



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

**DENISE MARIA FIGUEIREDO ARAÚJO DUARTE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIMALÁRICA E ESTUDOS  
DE INTERAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS**

**Recife**  
**2019**

**DENISE MARIA FIGUEIREDO ARAÚJO DUARTE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIMALÁRICA E ESTUDOS  
DE INTERAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Área de concentração:** Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde

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

**Coorientador:** Prof. Dr. Rui Moreira

**Recife**

**2019**

Catálogo na fonte:

Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Duarte, Denise Maria Figueiredo Araújo

Avaliação da atividade antitumoral, antimalárica e estudos de interação dos novos derivados tiossemicarbazonas / Denise Maria Figueiredo Araújo Duarte - 2019.

109 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Rui Moreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Tiossemicarbazona 2. Câncer de Mama 3. Malária

I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orient.) II. Moreira, Rui (coorient.)

III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-130

**DENISE MARIA FIGUEIREDO ARAÚJO DUARTE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIMALÁRICA E ESTUDOS  
DE INTERAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 14/03/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Externo)  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

## AGRADECIMENTOS

Definitivamente, acredito que esta seja a parte mais difícil da dissertação para ser escrita. Talvez pelo fato da dificuldade de se colocar em papel aquilo que você sente no coração, pois a significância das pessoas em nossas vidas vai muito além de palavras escritas. Por outro lado, quero nomear aquelas pessoas que diretamente estiveram envolvidas comigo neste projeto. E, portanto, deixo aqui registrado os meus mais profundos e sinceros agradecimentos:

A Deus, como ser que me concede luz, força, fé e esperança, para trilhar os caminhos e não desanimar diante dos obstáculos.

A minha orientadora e mentora, Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, minha eterna gratidão por todo carinho, dedicação, cuidados, conselhos, por me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa de sucesso e conduzir de forma justa e competente todos os seus “filhos” científicos. Nada daria certo sem sua força, competência e determinação.

A Jamerson Ferreira de Oliveira, pela co-orientação na introdução da parte química deste trabalho em minha vida. Graças a você e ao seu amor por esta área, quero melhorar cada vez mais.

Ao meu marido Nuno José Alves Duarte, que entrou de cabeça junto comigo nesse projeto de vida. Obrigada pela parceria, força, incentivo e compreensão por todo tempo distante.

A minha mãe Maria do Perpétuo Socorro Figueiredo Araujo, por sempre acreditar e incentivar para que eu nunca pare de estudar.

Aos meus amigos, e parceiros de vida, Amélia Ribeiro e Emanuel Ferreira, pelo carinho, companheirismo, parceria. Amizade que perdurará além dos “muros” desse mestrado.

Agradecimentos eternos à Ana Carolina Malho Sousa (Carol), responsável pelo Laboratory of Pharmaceutic and Regulatory Science, meu “anjo” e minha grande amiga. Sem ela essa dissertação não teria o mesmo brilho. Tão novinha e já é uma cientista em potencial.

Ao Prof. Rui Moreira (Faculdade de Farmácia/Universidade de Lisboa), A Profa. Mafalda Videira (Faculdade de Farmácia/Universidade de Lisboa), a Profa. Fátima Nogueira (Instituto de Higiene e Medicina Tropical) pelo acolhimento, amizade e disponibilidade. Grandes presentes da ciência em minha vida.

A minha família (irmãs e sobrinhos), sempre presente em todas as conquistas de minha vida, a quem agradeço por toda torcida, admiração e suporte.

A todos os colegas do laboratório de Química e Inovação Terapêutica, em especial: Iris, Pedro, Paula, Rubinho Natanael, Keriolaine, Rafaela, Alana e Suellen.

À FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pelo suporte financeiro.

## RESUMO

O Câncer e a malária são patologias consideradas como grave problema de saúde pública, devido ao seu grau de mortalidade. Um dos problemas que une essas duas patologias trata-se da dificuldade de encontrar um fármaco que consiga tratar e inibir a progressão dessas doenças sem causar resistências aos medicamentos e efeitos colaterais. Nesse sentido, as moléculas com núcleos heterocíclicos, como indol e benzodioxol, além da porção tiossemicarbazonas são comumente estudadas quanto aos seus efeitos em diversas atividades farmacológicas. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi a síntese de nove derivados 2-((1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamidas a fim de verificar a atividade antitumoral, antimalarial. Além disso, foi investigada a sua capacidade de interação o DNA e proteína albumina (BSA). Os derivados foram sintetizados a partir de 2 etapas de síntese, ocorrida em temperatura ambiente, e as estruturas foram elucidadas e comprovadas por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, infravermelho e MS. A análise da ligação ao ctDNA e BSA foi conduzida através da espectroscopia de absorção e da fluorescência. Foi verificado que os derivados apresentaram afinidade de interação com as biomoléculas. Destaque para o derivado LQIT/JF-264 que apresentou o maior *K<sub>b</sub>* na ordem de 10<sup>6</sup>, na interação com o DNA. A atividade antitumoral e antimalarial foi avaliada através do ensaio MTT usando duas linhagens celulares de câncer de mama – MCF-7 e MDA-MB-231 e do teste colorimétrico syber green, respectivamente. Em relação aos testes de antiproliferativos, os compostos foram mais ativos na linha celular MDA-MB-231. O derivado LQIT/JF-TDZA apresentou IC<sub>50</sub> de 3 µM. E, no que tange a atividade antimalarial, o composto LQIT/JF-260 foi o melhor destacado, com inibição de 0,77 µM. Tais resultados nos possibilitam inferir que os derivados apresentam potencialidade como agentes antitumorais, devido a sua capacidade de interação com o DNA e inibição da proliferação em células de câncer de mama. Além disso, podem ser promissores antimaláricos, uma vez que apresentou uma capacidade bastante expressiva na inibição das formas eritrocitárias do parasito da malária.

Palavras-chave: Tiossemicarbazona. DNA. Antiproliferativo. Câncer de Mama. Malária.

## ABSTRACT

Cancer and malaria are pathologies considered as a serious public health problem, due to their degree of mortality. One of the problems that unites these two pathologies is the difficulty of finding a drug that can treat and inhibit the progression of these diseases without causing resistance and collaterals. In this sense, molecules with heterocyclic nuclei, such as indole and benzodioxol, in addition to the thiosemicarbazones are commonly studied for their effects on various pharmacological activities. For this reason, the aim of this work was the synthesis of nine compounds 2 - ((1H-indol-3-yl) methylene) -N- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl) hydrazinecarbothioamides derivatives in order to verify the antitumor, antimalarial activity. In addition, their ability to interact with DNA and protein albumin (BSA) was investigated. The derivatives were synthesized from 2 synthesis steps at room temperature and the structures were elucidated and confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, infrared and MS. The analysis of binding to ctDNA and BSA was conducted by absorption spectroscopy and fluorescence. It was found that the derivatives had an affinity for interaction with the biomolecules. We highlight the derivative LQIT / JF-264 that presented the highest Kb in the order of 106, in the interaction with the DNA. Antitumor and antimalarial activity was assessed using the MTT assay using two breast cancer cell lines - MCF-7 and MDA-MB-231 and the syber green colorimetric assay, respectively. Regarding the antiproliferative tests, the compounds were more active in the MDA-MB-231 cell line. The LQIT / JF-TDZA derivative showed IC<sub>50</sub> of 3 μM. And, regarding antimalarial activity, compound LQIT / JF-260 was the best highlighted, with inhibition of 0.77 μM. These results allow us to infer that the derivatives have potential as antitumor agents due to their ability to interact with DNA and inhibit proliferation in breast cancer cells. In addition, they may be promising antimalarials, since they have a very expressive capacity in inhibiting the erythrocyte forms of the malaria parasite.

Keywords: Thiosemicarbazone. DNA. Antiproliferative. Breast cancer. Malaria .

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1—	Comparação dos diferentes subtipos de câncer da mama e prognósticos.....	19
Figura 2—	Mecanismo de “stress replicativo” induzido pela atividade de oncogenes.....	21
Figura 3—	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> .....	24
Figura 4—	Interdisciplinaridade inovadora que transforma medicamentos.....	28
Figura 5—	Estrutura química do derivado tiofeno- tiossemicarbazona obtido por hibridação molecular.....	29
Figura 6—	Estrutura química do derivado benzodioxol com propriedade antiparasitária.....	30
Figura 7—	Compostos naturais contendo indol.....	31
Figura 8—	Estrutura química do agente anticâncer elipticina.....	32
Figura 9—	Derivados indólicos com promissoras atividades antitumorais.....	32
Figura 10—	Derivados indólicos com atividades de ligação ao DNA e inibição da enzima topoisomerase.....	33
Figura 11—	Novos fármacos indólicos que estão em testes clínicos.....	34
Figura 12—	Atividades biológicas das tiossemicarbazonas.....	35
Figura 13—	Estrutura química do derivado tiossemicarbazona com atividade antitumoral.....	36
Figura 14—	Interação de moléculas ao DNA.....	38
Figura 15—	Estrutura química das moléculas que se ligam ao sulco do DNA.....	40
Figura 16—	Derivados isatin tiossemicarbazonas mostrando hipocromismo.....	42

Figura 17—	Mostra o efeito hipercrômico.....	43
Figura 18—	Estruturas tridimensionais de HSA e BSA com resíduos de triptofano em cor verde.....	44
Figura 19—	Estruturas tridimensionais de HSA e seus domínios.....	45
Figura 20—	Estruturaa Geral do Derivado de ácido indol-3-acético (IAA).....	46
Figura 21—	Estrutura do DHAQTS.....	46
Figura 22—	Extinção da fluorescência a medida que aumenta a concentração do fármaco.....	48
Figura 23—	Resultados encontrados por Singla (2016).....	49
Figura 24—	Esquema reacional para obtenção do intermediário tiossemicarbazida benzodioxol (TDZA).....	51
Figura 25—	Esquema reacional para obtenção dos derivados aril-tiossemicarbazonas.....	51
Figura 26—	Solução dos compostos testados, indicando a diluição seriada.....	61
Figura 27—	Esquema do Ensaio de avaliação da atividade antimalaria com SYBR Green I.....	62
Figura 28—	Esquema de síntese dos derivados LQIT/JFs.....	63
Figura 29—	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado LQIT/JF-TDZA.....	64
Figura 30—	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado LQIT/JF-258.....	65
Figura 31—	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do derivado LQIT/JF-258.....	66
Figura 32—	Espectro de infravermelho do derivado LQIT/JF-TDZA.....	66
Figura 33—	Espectro de infravermelho do derivado LQIT/JF-258.....	67
Figura 34—	Espectro de massas do derivado LQIT/JF-TDZA com massa encontrada de 212,058 g/mol.....	68

