DNA of novel ciprofloxacin analogues. **Journal of Chemical Sciences**, v. 130, n. 121, p. 1–11, 2018.

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

TADESSE, S. et al. A novel series of N-(pyridin-2-yl)-4-(thiazol- 5-yl)pyrimidin-2-amines as highly potent CDK4/6 inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 14, p. 1–12, 2017.

TEKALE, A. S. et al. Synthesis and Evaluation of 2-Aminothiazole Derivative. **International Journal of Universal Science and Technology**, v. 03, n. 01, p. 12–17, 2018.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

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

THIRUSANGU, P. et al. BP-1T, an antiangiogenic benzophenone-thiazole pharmacophore, counteracts HIF-1 signalling through p53/MDM2-mediated HIF-1 a proteasomal degradation. **Angiogenesis**, v. 20, n. 1, p. 55–71, 2016.

THOMAS, R. K.; SUKUMARAN, S.; SUDARSANAKUMAR, C. Photobehaviour and in vitro binding strategy of natural drug, chlorogenic acid with DNA: A case of groove binding. **Journal of Molecular Structure**, v. 1178, p. 62–72, 2018.

THORE, S. N.; GUPTA, S. V; BAHETI, K. G. Synthesis and pharmacological evaluation of 5-methyl-2-phenylthiazole-4-substituted heteroazoles as a potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, p. S46–S52, 2012.

THOTA, S. et al. Synthesis , characterization , DNA binding , DNA cleavage , protein binding and cytotoxic activities of Ru (II) complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 663–670, 2016.

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

TOCHE, R. B.; DESHMUKH, S. U. A Review on some Thiazole Containing Heterocyclic Compounds and their Biological Activity. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, v. 3, n. 10, p. 20–25, 2017.

TOKALA, R. et al. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of β -carboline-linked 2,4-thiazolidinedione hybrids: Potential DNA intercalation and apoptosis inducing studies. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 19, p. 16226–16236, 2018.

TRIPATHI, A. C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue... **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52–77, 2014.

VASU, K. K. et al. Imidazo[1,2-a]pyridines linked with thiazoles/thiophene motif through keto spacer as potential cytotoxic agents and NF- κ B inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 24, p. 5463–5466, 2017.

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, p. 10257–10274, 2014.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–

1558, 2013.

WANG, G. et al. Exploring the binding mechanism of phosphoramidate derivative with DNA : Spectroscopy , calorimetry and modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 492–496, 2013.

WANG, H. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Thiazole-2-Carboxamide Derivatives as Antitumor Agents. **Letters in Drug & Discovery**, v. 15, p. 388–397, 2018.

WANG, Q. et al. Binding and photocleavage of a neutral nickel (II) bis (hydrogen pyridine-2 , 6-dicarboxylato) complex to DNA. **Journal of Molecular Structure**, v. 985, p. 129–133, 2011.

WELSH, S. J.; CORRIE, P. G. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 122–136, 2015.

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

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

XIE, L. et al. Quantitative investigation of the dynamic interaction of human serum albumin with procaine using a multi-way calibration method coupled with three-dimensional fluorescence spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 7, n. 16, p. 6552–6560, 2015a.

XIE, X. et al. Synthesis and anticancer effects evaluation of 1-alkyl-3-(6-(2-methoxy-3-sulfonylamino-pyridin-5-yl)benzo[d] thiazol-2-yl)urea as anticancer agents with low toxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 6477–6485, 2015b.

XU, H. et al. Characterization of the Interaction between Eupatorin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 14185–14203, 2013.

XU, Y. et al. A fluorescence probe acted on Site I binding for human serum albumin. **Talanta**, v. 185, p. 568–572, 2018.

YADLAPALLI, R. K. et al. Design, synthesis and in vitro antimicrobial activity of novel phenylbenzamido-aminothiazole-based azasterol mimics. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 2975–2983, 2013.

YASEEN, Z. et al. Determination of the cationic amphiphilic drug – DNA binding mode and DNA-assisted fluorescence resonance energy transfer amplification. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 553–564, 2014.

YU, H. et al. Ni(II) Complexes with Schiff Base Ligands: Preparation, Characterization,

DNA/Protein Interaction and Cytotoxicity Studies. **Molecules**, v. 22, 2017.

YURTTAS, L. et al. Synthesis of Some New Thiazole Derivatives and Their Biological Activity Evaluation. **Journal of Chemistry**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

YURTTAS, L. et al. Synthesis and Antimycobacterial Activity Evaluation of Isatin-derived 3-[(4- aryl - 2- thiazolyl)]hydrazone]-1H- indol- 2, 3- diones. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 55, n. 1, p. 51–58, 2017.

ZHANG, A. J. et al. Synthesis and biological evaluation of indole-2-carbohydrazide derivatives as anti-cancer agents with anti-angiogenic and antiproliferative activities. **CHEMMEDCHEM**, doi. 10.1002/cmdc.201800033, 2018.

ZHANG, C.; QU, Y.; NIU, B. Design , synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 22, p. 5781–5786, 2016.

ZHAO, L. et al. Cytotoxicity and DNA binding property of triphenylethylene – coumarin hybrids with two amino side chains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 3, p. 900–904, 2014.

ZHOU, Y. et al. Synthesis and characterization of planar chiral cyclopalladated ferrocenylimines: DNA/HSA interactions and in vitro cytotoxic activity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 871, p. 1–9, 2018.

ZHU, J. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, p. 78–83, 2014.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS COM O CTDNA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ABSORÇÃO UV-VIS, FLUORESCÊNCIA E DC

Figura A1. Espectros de absorção do LQIT/JF-249, LQIT/JF-250, LQIT/JF-253 e LQIT/JF-254 na presença de quantidades crescentes do ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM . As setas (\uparrow), (\downarrow), (\rightarrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperocrômico, hipocrômico, batocrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{DNA}]/(\text{Ea} - \text{Ef})$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