Figura 35—	Espectro de massas do derivado LQIT/JF-258 com massa encontrada de 416,995 g/mol.....	68
Figura 36—	Espectros dos derivados LQIT/JF-257 e LQIT/JF-266 em interação com o DNA.....	76
Figura 37—	Espectros de absorção dos derivados LQIT/JF-258 e LQIT/JF-259.....	76
Figura 38—	Espectros de absorção dos derivados LQIT/JF-260 e LQIT/JF-265.....	77
Figura 39—	Espectro de absorção do derivado LQIT/JF-TDZA em interação com o DNA.....	77
Figura 40—	Maior hipocromicidade do derivado LQIT/JF-264.....	78
Figura 41—	Espectro de absorção do derivado LQIT/JF-TDZA em interação com a albumina.....	82
Figura 42—	Espectro de absorção dos derivados LQIT/JF 257 a 260.....	83
Figura 43—	Espectro de fluorescência dos derivados JF-262, JF-264, JF-265, JF-266.....	84
Figura 44—	Espectro de fluorescência dos derivados LQIT/JF-258 e LQIT/JF-264....	87
Figura 45—	Espectros de fluorescência dos derivados tiossemicarbazonas. LQIT/JF-257, LQIT/JF-259, LQIT/JF-260, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266 evidenciando o desvio para a região do azul.....	88
Figura 46—	Curvas dose-resposta dos compostos LQIT/JFs em células MCF-7, após 72 horas de incubação.....	92
Figura 47—	Curvas dose-resposta dos compostos LQIT/JFs em células MDA-MB-231, após 72 horas de incubação.....	93
Figura 48—	Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade in vitro de <i>P. falciparum</i> (3D7) LQIT/JF-TDZA.....	97
Figura 49—	Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade in vitro de <i>P. falciparum</i> (3D7) LQIT/JF-259.....	97
Figura 50—	Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade in vitro de <i>P. falciparum</i> (3D7) LQIT/JF-260.....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1—	Principais fármacos antimaláricos disponíveis.	26
Tabela 2—	Dados espectroscópico de absorção UV-vis dos derivados tiossemicarbazonas na ausência e presença do DNA.....	75
Tabela 3—	Dados da espectroscopia de absorção UV-vis dos derivados tiossemicabazona, na presença e na ausência da proteína albumina (BSA).....	81
Tabela 4—	Dados da espectroscopia de fluorescência dos derivados tiossemicarbazona, na presença e na ausência da proteína albumina (BSA).....	86
Tabela 5—	Valores de IC <sub>50</sub> (μM) dos derivados Tiossemicarbazonas testados em linhas de câncer de mama – MCF-7 e MDA-MB-231.....	90
Tabela 6—	IC <sub>50</sub> dos derivados LQIT/JF no ensaio de susceptibilidade in vitro de <i>P. Falciparum</i> (3D7) em nanomolar.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

3D7	Estirpe sensível do <i>P. falciparum</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino
ctDNA	DNA de timo bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HSA	Albumina do Soro Humano
IC <sub>50</sub>	50% da concentração inibitória máxima
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LQIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
LBDD	Ligand-Based Drug Design
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma de mama
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
SBDD	Structure-Based Drug Design
Tris	Tetrametilhidroxiaminometano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS.....	17
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	CÂNCER DA MAM: A doença do século XXI.....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Patologia do câncer da mama.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Mecanismos moleculares do câncer (Cancer's Hallmarks).....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Terapias anti-cancerígenas.....</b>	<b>21</b>
2.2	MALÁRIA: Uma doença do século XX que se tornou na realidade do século XXI.....	23
<b>2.2.1</b>	<b>Ciclo de vida do parasito.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Panorama atual.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Diagnóstico e Tratamento.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Principais fármacos utilizados no tratamento da malária.....</b>	<b>26</b>
2.3	QUÍMICA MEDICINAL.....	27
2.4	DERIVADOS INDÓLICOS.....	30
2.5	DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS.....	34
2.6	INTERAÇÃO COM O DNA.....	37
<b>2.6.1</b>	<b>Ligação de Intercalação.....</b>	<b>39</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Ligação ao Sulco.....</b>	<b>39</b>
2.7	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO DNA.....	41
2.8	ALBUMINA.....	43
<b>2.8.1</b>	<b>Sítios de ligação da BSA.....</b>	<b>45</b>
2.9	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NA BSA.....	47
2.10	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NA BSA.....	48
<b>3</b>	<b>SEÇÃO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>50</b>
3.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS.....	50
<b>3.1.1</b>	<b>Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>50</b>
3.1.2.1	Síntese do intermediário tiossemicarbazida: N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-	

	il)hidrazinacarbotioamida (LQIT/JF-TDZA).....	50
3.1.2.2	Síntese dos derivados derivados 2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotioamidas (LQIT/JFs).....	51
3.2	ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM DNA.....	53
3.2.1	<b>Reagentes e equipamentos.....</b>	<b>53</b>
3.2.2	<b>Preparação do ctDNA.....</b>	<b>53</b>
3.2.3	<b>Estudos espectroscópicos de absorção UV-VIS.....</b>	<b>53</b>
3.2.4	<b>Análise de interação com albumina (BSA).....</b>	<b>54</b>
3.2.5	<b>Espectroscopia de Fluorescência.....</b>	<b>54</b>
3.3	DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS EM LINHAS DE CÂNCER DA MAMA (MCF-7 E MDA-MB-231).....	55
3.3.1	<b>Material e reagentes.....</b>	<b>55</b>
3.3.2	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>55</b>
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	56
3.4.1	<b>Preparação de soluções stock e meio de cultura.....</b>	<b>56</b>
3.4.2	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>59</b>
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
4.1	MECANISMO DE SÍNTESE.....	63
4.1.1	<b>Caracterização estrutural.....</b>	<b>64</b>
4.2	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INTERAÇÃO COM O DNA.....	73
4.2.1	<b>Espectroscopia de Absorção UV-Visível.....</b>	<b>73</b>
4.2.2	<b>Avaliação dos resultados da interação com a BSA.....</b>	<b>80</b>
4.2.3	<b>Espectroscopia de Absorção UV-Visível.....</b>	<b>80</b>
4.2.4	<b>Espectroscopia de fluorescência com BSA.....</b>	<b>85</b>
4.3	DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS EM LINHAGENS DE CÂNCER DA MAMA (MCF-7 E MDA-MB-231).....	89
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-MALÁRICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	95
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E NOVAS PERSPECTIVAS.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em pleno século XXI, o câncer é a doença que mais afeta a população mundial, sendo responsável por mais de um quarto de todas as mortes. O aumento do número de casos relaciona-se, entre outros, com o aumento da esperança média de vida da população, mudança nos hábitos alimentares e problemas genéticos. Segundo as estimativas do INCA, para o biênio 2016-2017 ocorreram cerca de 600 mil novos casos de câncer.

A promoção da atividade oncogênica está intimamente relacionada com os elevados níveis de instabilidade genômica, que resultam da inadequada transmissão da informação genética às células-filhas, num processo designado por replicação do DNA, descrito como sendo um dos marcadores do câncer (do inglês Cancer's Hallmarks) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Desta forma, uma das formas de terapia é estudar o DNA e os mecanismos que permitem a sua interação com moléculas biológicas com um potencial anticancerígeno (BOYER et al. 2016).

Outra problemática que será abordada neste trabalho será a malária, outro grave problema de saúde pública e que, em 2018 o Brasil deparou-se com um aumento de 50% do número de casos em relação ao ano de 2017. A malária é uma doença infecciosa, parasitária que afeta os glóbulos vermelhos do sangue, provocando uma grave anemia, e causar a morte. Portanto, assim como no câncer, o cenário mundial concentra esforços na descoberta de novos antimaláricos, uma vez que o controle da doença é dificultado pela resistência aos fármacos pelos parasitos, resistência a inseticidas e a falta de uma vacina eficaz.

A descoberta de fármacos antimaláricos é especialmente desafiadora devido à biologia única dos parasitos da malária, à escassez de ferramentas para identificar novos alvos de fármacos e aos mecanismos de ação pouco conhecidos dos antimaláricos já praticados na clínica.

É importante ressaltar que, para que os fármacos possam exercer seus efeitos terapêuticos de forma eficiente, fundamenta-se que eles precisam ser distribuídos, via sistema circulatório, por diversos caminhos, pois isso está diretamente relacionado a sua biodisponibilidade. Nesse sentido, a albumina é a proteína que existe em maior quantidade no plasma sanguíneo e é capaz de se ligar e exercer o transporte de muitas moléculas endógenas e exógenas, como as pequenas moléculas insolúveis em água. A capacidade de interação com esta proteína vem sendo pesquisada nos últimos anos e tem se tornado uma característica importante para se compreender os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de

moléculas que podem ser potencialmente ativas para a farmacologia (CHAVES et al.,2017).

A eficácia de um fármaco está diretamente relacionada com a sua biodisponibilidade, sendo que necessita de ser distribuído eficazmente até o local do tumor, através do sistema circulatório.

A capacidade de interação dos fármacos com a proteína albumina tem sido investigada nos últimos anos, e tem-se tornado uma característica importante para se compreender os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de moléculas que podem ser potencialmente ativas para a farmacologia (CHAVES et al. 2018).

Nesse contexto, os derivados químicos estudados nesse trabalho possuem a porção tiossemicarbazonas, e têm sido empregados na síntese e utilizados como estratégias para desenvolvimento de fármacos antitumorais, graças a sua capacidade de interagir com o DNA e causar mudanças em suas funções e estrutura, o que pode interferir no ciclo. Além disso, as tiossemicarbazonas interagem também com várias proteínas, inclusive albumina, indicando que estas poderiam atuar como transportadoras desses derivados.

O indol, por sua vez, é um composto de origem natural, e também tem sido usado no planejamento de novos agentes promissores na terapêutica do câncer e da malária. Esse heterociclo, com uma porção pirrol em sua estrutura, rica em elétrons, pode interagir de modo não covalente com outras moléculas, como DNA, formando ligações de hidrogênio (ADWAS et al 2018). O indol está presente como andaime promissor, importante para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos que visam a inibição da degradação da hemoglobina pelo parasito (PAULO et al 2014).

Outra estrutura com características moleculares semelhantes ao indol, o benzodioxol, tem demonstrado várias propriedades farmacológicas, inclusive antiproliferativa em linhagens de câncer de mama e bloqueio de processos angiogênicos e antiparasitários (ALCOLEA et al. 2016; SILVA et al. 2018).

Portanto, diante dessa busca por novas entidades químicas que possam ser biologicamente ativas e usadas no tratamento do câncer e da malária, este trabalho procurou desenvolver novos derivados tiossemicarbazonas afim de avaliar a interação com o DNA, Albumina, atividades antiproliferativa e antimaláricas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar novos derivados 2-(1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hidrazinacarbotoamidas para avaliar a atividade antitumoral, antimalárica, bem como estudar a capacidade de interação com o DNA (ácido desoxirribonucleico), e a proteína albumina (BSA).

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar e determinar as características físico-químicas dos novos derivados indólicos da série: 2-(1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hidrazinacarbotoamidas;
- ✓ Caracterizar as estruturas químicas através de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), carbono (RMN <sup>13</sup>C), infravermelho e espectrometria de massas (MS);
- ✓ Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos novos derivados sintetizados frente a diferentes linhagens de células de câncer de mama – MCF-7 e MDA-MB-231;
- ✓ Analisar a interação com o DNA (ácido desoxirribonucleico) e albumina (BSA) dos derivados, através da espectroscopia de absorção UV-visível e espectroscopia de fluorescência.
- ✓ Determinar o valor de IC<sub>50</sub> dos compostos na estirpe 3D7 de *Plasmodium falciparum*.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CÂNCER DA MAMA – A DOENÇA DO SÉCULO XXI**

#### **2.1.1 Patologia do câncer da mama**

A palavra câncer é utilizada para designar um grupo de patologias que se caracterizam pelo crescimento de células anormais para além dos seus limites “normais”, tendo a capacidade de migrar e invadir outros órgãos, o que na maioria dos casos pode resultar na morte do paciente. É a segunda causa de morte a nível mundial, estimando-se que só em 2018 este número seja de 9,6 milhões (WHO, 2018).

A organização mundial de saúde, afirma que o câncer de pulmão, próstata, estômago e fígado são os que apresentam maior prevalência nos indivíduos do sexo masculino, enquanto que o câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical e tireóide são os mais comuns nas mulheres.

Segundo as estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), para o biênio 2016-2017 ocorreram cerca de 600 mil novos casos de câncer. Só para o ano 2018, apenas 10% deste valor corresponde ao número de novos casos de câncer da mama feminino.

A mama é composta, maioritariamente, por tecido adiposo e tecido conjuntivo que compreendem entre 12 a 20 lóbulos (seções), cada um contendo os componentes epiteliais e o estroma. Os componentes epiteliais integram os lóbulos e ductos que são responsáveis por produzir o leite materno e o seu transporte até ao mamilo, respectivamente. Por sua vez, o estroma é composto por fibroblastos, células endoteliais, hematopoiéticas e adipócitos. No caso particular do homem, estes possuem lóbulos sobdesenvolvidos uma vez que não existe nenhuma condição fisiológica que os leve a produzir leite materno (MCDERMOTT; WICHA, 2010).

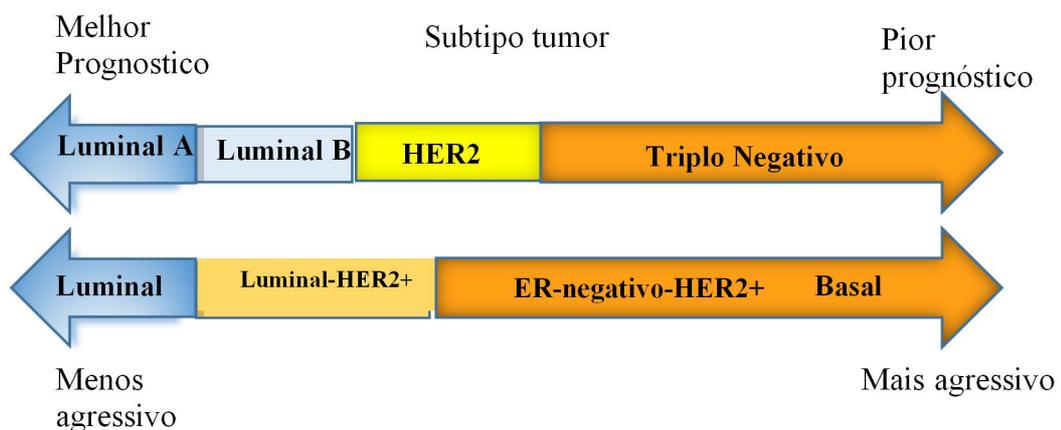
Os dutos são constituídos por células basais (que se dividem em células dos dutais e alveolares que limitam os ductos) e por células mioepiteliais (que por serem células contráteis transportam o leite desde os lóbulos até aos mamilos. As modificações que ocorrem nas células da mama durante a gravidez sugerem a existência de células com uma elevada capacidade regenerativa e proliferativa, características associadas a células estaminais (MCDERMOTT; WICHA, 2010).

O câncer da mama pode ser dividido em dois grupos principais – carcinomas e sarcomas. Os carcinomas são os tipos de câncer que têm a sua origem nos componentes epiteliais e, no caso do câncer da mama, esta corresponde ao epitélio que limita os lóbulos e os ductos. Cerca de 80% do câncer da mama origina-se na região dos ductos, enquanto que os restantes 20% nos lóbulos. Por outro lado, os sarcomas correspondem a cânceres que têm a sua origem nos componentes do estroma, e perfazem 1% de todos os casos de câncer da mama, sendo considerado o tipo de câncer mais raro (JOHNS, 2017).

Para estimar o estágio do câncer da mama, os patologistas baseiam-se na quantificação de biomarcadores específicos como ferramentas de prognósticos e/ou preditivas. Enquanto os biomarcadores preditivos, tais como o receptor de estrogênio (ER) e o de progesterona (PR), elucidam quanto à resposta que um paciente irá ter a uma dada terapia, a presença ou ausência dos biomarcadores de prognóstico, tais como HER2, relacionam-se com o risco de recorrência e mortalidade (JOHNS, 2017).

Contudo, é o câncer da mama triplo-negativo que mais atenções deperta por parte de oncologistas e investigadores, pois devido à ausência dos biomarcadores acima mencionados (*Figura 1*), apresenta um mau dignóstico e um comportamento clínico agressivo, uma vez que não respondem a qualquer terapia hormonal e tratamentos que tenham como alvo, entre outros, o receptor HER2 (STOCKMANS et al 2015; DAWOOD et al 2010). Devido à sua heterogenidade molecular, o câncer de mama pode ser dividido subtipos: do tipo luminal A; luminal B; HER2; “Basal Like”R (AHN et al 2016).

Figura 1. Comparação dos diferentes subtipos de câncer da mama e prognósticos ( AHN et al. ,2016).



O subtipo Luminal A expressa de forma diferente, quando comparados com os restantes subtipos, as vias hormonais e as vias metabólicas associadas aos receptores de

estrogênio/androgênio. Não tem amplificação do gene ERBB2 (proteína Her2-Neu). Apresenta baixa proliferação celular e tem melhor prognóstico dos carcinomas mamários. Luminal B são negativos para HER2 e o índice de proliferação celular é 15%, expressam receptores hormonais. O subtipo HER2 caracteriza-se por apresentar aumento da expressão do gene ERBB2. São altamente agressivos, no entanto apresentam resposta quando o tratamento é baseado em anticorpo anti-Her2 ou fármacos inibidores deste receptor. Tem origem nos ductos mamários. Por último, o subtipo basal-like originário dos ductos mamários. São positivos para expressão de receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR). Tem índice de proliferação celular bastante elevado, às vezes superior a 90% (AHN et al., 2016; LEHMANN et al 2011).

### **2.1.2 Mecanismos Moleculares Do Câncer (Cancer's Hallmarks)**

Os mecanismos moleculares que definem um câncer, também designados por marcadores do câncer (do inglês *Cancer's Hallmarks*) dividem-se em seis grandes capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de um tumor. Nestes inserem-se a resistência à morte celular, a indução da angiogênese, ativação de mecanismos indutores de invasão e metastização, ativação permanente de vias de sinalização proliferativas, evasão a agentes supressores de crescimento, e transmissão da sua capacidade imortal às células-filhas (HANAHAN; WEINBERG 2011).

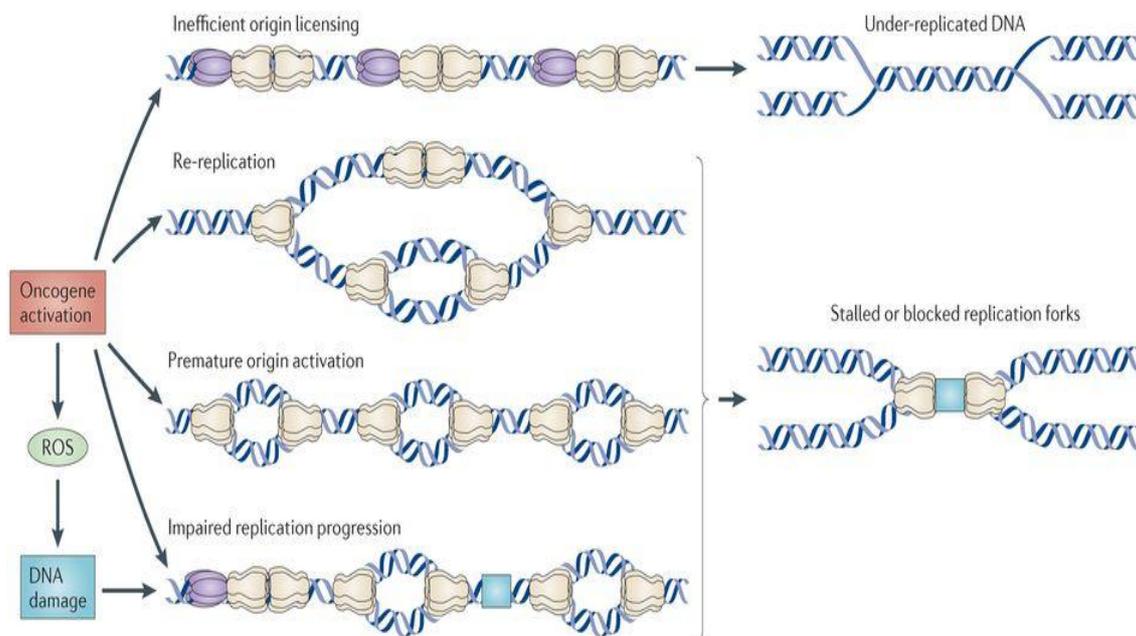
O elo comum a estes marcadores é a instabilidade genômica, na qual certos genótipos mutantes conferem uma vantagem seletiva em relação aos subclones de células, promovendo o seu crescimento anormal e eventual dominância num dado ambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG 2011).