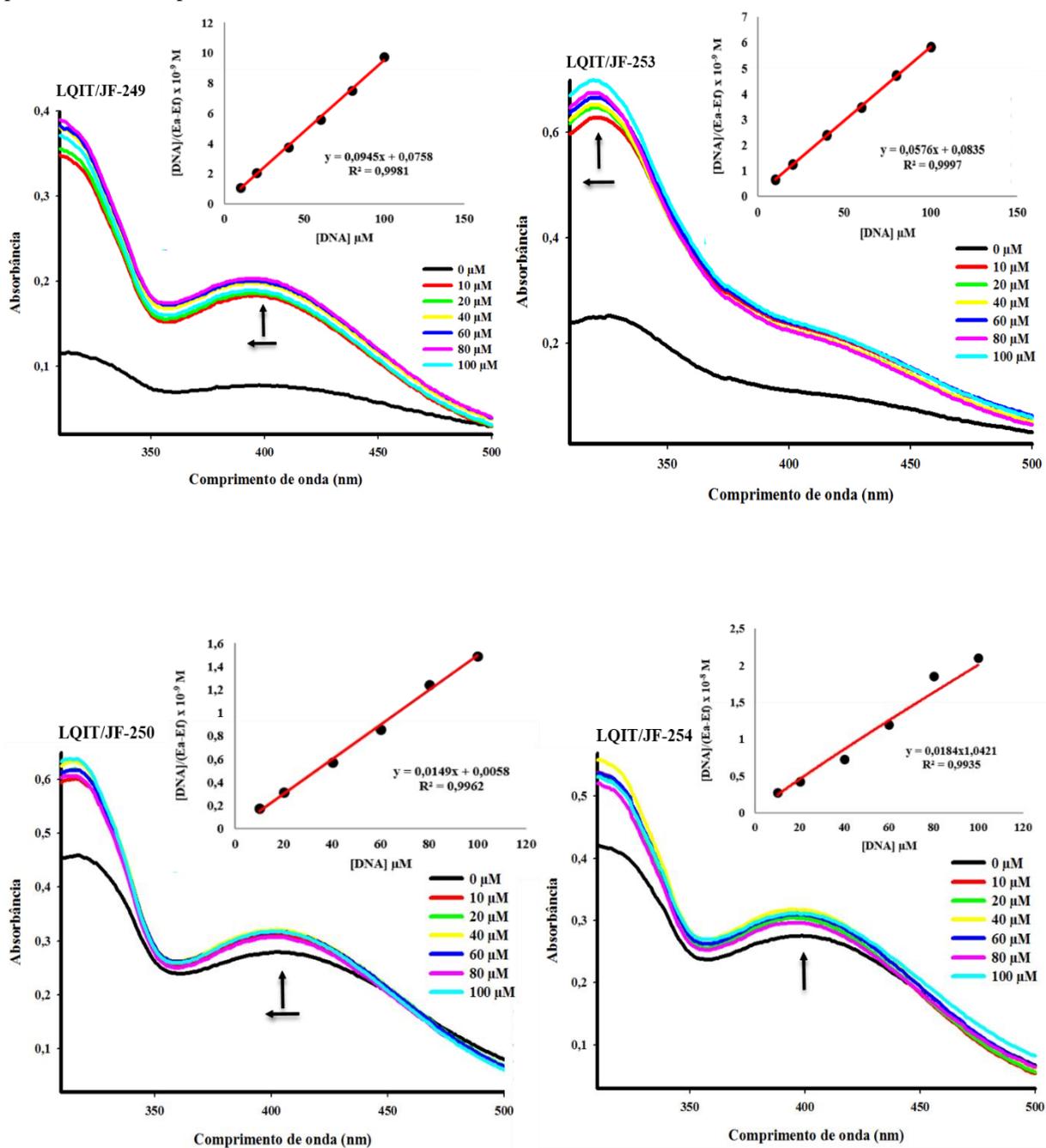


Figura A2. Espectros de absorção dos LQIT/JF's 251, 255, 257 e 258 na presença de quantidades crescentes do ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM . As setas (\uparrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{DNA}]/(E_a - E_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

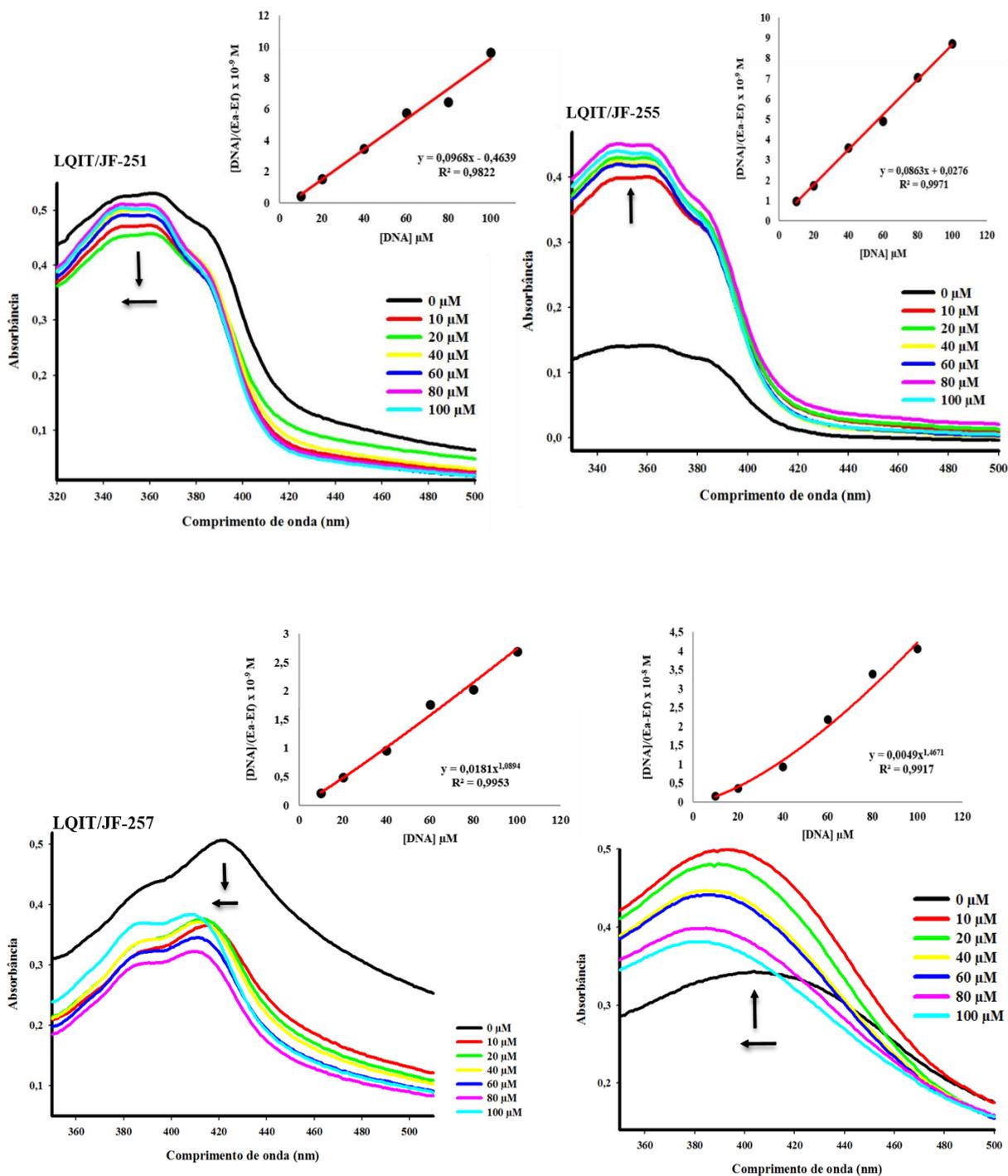


Figura A3. Espectros de absorção do LQIT/JF-252 na presença de quantidades crescentes do ctDNA. [DNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM . As setas (\uparrow) e (\leftarrow) são referentes aos efeitos hiperacrômico e hipsocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{DNA}]/(E_a - E_f)$ em função da concentração de DNA, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

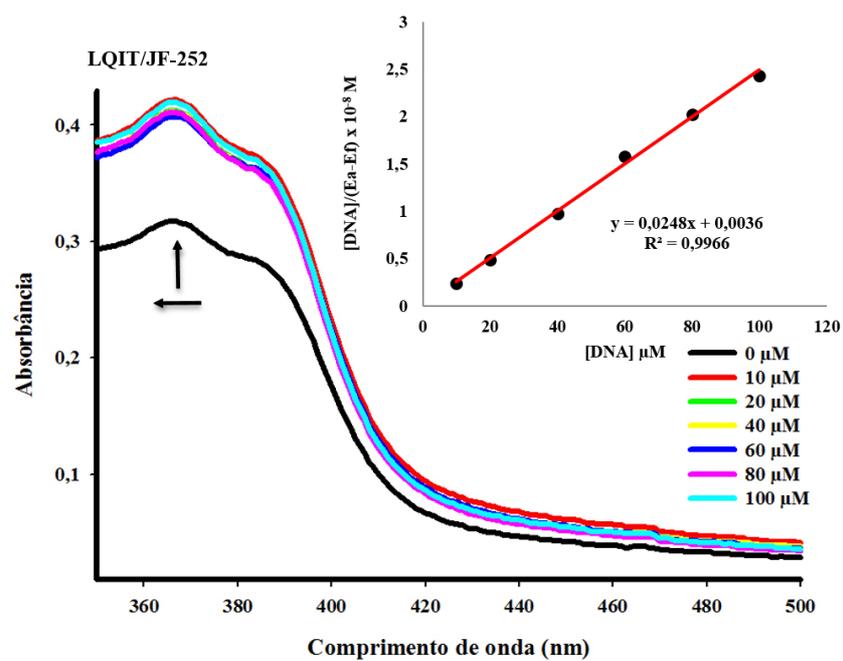


Figura A4. Espectros de emissão do BE (20 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (100 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254 (—). A seta (\downarrow) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM) à temperatura ambiente. Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

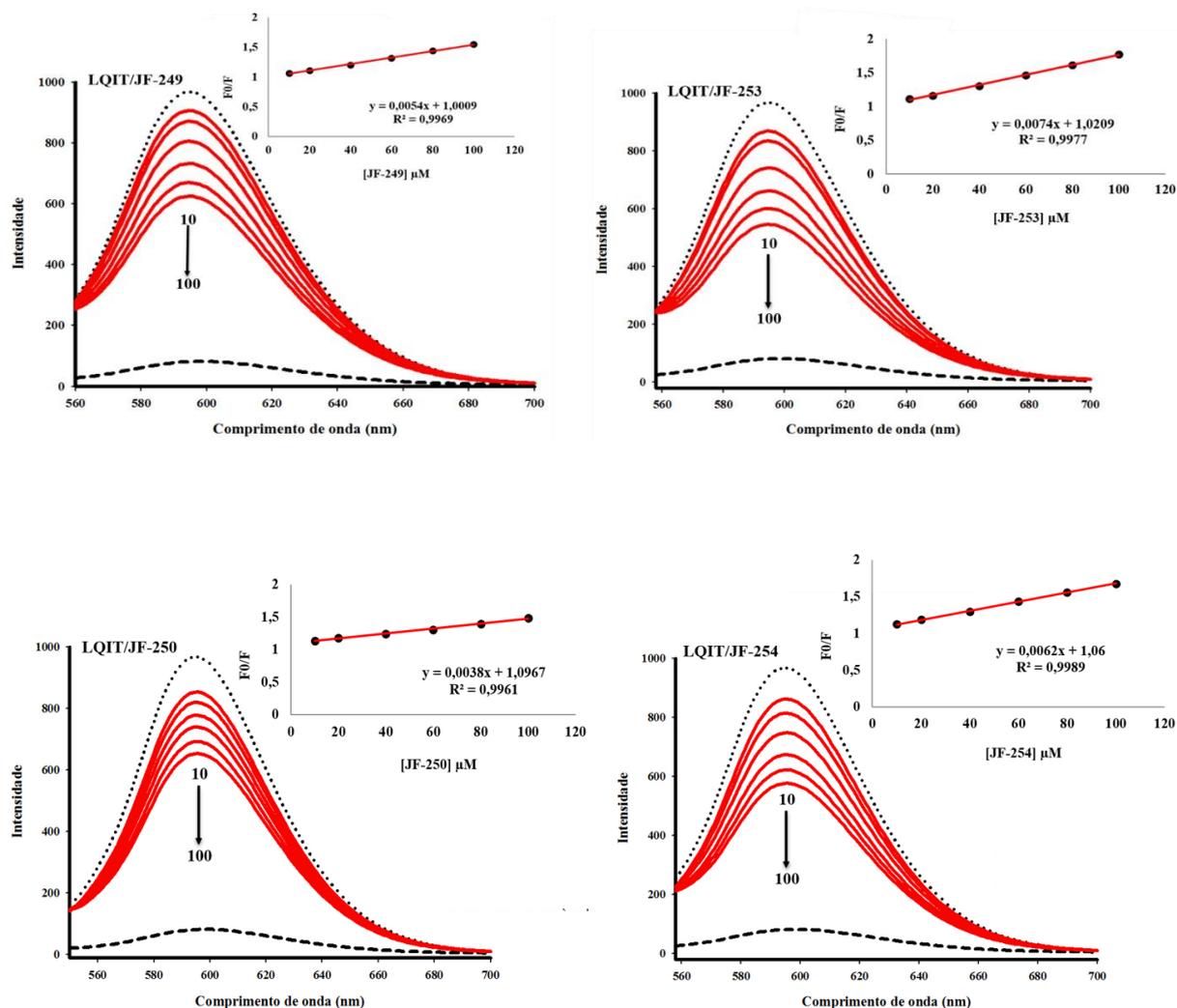


Figura A5. Espectros de emissão do BE (20 μM) livre (----) e ligado ao ctDNA (100 μM) na ausência (.....) e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 255, 257 e 258 (—). A seta (\downarrow) mostra a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM) à temperatura ambiente. Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