A replicação do DNA é um processo biológico altamente regulado de modo a assegurar uma transmissão completa e precisa da informação genética às células filhas. Este processo é frequentemente desafiado por fatores endogêneos e exogêneos, como por exemplo a existência de estruturas secundárias (tais como quadruplexos G), que são um obstáculo à atividade da DNA polimerase (BOYER; WALTER, 2016).

Estes fatores são responsáveis por induzir um fenômeno designado por “stress replicativo” (RS – do inglês “Replicative Stress”), que é definido como uma transição lento ou empasse do “garfo” de replicação (ZEMAN, CIMPRICH, 2014; MAGDALOU et al., 2014), sendo mundialmente reconhecido por ser a maior fonte de instabilidade genômica<sup>19</sup>.

Notavelmente, este fenômeno está descrito como sendo induzido pela atividade de oncogenes (Figura 2)(BARTKOVA et al, 2015; GAILLARD et al, 2015).

**Figura 2.** Mecanismo de “stress replicativo” induzido pela atividade de oncogene. (GAILLARD et al. (2015).



Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que o “stress replicativo” para além de ser a maior causa de instabilidade genômica, é também uma condição ligada à formação de células pré-tumorais e tumorais (GAILLARD et al, 2015). É a compreensão deste tipo de mecanismos que permite desenvolver fármacos anticancerígenos que têm como alvo, principalmente, as proteínas, e/ou genes envolvidos que têm os seus níveis de expressão alterados como consequência da tumoregenicidade das células.

### 2.1.3. Terapias anti-cancerígenas

Durante décadas o desenvolvimento destes fármacos baseou-se na identificação de compostos que tivessem uma atividade citostática/citotóxica. Contudo, os dois grandes obstáculos destes fármacos prendem-se com a sua toxicidade e com o fato de as células cancerígenas terem a capacidade de adquirirem resistência aos mesmos (HILAL et al 2015; CHABNER et al 2005).

A resistência aos fármacos (do inglês *multidrug resistance*) é o mecanismo no qual as células tumorais tornam-se insusceptíveis a um fármaco e, conseqüentemente, a qualquer outro fármaco que tenha um diferente mecanismo de ação nestas células (SUI et al 2012).

Este fenótipo resulta da sobre-expressão da P-glicoproteína (P-gp) na membrana plasmática destas células. É um transportador dependente de ATP, com 170kDa, que é responsável pelo efluxo de todos os fármacos anticancerígenos. A p-gp consegue transportar, contra o seu gradiente de concentração, tanto fármacos citotóxicos como moléculas neutras, anfifílicas e catiónicas (SUI et al., 2012; KATAYAMA et al., 2014).

Os compostos químicos foram utilizados para o tratamento do câncer pela primeira vez em 1942, no qual a mecloretamina (mostarda nitrogenada) foi utilizada como tratamento para o linfoma, e a possibilidade de cura deste câncer surgiu 20 anos depois quando a ratos infectados com células de leucemia foi administrado ciclofosfamida (SUI et al., 2012; DeVITA et al., 2008).

Um tratamento anti-cancerígeno pode ser utilizado contra muitos alvos, sendo o DNA o mais estudado atualmente (ALI et al., 2014). A interação entre o fármaco e o DNA ocorre pela intercalação do mesmo com os pares de base da dupla hélice do DNA e ligação ao sulco. Este método de ação interfere com o processo de replicação do DNA e, conseqüentemente, com a transcrição, e inibe a expressão gênica, influenciando as funções fisiológicas do DNA e inibindo a proliferação celular (ZHU et al., 2014; AL-OTAIBI et al., 2014). Esta ligação ao DNA ocorre de forma não covalente, incluindo empilhamento de elétrons, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (EL-GOGARY et al., 2003).

A realidade é que apenas um em cada quinze novos fármacos têm capacidade para virem a ser avaliados e aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) (AVELLAR et al., 2017). No entanto, muitos agentes quimioterapêuticos têm sido aprovados e comercializados para o tratamento do câncer, mas a busca pelo fármaco ideal permanece devido à elevada complexidade dos mecanismos moleculares que contribuem para a tumorigênese de uma célula cancerígena (AVELLAR et al., 2017).

A identificação de novos fármacos e a previsão de respostas em pacientes com câncer são grandes desafios que os investigadores enfrentam diariamente. Neste contexto a química medicinal surge como um conjunto de ciências que, de forma integrada, nos proporciona uma das principais forças motrizes na descoberta de novos fármacos, onde o desenho e a síntese de novos compostos levam a múltiplos medicamentos, com o objetivo de aumentar o seu

potencial, e assim levar a descoberta de medicamentos transformadores para tratar os pacientes (AVELLAR, et al., 2017).

## 2.2 MALÁRIA: Uma doença do século XX que se tornou na realidade do século XXI

A Malária também chamada paludismo é uma doença protozoária transmitida pela picada do inseto fêmea *Anopholes* infectado, que transmite ao homem parasitos do gênero *Plasmodium*. Existem 5 espécies de *Plasmodium* capazes de infectar os humanos, denominados *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (zoonótica) (WELLEMS et al., 2009).

A prevalência da malária ressurgiu nos países tropicais das décadas de 1970 a 1990, devido a uma combinação de relaxamento dos esforços de controle, aumento da resistência a fármacos antimaláricos e resistência a inseticidas nos vetores de mosquitos (WHITE et al., 2009).

O *P. falciparum* é o parasito causador de maiores taxas de letalidade e o mais prevalente na África, onde apresenta uma concentração de morte elevada. A malária é endêmica em 91 países, principalmente na África, Ásia e Américas.

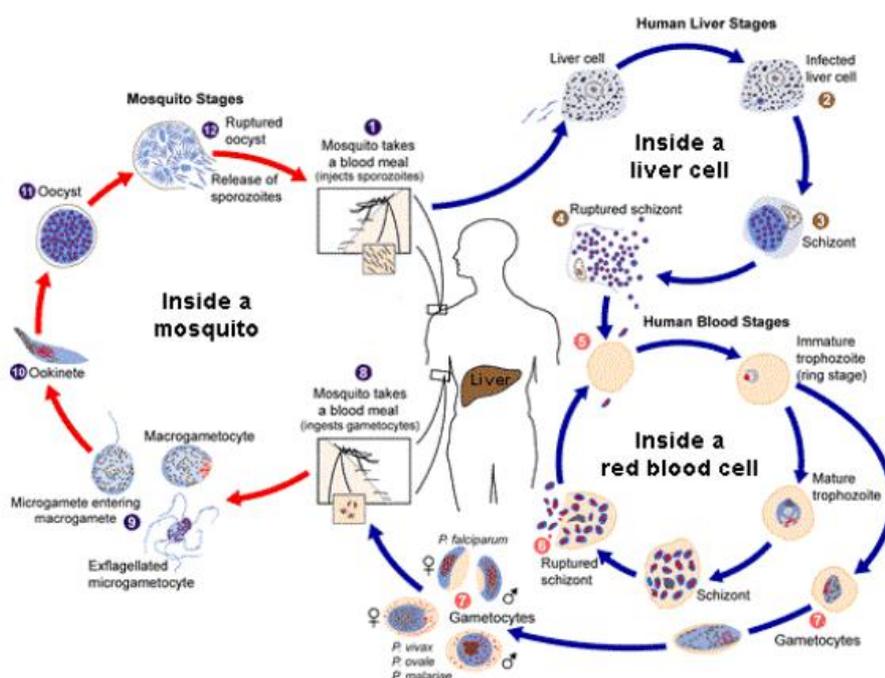
### 2.2.1. Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida do parasito (*Figura 3*) inicia-se quando o mosquito fêmea, durante o seu repasto sanguíneo pica o homem e deposita em seu corpo esporozoítos, que por sua vez migram até o fígado. No fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos, e ocorre multiplicação. Com a lise dos hepatócitos, libertam-se os merozoítos, estes migram para a corrente sanguínea onde penetram nos eritrócitos. Após 48 horas de infestação dos eritrócitos, os parasitos maturam-se, originando formas maduras, denominadas de trofozoítos e esquizontes (MOTA et al., 2002).

Entre 8 a 24 horas, um eritrócito infestado por um esquizonte se rompe, liberando novos merozoítos, que invadem novos glóbulos vermelhos (MOTA et al., 2002). Alguns parasitos na forma de merozoítos não chegam a forma esquizontes, mas sim gametócitos. Os gametócitos são as formas responsáveis por infectar outros mosquitos vetor. No intestino médio dos mosquitos, os gametócitos, macho e fêmeas, fundidos em zigoto, se ampliam em oocinetos. Os oocinetos são móveis, e se acumulam na parede do intestino do parasito, onde

se diferenciam em oocistos. Os oocistos liberam esporozoítos que se acumulam nas glândulas salivares, onde são injetados em humanos. Iniciando assim um novo ciclo (KALARIA et al., 2018).

**Figura 3.** Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* ( Kalaria et al.,2018).



## 2.2.2. Panorama atual

Segundo a OMS, em 2017 foram registradas 435 000 mortes por malária a nível mundial e 219 milhões de novos de casos<sup>49</sup>. No Brasil, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) a incidência de casos tem aumentado. Em 2017, houve um aumento de 48% em relação a 2016, somando 174.522 casos, ocorridos em 9 estados da região amazônica. Os mais expressivos são: Amazonas 74 mil; Pará, 33mil; Acre 32 mil e Tocantins com 71 casos.

Existe também uma preocupação importante em áreas não endêmicas, pois a malária é caso de doença em viajantes e migrantes que retornam. As viagens turísticas e a imigração de áreas endêmicas de malárias contribuem significativamente para a morbidade(WALKER, et al., 2018).

### 2.2.3. Diagnóstico e Tratamento

O exame de microscopia de sangue espesso e fino continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico da malária. A sintomatologia é febre, calafrios, dores de cabeça, diarreia, vômitos, cansaço, anemia, sintomas de uma malária branda. Os sintomas surgem por volta do 30º dia após a picada. Se não tratada de forma rápida e adequada, o quadro pode evoluir para malária severa, e causar graves complicações, como: icterícia, edemas pulmonares, obstrução dos vasos sanguíneos do cérebro (malária cerebral), comprometimento de órgãos como rins, fígado, baço e levar o indivíduo a óbito.

Há um número limitado de medicamentos que podem ser usados para tratar ou prevenir a malária, mas o aumento da resistência a esses medicamentos é motivo de preocupação para os profissionais de saúde. A resistência parece ocorrer por meio de mutações espontâneas que conferem sensibilidade reduzida a um determinado medicamento ou classe de fármacos.