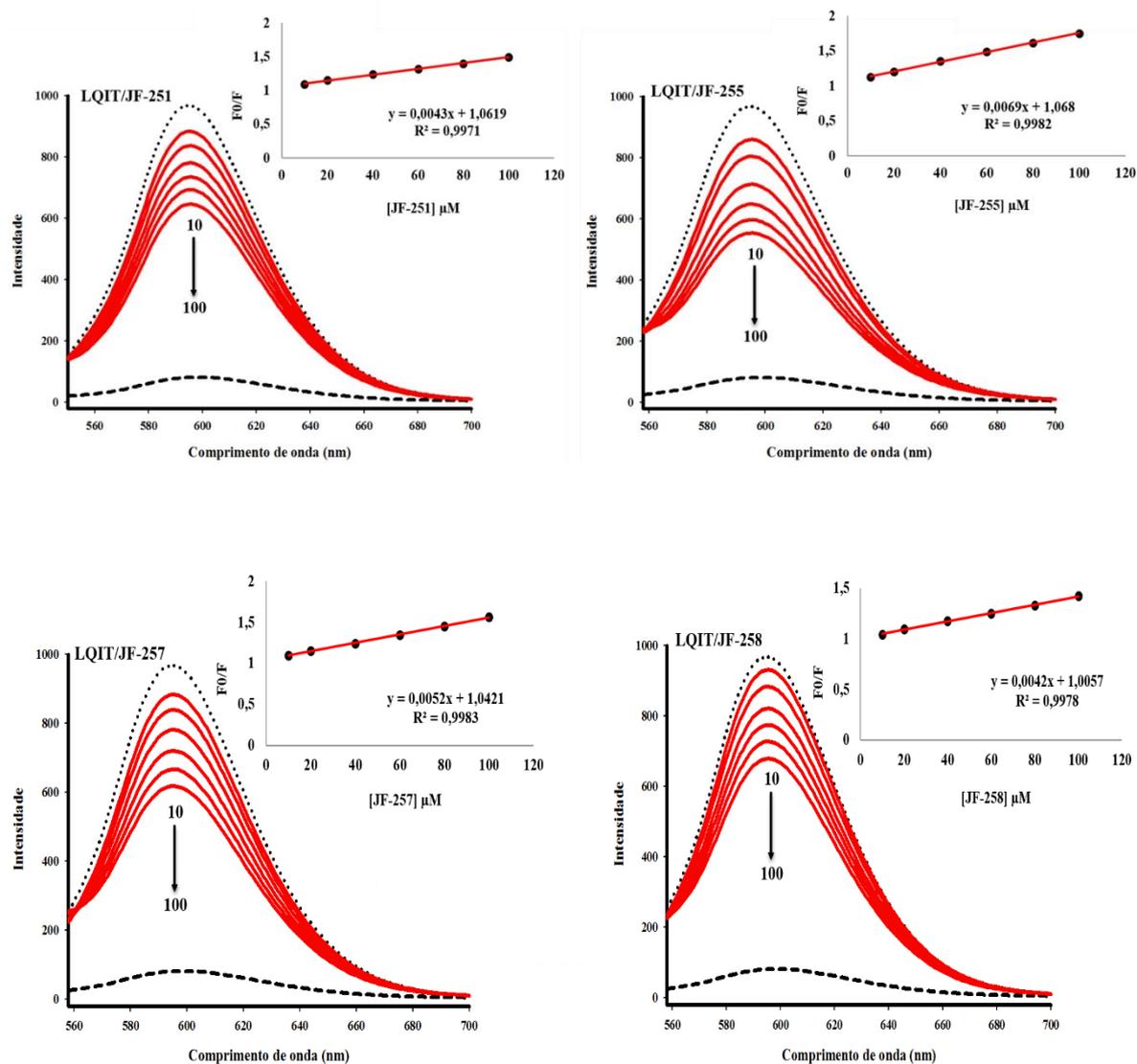


Figura A6. Espectros de DC do ctDNA (100 μ M) na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254. As setas (\downarrow), (\uparrow), (\leftarrow), (\rightarrow) são referentes à ocorrência dos efeitos hipocrômico, hiperocrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente, resultantes da interação dos derivados com o ctDNA, à temperatura ambiente.

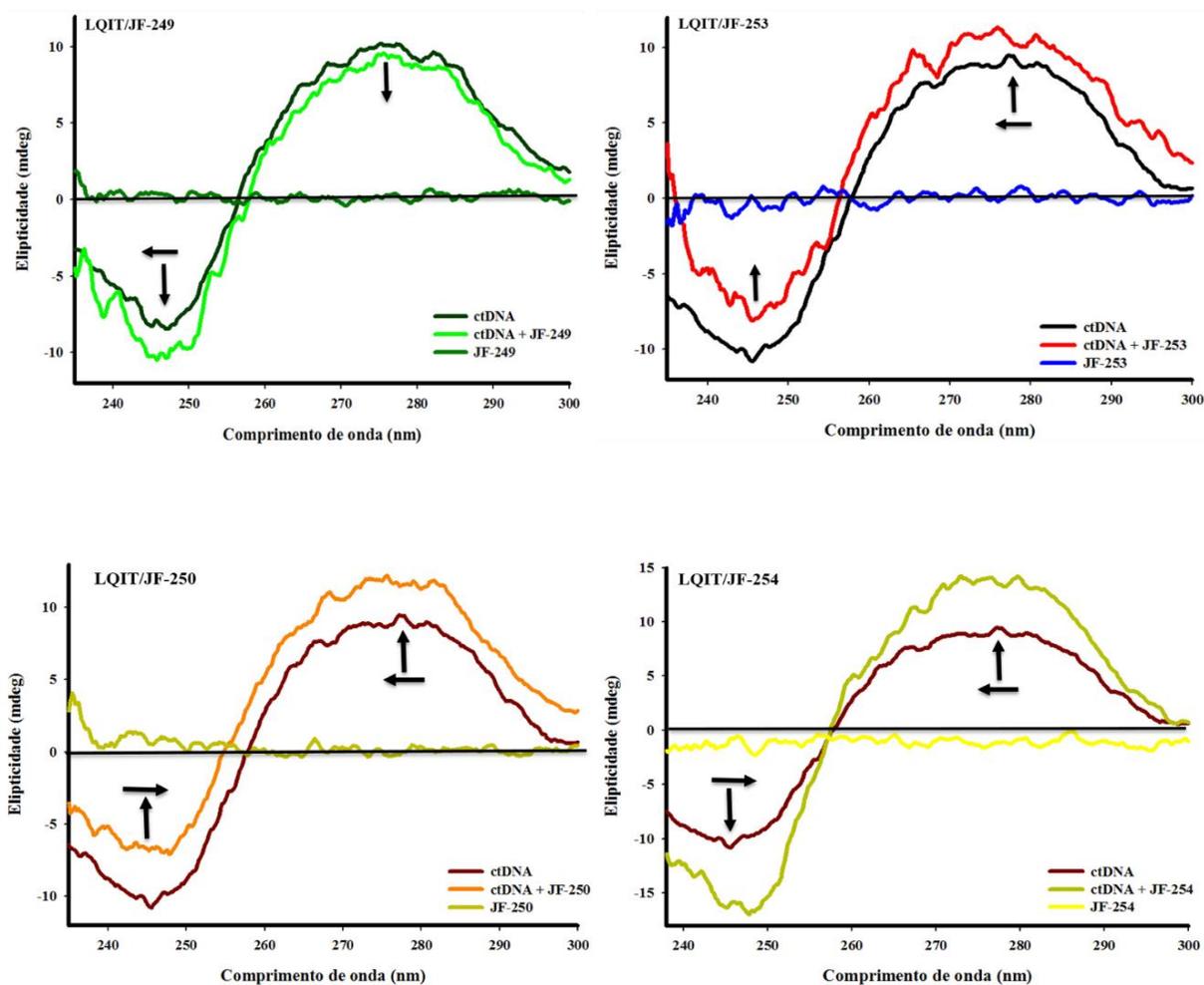
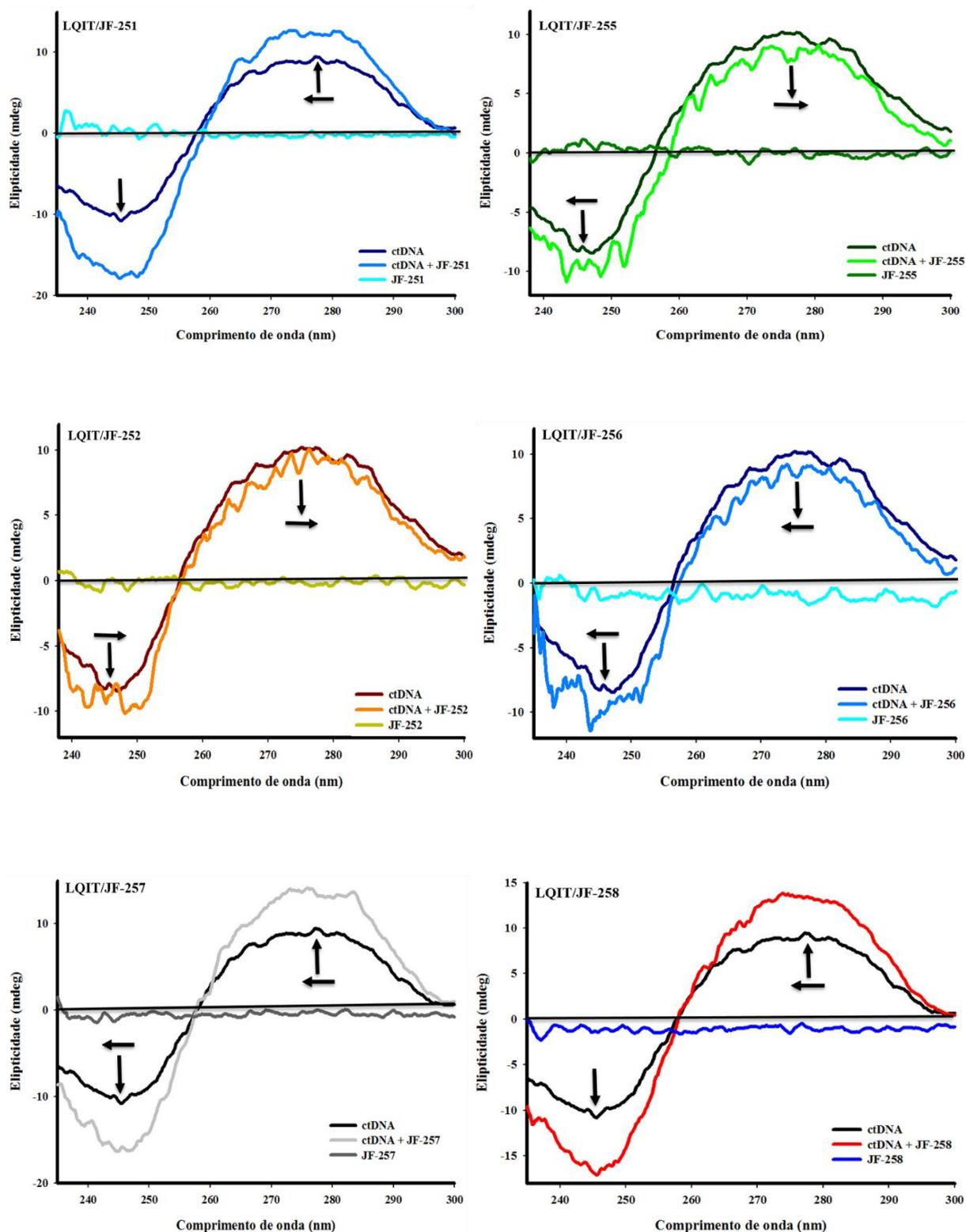


Figura A7. Espectros de DC do ctDNA (100 μ M) na ausência e na presença dos derivados LQIT/JF's 251, 252, 255, 256, 257 e 258. As setas (\downarrow), (\uparrow), (\leftarrow), (\rightarrow) são referentes à ocorrência dos efeitos hipocrômico, hipercrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente, resultantes da interação dos derivados com o ctDNA, à temperatura ambiente.