Novos antimaláricos foram descobertos em um esforço para resolver este problema, mas todos esses medicamentos são caros ou têm efeitos colaterais indesejáveis. Mesmo a nova geração de medicamentos antimaláricos parece ser menos eficaz após um período de tempo variável devido ao desenvolvimento de resistência nos parasitos, especialmente as espécies de *Plasmodium falciparum* (BEKHIT et al., 2012).

Os ACTs (terapia combinada à base de artemisinina) são as terapias de linha de frente, porém, existe um sério risco de perder sua utilidade devido ao surgimento e à disseminação da resistência. Sem contar que os antimaláricos podem ter sérios efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, hipoglicemia, hipotensão, hepatotoxicidade, hipersensibilidade cutânea, o que limita o uso entre a população (ASHLEY et al., 2018). Nesse sentido, é urgente a descoberta de novos fármacos quimioterápicos que possam ser adjuvantes no processo de cura e tratamento.

### 2.2.4 Principais fármacos utilizados no tratamento da malária

Os fármacos antimaláricos são utilizados como profilaxia e também para tratar as formas do parasito. O principal objetivo do tratamento é garantir a cura completa, ou seja, a eliminação rápida e completa do parasito *Plasmodium* do sangue do paciente, a fim de prevenir a progressão da malária não complicada para doença grave ou morte, e para prevenir a infecção crônica que leva à malária relacionado com anemia. A droga ou combinação ideal de droga deve ser de dose única e capaz de eliminar do corpo todas as formas do parasito, em um curto período de tempo (WHO, 2000).

Existem vários fármacos disponíveis na clínica para tratamento. A maioria desses fármacos é utilizado para tratamento durante o ciclo de vida do *P. falciparum* dentro dos eritrócitos humanos, pois é neste estágio que aparecem as manifestações clínicas da malária (WELLEMS et al., 2009). As opções farmacológicas para tratar a malária e que tem maior relevância estão divididas a nove famílias de fármacos (*Tabela 1*).

**Tabela 1** - Principais fármacos antimaláricos disponíveis.

<b>Família Química</b>	<b>Fármacos</b>
<b>4-aminoquinolinas</b>	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
<b>Aminoálcoois</b>	Quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
<b>Sulfonamidas e sulfonas</b>	Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
<b>Biguanidas</b>	Proguanil, cloroproguanil
<b>Diaminopirimidina</b>	pirimetamina
<b>8-aminoquinolinas</b>	primaquina
<b>Lactonas sesquiterpênicas</b>	Artemisinina, arteeter, artemeter, artesunato, dihidroartemisinina
<b>Antibióticos</b>	Azitrocimna, clinamicina, doxiciclina, tetraciclina
<b>Naftoquinonas</b>	atavaquona

Cada país, inclusive o Brasil, tem um protocolo de tratar a Malária. A OMS recomenda em seu protocolo atualizado de 2018, para tratamento da malária branda ou não complicada causada pelo parasito *P. falciparum* a utilização de terapia combinada à base de artemisinina (ACT), sendo esta terapia adotada como de primeira linha pelos países endêmicos de *P. falciparum*. Os derivados de Artemisinina (ACTs) são os últimos anti malários introduzidos no mercado.

O tratamento da malária, particularmente o de *P. falciparum*, foi revolucionado pela introdução dos derivados de artemisinina na década de 1990, um grupo de compostos semissintéticos produzidos a partir de Qinghao (artemisinina), um produto natural da planta

*Artemisia annua*. As artemisininas são rapidamente eficazes, seguras e bem toleradas. Sua descoberta pelo Projeto 523 da China foi reconhecida pela atribuição do Prêmio Nobel 2015 a Tu Youyou (ASHLEY et al., 2014).

Grupos-alvo para quimioprofilaxia são mulheres grávidas, crianças pequenas e viajantes. A terapia preventiva intermitente na gravidez (IPTp) e lactentes tem sido lenta em muitas áreas e seu impacto é ameaçado pela resistência à sulfadoxina-pirimetamina. O uso de antimaláricos alternativos, como a diidroartemisinina-piperaquina, está sendo avaliado (RADEVA et al., 2014).

Para prevenir a malária em viajantes, a escolha da quimioprofilaxia deve considerar os riscos de malária e resistência a fármacos, que devem ser equilibrados com o risco de toxicidade por fármacos. Atovaquona-proguanil e doxiciclina são prescritos como profilaxia freqüentemente. Mequine semanalmente em doses profiláticas é uma opção conveniente, mas impopular devido a preocupações com a neurotoxicidade (KOLIFARHOOD et al., 2017).

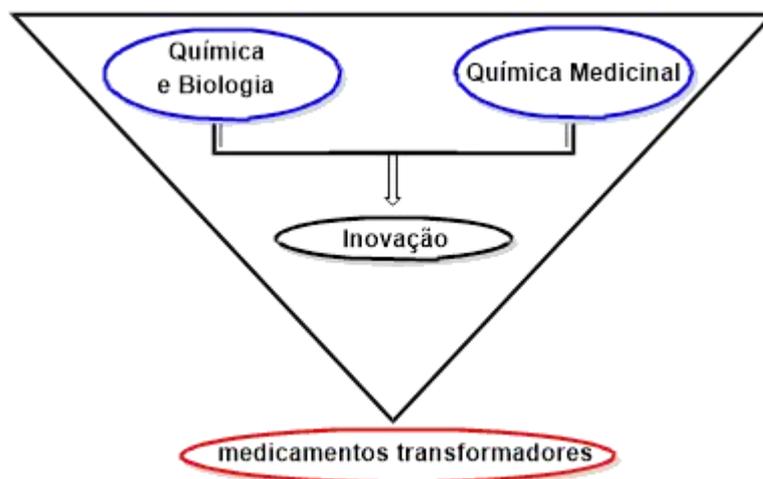
### 2.3. QUÍMICA MEDICINAL

Embora uma série de fármacos anticancerígenos e antimaláricos seja conhecida, a maioria deles não conseguiu produzir o resultado desejado, devido à baixa seletividade, menor eficácia, mais efeitos colaterais e resistência a múltiplos fármacos (ASHLEY et al., 2018; RANA et al., 2015). Nesse contexto, são necessárias abordagens inovadoras e desenvolvimento de novos compostos químicos, bioativos no combate as patologias

A química medicinal surgiu com o objetivo de descobrir novas moléculas bioativas, também chamadas de entidades químicas, e a interpretação dos mecanismos de ação a nível molecular, bem como a construção das relações existentes entre a estrutura química dos fármacos e suas respectivas atividades farmacológicas (RANA et al., 2015) (PLOWRIGHT et al., 2017).

Em parceria com outras disciplinas, como a biologia, farmácia, bioquímica, química molecular, química quântica, fisiologia, patologia e todos os recentes avanços tecnológicos, formando um caráter multidisciplinar, estão sendo criadas oportunidades inovadoras cada vez maiores para aprimorar o conhecimento dos pesquisadores acerca de sistemas biológicos e como estes se relacionam com as patologias (Figura 4) (PLOWRIGHT et al., 2017).

**Figura 4.** Interdisciplinaridade inovadora que transforma medicamentos (PLOWRIGHT et al.,2017).



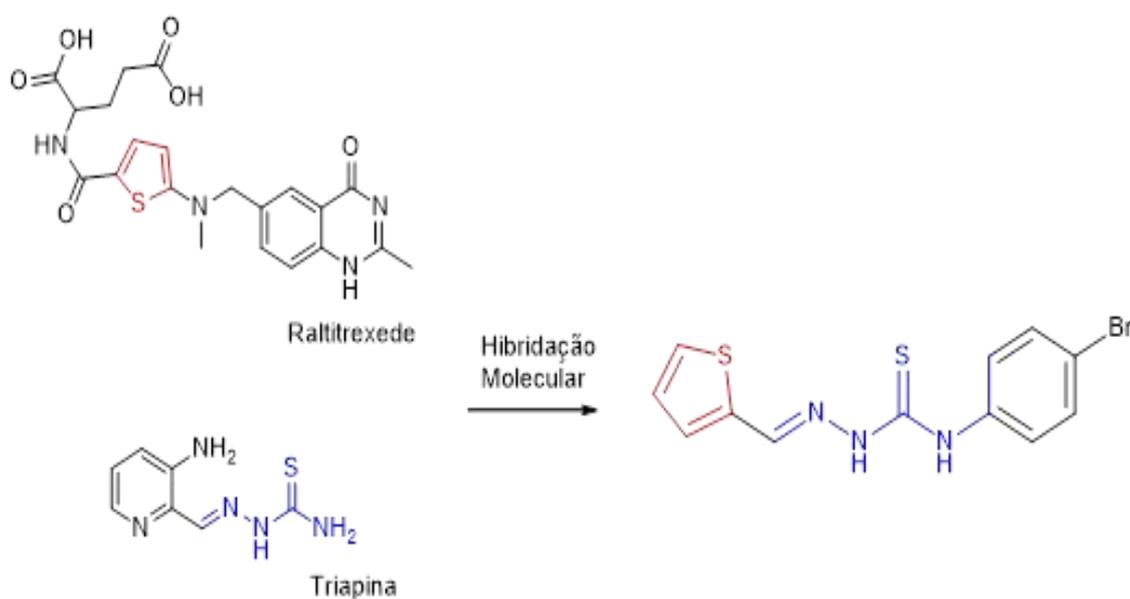
Assim, as terapias baseadas em escolhas de alvos biológicos, e todo o conhecimento estrutural desses alvos, bem como os processos patológicos e/ou fisiológicos envolvidos, têm sido empregadas como estratégias para a construção da arquitetura molecular do novo composto protótipo, que possa ser candidato a um novo fármaco. Diante disso, o bioisosterismo, a hibridação molecular, um termo estudado em química medicinal, baseada na junção de fármacos distintos ou grupos farmacofóricos distintos, com dois ou mais domínios estruturais e com funções/atividades biológicas diferentes, é um dos métodos empregados no planejamento dos compostos alvos. Em ambos os casos, a nova molécula produzida por hibridação molecular passa a ser chamada de híbrido, o qual frequentemente apresenta maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem (BARREIRO et al., 2002).

Como o câncer tem uma abordagem de estruturas combinadas pode ser imaginado com múltiplos modos de ação para pesquisar novos fármacos mais eficientes, com a possibilidade de atingir múltiplos alvos biológicos (TAHA et al., 2017).