APÊNDICE B – ESPECTROS DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS INDOL-TIAZÓLICOS COM A BSA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA

Figura B1. Espectros de absorção da BSA (20 μM) na presença de quantidades crescentes dos LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254 (0-40 μM). As setas (\uparrow) e (\rightarrow) são referentes aos efeitos hipercrômico e batocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{LQIT/JF's}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

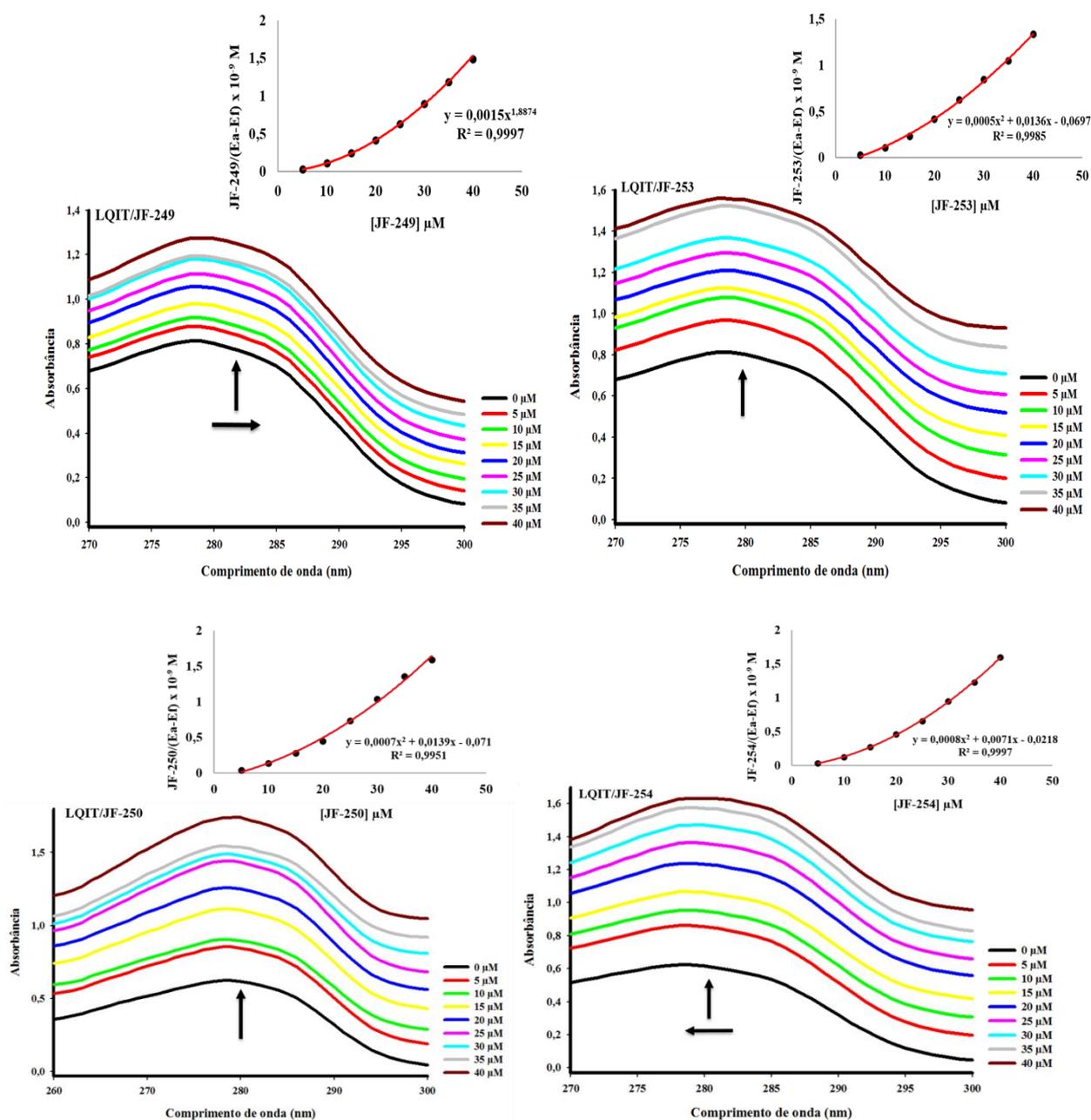


Figura B2. Espectros de absorção da BSA (20 μM) na presença de quantidades crescentes dos LQIT/JF's 251, 252, 255 e 256 (0-40 μM). As setas (\uparrow), (\leftarrow) e (\rightarrow) são referentes aos efeitos hipercrômico, hipsocrômico e batocrômico, respectivamente. Inserção: correspondente ao gráfico de $[\text{LQIT/JF}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$ em função da concentração do derivado, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