Nessa perspectiva, a síntese de um composto protótipo ou o desenvolvimento de agentes antitumorais, que possa ter atividade de interação com vários alvos biológicos, tem sido trabalho constante nos centros de pesquisa no sentido de desenvolver novos fármacos de menor custo e mais seguros. Esse cenário, na busca de uma molécula líder, é uma das metas do nosso Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – GPIT/UFPE, através de várias classes de moléculas orgânicas Indol, Tiossemicarbazonas, Benzodioxol, acridinas, espiro-acridinas entre outras.

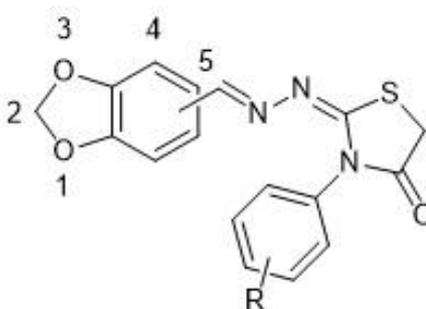
Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou uma nova entidade química proveniente da hibridação molecular entre a tiossemicarbazona, presente na estrutura do fármaco antitumoral Triapina® e o núcleo tiofeno, farmacóforo do antineoplásico Raltitrexede, obtendo o derivado tiofeno-2-tiossemicarbazona (*Figura 5*). Este híbrido apresentou atividade antitumoral *in vivo* e citostática revelando-se um composto promissor candidato a fármaco anticâncer (OLIVEIRA et al., 2017).

**Figura 5** - Estrutura química do derivado tiofeno- tiossemicarbazona obtido por hibridação molecular. (OLIVEIRA et al. 2015)



Outro trabalho do grupo por hibridação molecular demonstra um derivado benzodioxol, como potencial inibidor parasitário, e que poderá ser candidato a fármaco esquistossomose (SILVA et al.. 2018) (*Figura 6*).

**Figura 6.** Estrutura química do derivado benzodioxol com propriedade antiparasitária ((Silva, L. M. *et al.* 2018).



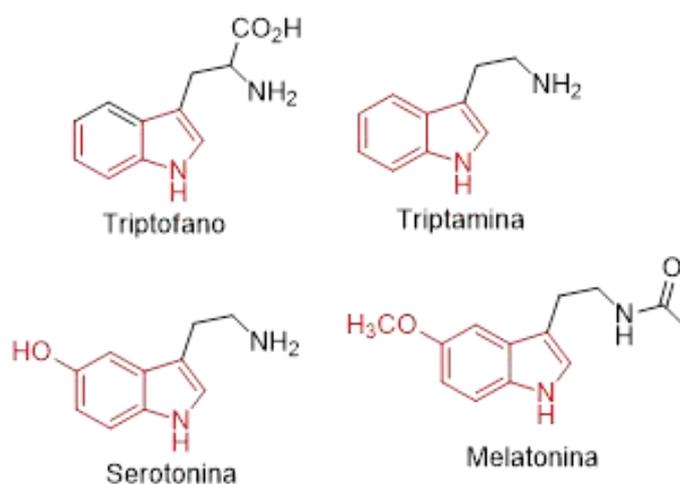
Outras estratégias fundamentadas no conhecimento das estruturas dos alvos moleculares ou dos complexos ligante-receptor permitem o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor - SBDD, do inglês “structure-based drug design”. Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante - LBDD, do inglês “ligand-based drug design” podem ser utilizados. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode fornecer informações úteis no planejamento de nova entidade química, por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (GUIDO et al., 2010; ANDRICOPULO et al., 2009).

#### 2.4. DERIVADOS INDÓLICOS

O indol é um heterocíclico aromático constituído por um anel benzeno ligado a um anel pirrol. Este composto orgânico é predominantemente encontrado em produtos naturais de várias plantas e está presente em muitos compostos biologicamente ativos (PAVLIDIS, 2003). São os compostos heterocíclicos com importância medicinal mais distribuídos na natureza (*Figura 7*). Como por exemplos (a) o triptofano, aminoácido essencial que compõe a maior parte das proteínas, e também é precursor biossintético para vários metabólitos secundários contendo 2,3-di-hidro-indol-triptamina, (b) Em animais, a serotonina (5-hidroxi-triptamina), um neurotransmissor atuante dos sistemas nervoso, cardiovascular e gastrointestinal e (c) O hormônio melatonina que age controlando o ritmo diurno das funções fisiológicas. Além disso, os indóis possuem a propriedade de mimetizar estruturas peptídicas e assim interagirem reversivelmente com as enzimas, de modo a proporcionar oportunidades para descobertas de

novos fármacos com diferentes modos de ação (KAUSHIK et al., 2013; KAUSHIK et al., 2013).

**Figura 7.** Compostos naturais contendo indol. (KAUSHI et al. (2013)



O Indol foi identificado por Baeyer et al. em 1860 ganhando, ao longo do tempo, popularidade como um grupo farmacóforo importante em numerosos alvos biológicos.

Nesta perspectiva farmacológica dos indóis, temos disponíveis os fármacos antitumorais inibidores da polimerização da tubulina obtidos a partir de produtos naturais ou por semi-síntese. Em 1965, os fármacos vincristina e vinblastina, derivados do *Catharantus roseus*, foram os primeiros reconhecidos e estão entre os agentes inibidores da polimerização da tubulina mais antigos utilizados na clínica. Muitos esforços são realizados para identificar novos derivados do alcalóide da vinca mais ativos e menos citotóxicos. Entre os compostos sintetizados, a vindesina e vinorelbina têm sido aplicados na terapêutica do câncer (DUFLOS et al., 2002).

Outro derivado indólico bioativo é o antineoplásico elipticina (Figura 8) que possui o mecanismo de ação baseado principalmente na intercalação do DNA e/ou inibição da topoisomerase II. A elipticina se liga a Topo II e ao complexo de DNA-Topo II na sua forma desprotonada, em contraste com sua forma protonada intercaladora do DNA. A inibição da Topo II está associada com quebras no DNA induzidas por este fármaco (CANALS et al., 2005).

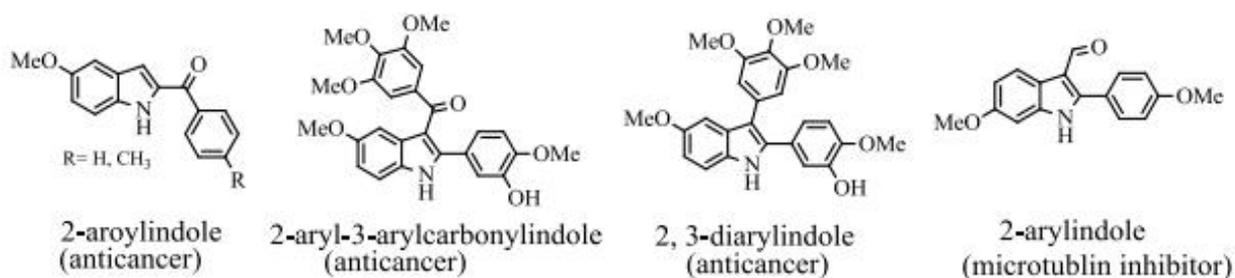
**Figura 8.** Estrutura química do agente anticâncer elipticina. (AVEDANO; MENEDEZ 2015).



Os agentes anticancerígenos indólicos foram tradicionalmente avaliados quanto à sua ação indutora de apoptose, onde demonstraram inibir a proliferação, crescimento e invasão de células tumorais humanas, um fator importante para os processos de crescimento celular, invasão e metástase. Esses compostos inibem a sinalização da progressão normal do ciclo celular (G2/M, inibidores de CK2, inibidores de Trk, inibidores da topoisomerase), induzem estresse oxidativo para células (geradores reativos de espécies de oxigênio), previnem a vascularização em tumores (inibidores da angiogênese) e o reparo do DNA (inibidores de PARP, inibidores de CK2)(SHERER et al., 2015).

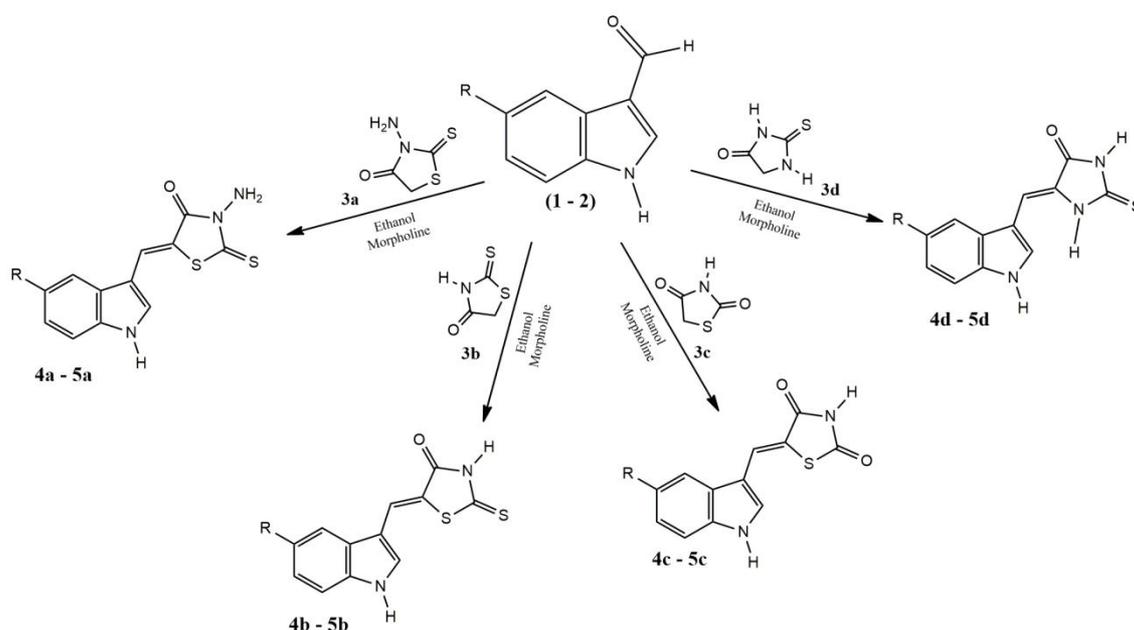
O indol tem um interesse particular justamente pela capacidade de sensibilizar as células cancerígenas. Estudos mostraram que a quimioterapia combinada com composto indol pode ser aplicada em menor dose e com maior eficácia. O indol também apresentou aumento de sensibilidade das células do câncer na terapia de radiação. O melhor desse trabalho foi que, apesar de ser esperado um efeito tóxico na terapia combinada, isso não aconteceu. Acredita-se cada vez mais que compostos indólicos induzem a apoptose em células cancerosas humanas, sem causar toxicidade indesejada em células normais(AHMAD et al., 2011). Alguns derivados indólicos e compostos heterocíclicos relacionados foram identificados como moléculas bioativas (Figura 9).