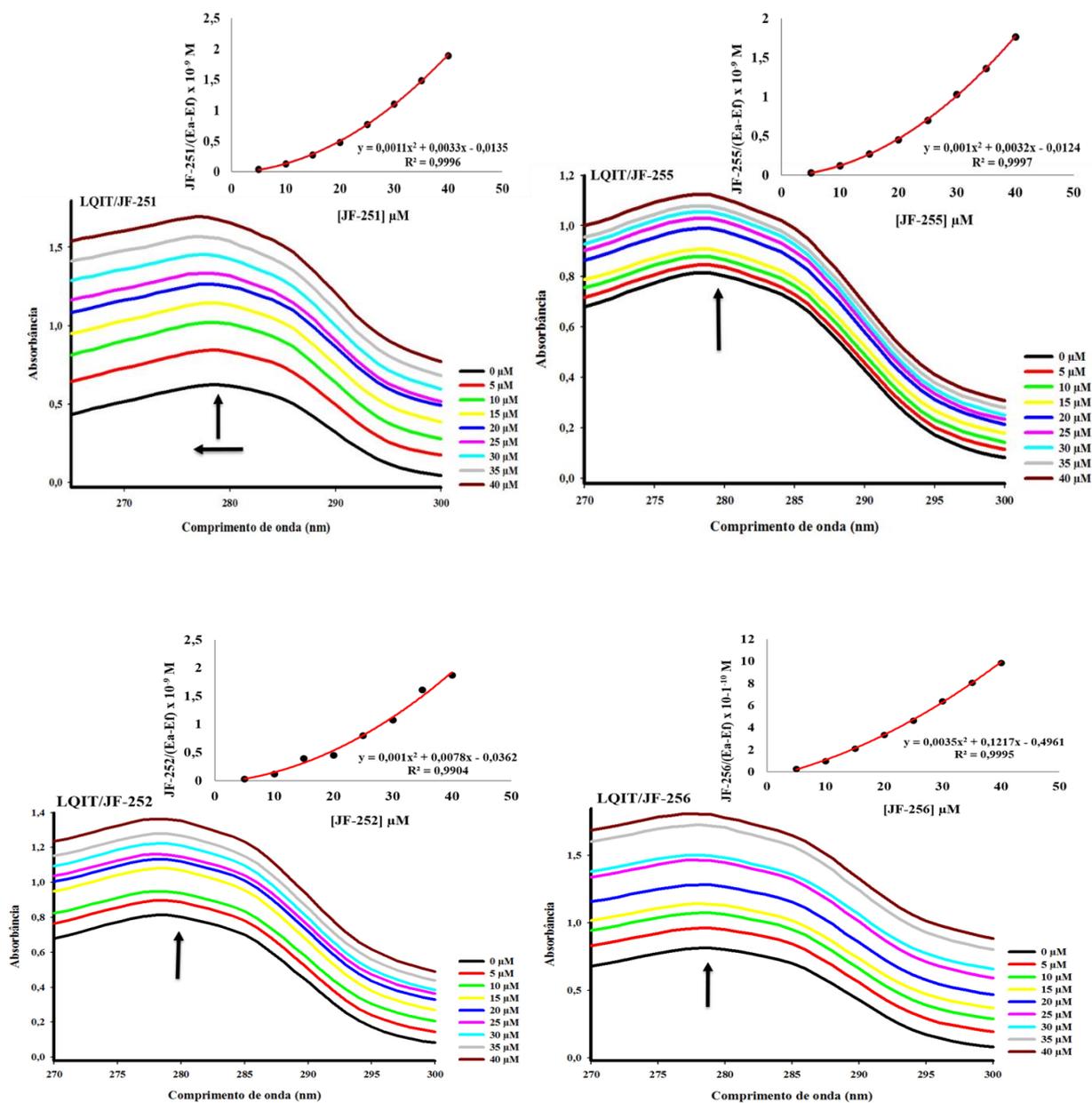


Figura B3. Espectros de supressão fluorescente da BSA (20 μM) na ausência (.....) e na presença e na presença dos derivados LQIT/JF's 249, 250, 253 e 254 (—). A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (----). As setas (\downarrow) e (\rightarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), à temperatura ambiente, e o efeito batocrômico, respectivamente. Inseto: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.

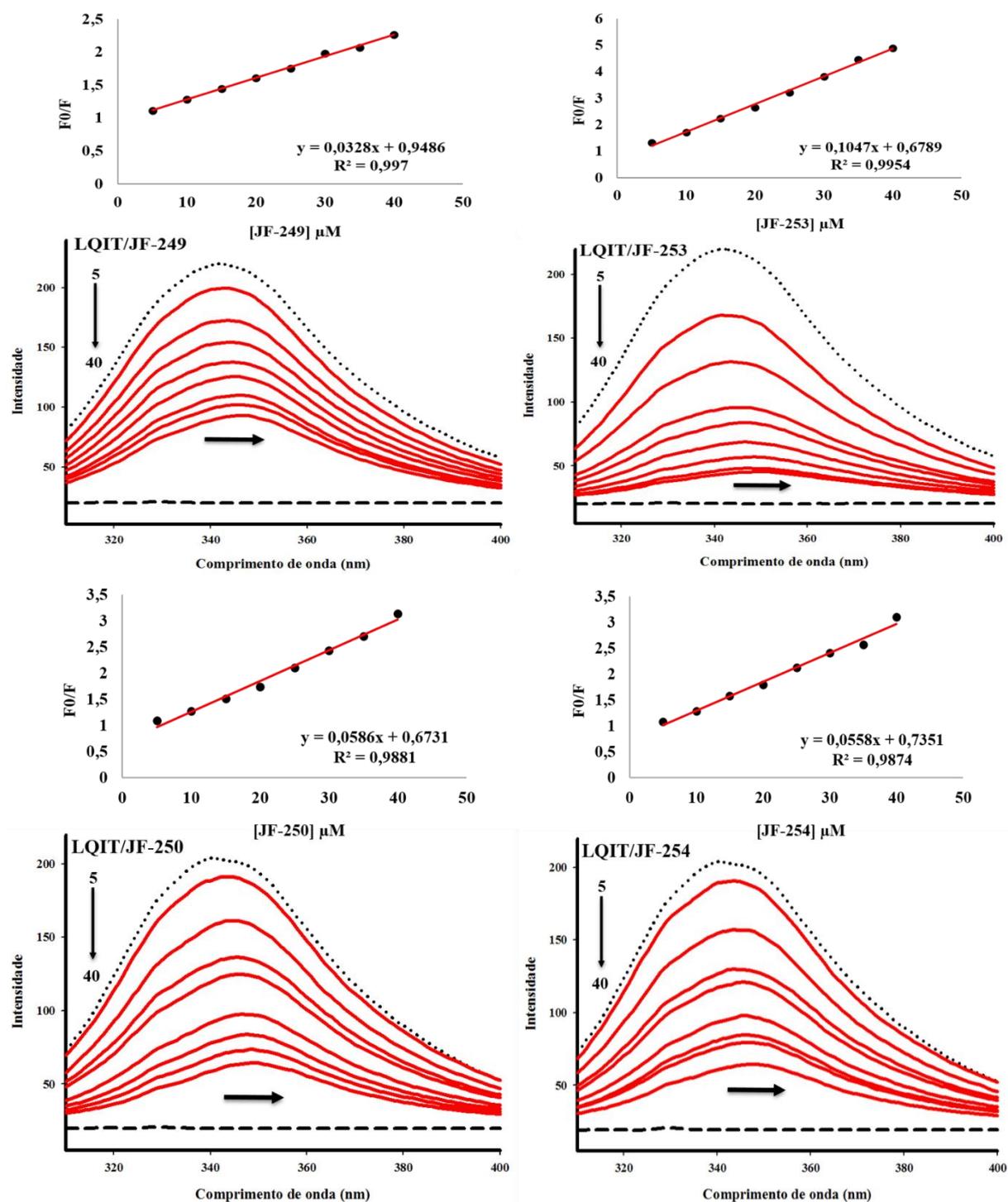


Figura B4. Espectros de supressão fluorescente da BSA (20 μM) na ausência (.....) e na presença e na presença dos derivados LQIT/JF's 250, 251, 254 e 255 (—). A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (----). As setas (\downarrow) e (\rightarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), à temperatura ambiente, e o efeito batocrômico, respectivamente Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.