**Figura 9.** Derivados indólicos com promissoras atividades antitumorais. (AHMAD et al.,2011).



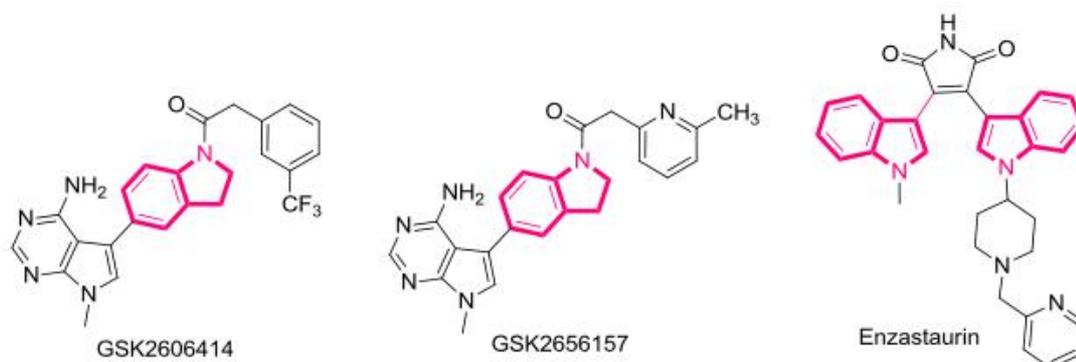
tiazolidinas, e anéis de imidazolidina condensados como cadeias laterais. O grupo verificou como o núcleo indol contribui na interação com a molécula de DNA, podendo ser compostos promissores para atividade antitumoral (*Figura 10*) (LAFAYETTE et al., 2017).

**Figura 10.** Derivados indólicos com atividades de ligação com ao DNA e inibição da enzima topoisomerase (LAFAYETTE et al., 2017).



Vários fármacos derivados do indol estão em testes clínicos para terapia de diversos tipos de câncer, como: o tratamento de linfoma, câncer de mama, câncer de próstata, leucemia, câncer colorretal, câncer de ovário, carcinoma de células renais e câncer de pâncreas (*Figura 11*). O GSK2656157 é um novo fármaco que atua na proteína quinase R (PRK), como inibidores de ER quinase (PERK) que estão implicados na proliferação e diferenciação celular. A estrutura do GSK2606414 mostra que NH<sub>2</sub> do pirrol e da pirimidina interage com o aminoácido Gln888, enquanto o nitrogênio forma ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Cys890. Enzastaurin, por sua vez, é um inibidor da proteína quinase C beta (PKC $\beta$ ) com atividade antineoplásica (CHADHA et al., 2017).

**Figura 11.** Novos fármacos indólicos que estão em testes clínicos (CHADHA et al.,2017).

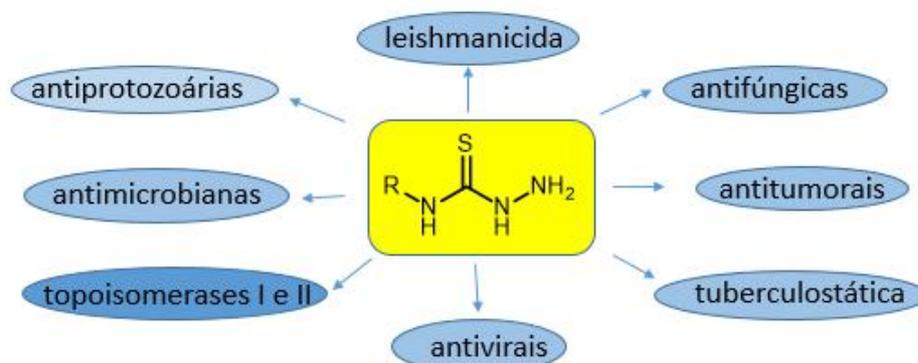


O grupamento indol atua como base fraca e protona apenas na presença de ácidos fortes. A maior densidade de elétrons está localizada na terceira posição do núcleo e é a porção mais reativa para a substituição eletrofílica. O grupo NH favorece uma pequena natureza ácida, tornando suscetível a reações de substituição de N nas condições básicas (CHADHA et al., 2017). O indol é, de longe, um dos mais populares andaimes heterocíclicos na natureza. As arquiteturas moleculares intrigantes e desafiadoras dos compostos indólicos policíclicos e naturais constituem um estímulo contínuo para o desenvolvimento na síntese orgânica (LAFAYETTE et al., 2017).

## 2.5. DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS

De acordo com a literatura, a tiossemicarbazona é um composto molecular importante, pois possui diversas propriedades farmacológicas. As tiossemicarbazonas constituem um grupo de moléculas cujas propriedades biológicas têm sido investigadas há muito tempo (GINGRAS et al.,1960) Fato que permitiu identificar nos derivados tiossemicarbazônicos diversas atividades biológicas tais como propriedades antivirais (ZANG et al., 2015;), antiparasitária(BHARTI et al., 2002), tuberculostática(OLIVEIRA et al., 2017), antitumorais(MARTIN et al., 2017; POMMIER et al., 2010), antimicrobianas (HUSAIN et al., 2007), antifúngicas(DA SILVA et al., 2017) e que atuam nas topoisomerases I e II(YALOWICH et al., 2012). Logo, esse grupo de moléculas surge como perspectivas de novos fármacos podendo, assim, contribuir nos estudos para a descoberta de compostos potencialmente bioativos (Figura 12).

**Figura 12.** Atividades biológicas das tiossemicarbazonas.



Segundo Tenório *et al.* (2005), as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica,  $C=N-NH-CS-NH_2$ , planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina. São obtidas pela reação de condensação quimiosseletiva com aldeídos e/ou cetonas. Devido às suas propriedades para formarem complexos organometálicos (ligam-se a íons cobre e ferro dos compostos biológicos), podem apresentar-se como agentes quelantes, graças ao núcleo funcional baseado em tiureia (TENÓRIO *et al.*, 2005).

Devido a esta característica de agente quelantes, as tiossemicarbazonas estão sendo estudadas com grande interesse em busca de novos fármacos com alta eficácia e baixos efeitos colaterais, que possam se aliar no combate ao câncer. A triapina (3-AP) é um derivado de tiossemicarbazona, que possui atividade antitumoral devido à sua característica de inibir a atividade da enzima ribonucleotídeo redutase, essencial para a construção do DNA. O composto impede o ciclo celular na fase G2/M e induz a apoptose das células cancerosas (WANG *et al.*, 2017).

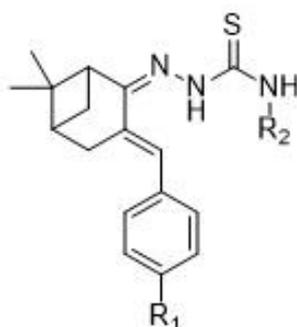
Algumas tiossemicarbazonas são relatadas por possuírem atividade frente à essa enzima, tais como a 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona, 2-formilpiridina tiossemicarbazona e 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (Triapina®). Essa inibição pode se dar de maneira direta, através da ligação da tiossemicarbazona com o ferro no sítio ativo, essencial ao funcionamento enzimático ou devido ao complexo tiossemicarbazona-ferro formado resultar na destruição dos radicais tirosila (WANG *et al.*, 2017).

Dentre as tiossemicarbazonas citadas, a Triapina se destaca por se encontrar em estudos avançados de fase clínica II e por apresentar atividade confirmada em uma grande variedade de modelos tumorais (GALSKY et al., 2015).

No trabalho publicado por Wangshu Yu (2013), mostrou-se que a característica da tiossemicarbazona de se ligar a moléculas biológicas pode ser estudada também com a proteína albumina, uma vez que esta proteína é um importante regulador de fluxos intercelulares e comportamento farmacocinético de muitos medicamentos. A albumina contém resíduos de triptofano que são responsáveis pela fluorescência, e o contato com derivados de tiossemicarbazona pode mudar o microambiente desses resíduos de triptofano, o que pode gerar mudanças na intensidade de fluorescência intrínseca da proteína, isto caracteriza a interação.

Em trabalhos publicados por Wang *et al.* (2017), foram sintetizados derivados tiossemicarbazona, sendo que o composto com  $R_1 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 =$  apresentou melhor atividade frente às linhagens de células tumorais adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), hepatocarcinoma (SMMC-7721) e câncer cervical (Hela) (WANG et al., 2017). O derivado em discussão atua inibindo o ciclo celular na fase G2/M e induz a apoptose das células cancerosas, produzindo um dano irreversível ao DNA, levando a apoptose celular.

**Figura 13.** Estrutura química do derivado tiossemicarbazona com atividade antitumoral (WANG et al 2017)



As investigações das relações estrutura-atividade em derivados tiossemicarbazona tem despertado interesse na área científica, e a melhoria de sua atividade biológica, associada a inserções de grupos farmacofóricos que também tenham atividade biológica é extremamente importante para fortalecer a síntese de novos compostos.

## 2.6. INTERAÇÃO COM O DNA

A replicação do DNA por organismos vivos requer ordem e controle para assegurar a transmissão correta de todas as informações codificadas por ácidos nucleicos de uma geração para a próxima (SOLIER et al.,2012).

A instabilidade do genoma é uma marca registrada dos processos de câncer e envelhecimento. Além das respostas autônomas celulares, sabe-se que o dano do DNA também provoca mecanismos sistêmicos destinados a favorecer a sobrevivência e a depuração das células danificadas (SORIA-VALLES et al., 2017).

Os processos de danos ao DNA acontecem devido ao constante processo de duplicação. Esse processo pode impedir a replicação e transcrição do genoma de forma correta caso não sejam reparadas, levando assim mutações ou aberrações que por sua vez podem afetar inclusive a viabilidade da célula (SIRAJUDDIN et al.,2013).

Algumas aberrações/mutações de DNA surgem através de processos fisiológicos, tais como desajustes de DNA ocasionalmente introduzidos durante a replicação dessa molécula e rupturas de cadeia de DNA causadas pela topoisomerase I e a atividade da topoisomerase II. Além disso, as reações hidrolíticas e as metilações não enzimáticas geram milhares de lesões de base de DNA por célula por dia. O dano do DNA também é produzido por compostos oxigenados reativos que surgem como subprodutos da respiração oxidativa ou através de eventos de ciclagem redox envolvendo agentes tóxicos ambientais e reações de Fenton mediadas por metais pesados (JACKSON et al., 2009).