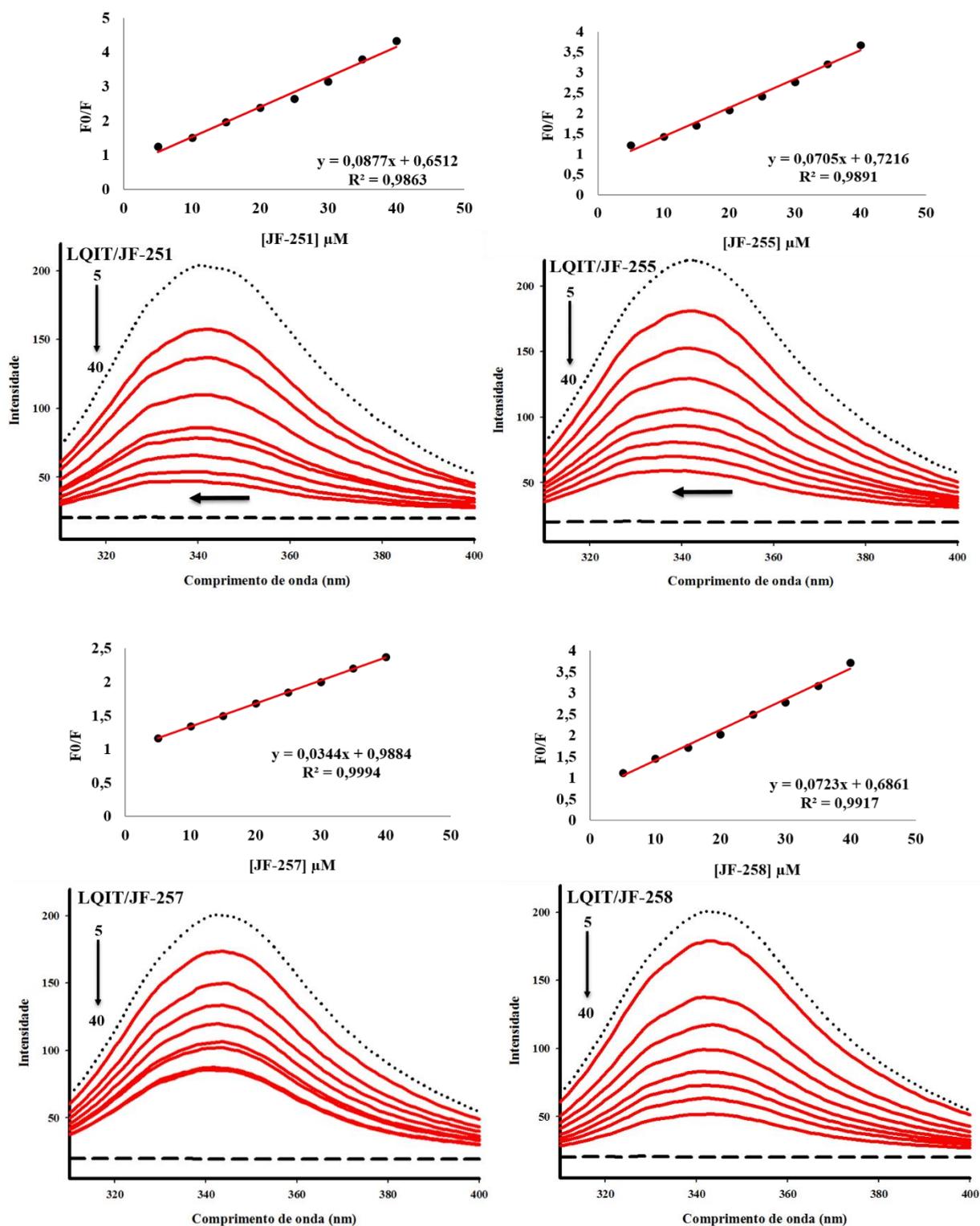
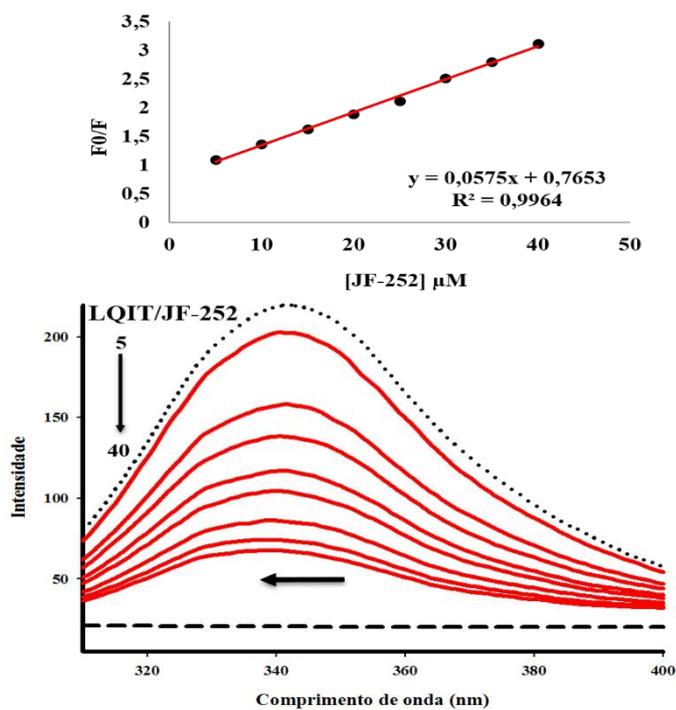


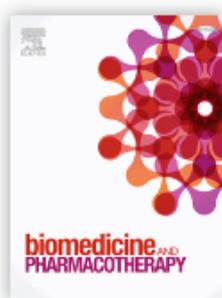
Figura B5. Espectros de supressão fluorescente da BSA (20 μM) na ausência (.....) e na presença e na presença dos derivados LQIT/JF-252 (—). A fluorescência dos compostos livres também foi monitorada como controle (----). As setas (\downarrow) e (\rightarrow) mostram a diminuição da intensidade sobre o aumento da concentração dos complexos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM), à temperatura ambiente, e o efeito batocrômico, respectivamente. Inserido: Gráfico da Supressão de Stern-Volmer da intensidade de supressão relativa (F_0/F) em função da concentração do derivado (Q), conforme determinado a partir dos dados espectrais.



APÊNDICE C – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Fator de impacto: 3.457

Qualis CAPES: B1 (Ciências Biológicas I)



Biomedicine & Pharmacotherapy

Biomedicine & Pharmacotherapy 96 (2017) 1538–1556



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

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



Review

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



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

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

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

^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), 50670-901, Recife, PE, Brazil