No câncer, o que acontece é justamente um dano irreparável ao genoma/DNA. Para Vogelstein *et al.* (2004) o câncer é uma doença genética. Ele diz que para haver câncer deve haver alterações em três tipos de genes, responsáveis pela tumorigênese: oncogenes, genes supressores de tumores e genes de estabilidade, que estão diretamente associados a replicação e transcrição do DNA.

Assim, com o conhecimento estabelecido dessa macromolécula, responsável pela transmissão da informação genética, o DNA tem sido um alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos, pois ele oferece vários sítios de ligação para uma variedade de moléculas. A interação de ligação entre moléculas externas e ácidos nucleicos freqüentemente leva a uma mudança significativa em suas estruturas e pode ter uma influência importante em suas funções fisiológicas (IHMELS; OTTO, 2005).

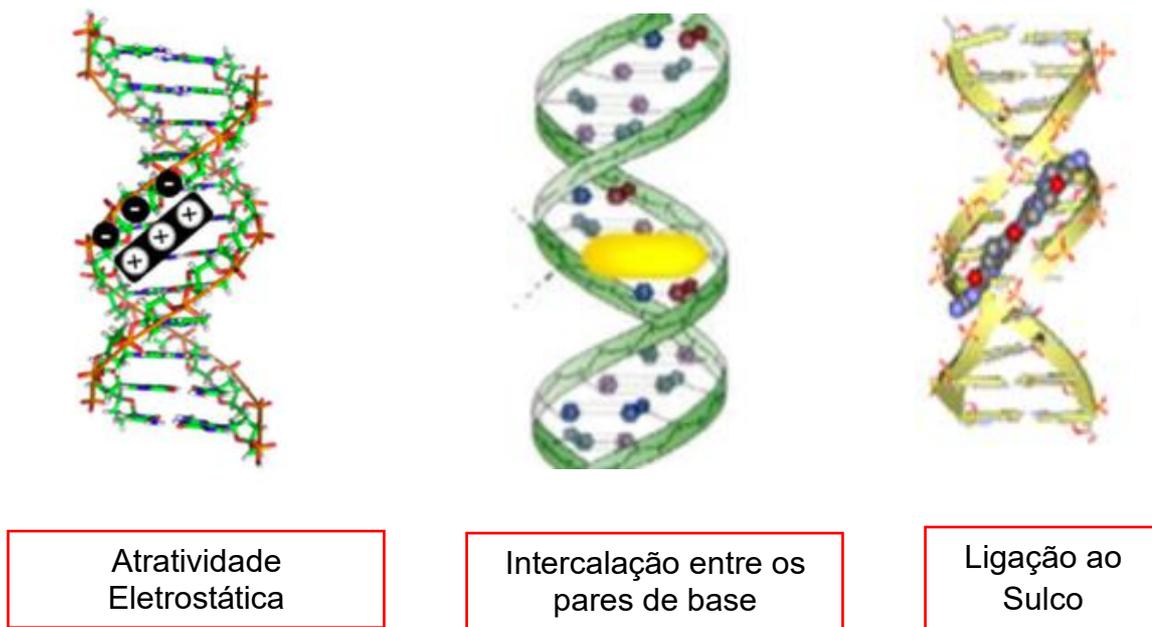
Os estudos de interação de moléculas de fármaco com DNA tornaram-se uma vasta

área de pesquisa ativa nos últimos anos. Esses estudos podem ajudar muito a compreender as interações fármacos-DNA e o design de medicamentos novos e promissores para uso clínico.

Muitos fármacos anticancerígenos e citotóxicos são conhecidos por interagir com DNA para desenvolver suas atividades biológicas. Compreender como os compostos moleculares interagem com o DNA tornou-se uma área de pesquisa ativa na interface entre química, biologia molecular e medicina. Essa interação fármaco-DNA representa uma importância peculiar nos estudos farmacológicos, uma vez que se pode determinar os mecanismos de ação da droga e possibilitar concepção de medicamentos mais eficazes, específicos para o tipo tumoral, por exemplo, e que apresente os menores efeitos colaterais (BERA et al., 2008).

Os fármacos anticancerígenos de ação de DNA podem ser classificados em três categorias: (I) se ligam ao DNA através de ligações covalentes. Em uma ligação covalente, a parte ativa de uma molécula se liga covalentemente a uma base de nitrogênio de DNA, como guanina; (II) fármacos que formam complexos não covalentes com DNA, seja por atração eletrostática, intercalação entre os pares de bases, e ligação ao sulco (Figura 14)(BERA, et al., 2008; LAFAYETTE et al., 2017), e (III) aqueles pertencem a medicamentos específicos com propriedade de clivagem da estrutura do DNA (HANNON, 2007).

**Figura 14.** Interação de moléculas ao DNA. (SIRAJUDDIN et al.2013; ALMEIDA et al., 2017)



### 2.6.1. Ligação de Intercalação

A ligação de intercalação é mais forte, ocorre quando uma molécula aromática é intercalada entre os pares de bases do DNA. As ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento  $\pi$  entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do agente intercalador contribuem para a estabilização do complexo intercalador-DNA (HANNON, 2007). Quando um intercalador é inserido entre as bases do DNA, ocorre uma mudança na estrutura desta biomacromolécula, e com isso provoca um alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice do DNA, isto faz com que o esqueleto do DNA perca a sua estrutura helicoidal. Os grupos açúcar-fosfato são alterados para acomodar o agente intercalados (compostos aromáticos), causando uma separação dos pares de bases. Essas modificações provocadas no esqueleto do DNA provavelmente impedem a replicação do DNA, causando como resultado a inibição do crescimento tumoral e posteriormente a morte celular.

Por este motivo, este modo de ligação entre os fármacos e o DNA está diretamente relacionada com a capacidade antitumoral de muitos agentes anticâncer (ALMEIDA et al., 2017). Alguns fármacos aprovados pela FDA são agentes intercaladores do DNA, e utilizados na clínica como antitumorais, como por exemplo: a doxorubicina, a mitoxantrona e a ansacrina. Segundo Larsen *et al.* (1998) esses agentes atuam como inibidores da enzima Topoisomerase II, resultando em morte celular via apoptose.

Bons agentes intercaladores de DNA, a exemplos dos compostos heterocíclicos, apresentam em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio, são utilizados no tratamento quimioterápico para inibir a replicação de DNA em células do câncer em rápido crescimento (EBAHIMI et al., 2013).

Constates de ligação para intercalação estão no intervalo de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> (PLSIKOVA et al., 2012).

### 2.6.2. Ligação ao Sulco

A dupla hélice do DNA possui dois sulcos de tamanhos diferentes (maior e menor), que podem servir como locais de ligação de moléculas. As proteínas são conhecidas por se ligarem aos sulcos maiores, enquanto que moléculas pequenas são ligantes se ligam ao sulco menor e poucos compostos chegaram até os ensaios clínicos<sup>98</sup>. Os ligantes de sulco menor são

uma grande família de compostos chamados lexitropsinas que se ligam ao sulco menor do DNA (KHALAF et al., 2016).

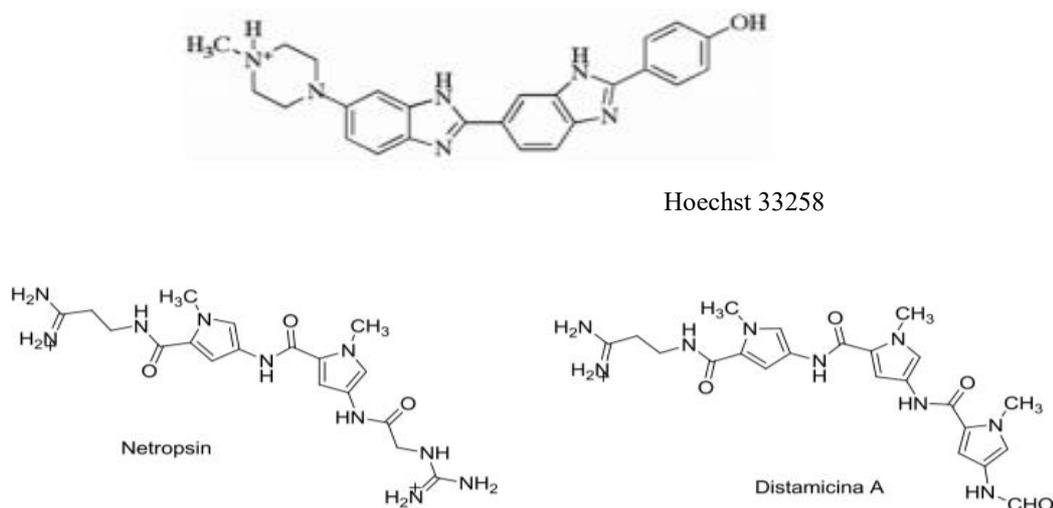
De acordo com Khalaf *et al.* (2016) essa ligação de sulco menor é interessante, pois é fortemente endotérmica e, portanto, impulsionada entropicamente, em contraste com a intercalação, para a qual a contribuição entálpica geralmente domina. Quando um ligante é ligado no sulco menor do DNA, ele pode interagir com proteínas de ligação do sulco menor necessárias para a expressão gênica.

Os fármacos Netropsina, Distamicina, como agentes antivirais, e o antitumoral Hoechst 33258 (*Figura* ) exercem seus efeitos biológicos através da ligação não covalente a regiões ricas em AT(adenina-timina) no sulco menor do DNA. Porém outros ligantes preferem áreas do sulco rico em GC (guanina-citosina)(HURLEY et al., 2002).

Os aglutinantes de sulcos geralmente consistem em pelo menos dois anéis aromáticos ou heteroaromáticos cuja conexão permite flexibilidade conformacional de tal forma que uma conformação em forma de crescente pode ser alcançada e a molécula se encaixa perfeitamente no sulco. Além disso, grupos funcionais são obrigados a formar pontes de hidrogênio com as bases nucleicas no fundo do sulco(IHMELS; OTTO, 2005).

A estrutura do fármaco antitumoral Hoechst 33258 é típica para um ligante de sulco menor. A molécula é em forma de crescente e consiste em anéis aromáticos hidrofóbicos planos, criando um ajuste confortável entre as paredes de açúcar bastante hidrofóbicas no sulco menor (*Figura 15*). Esta conformação sobretudo não ocasionam grandes mudanças na conformação da molécula de DNA, diferentemente do que ocorre na intercalação (FORNANDER et al., 2013).

**Figura 15.** Estrutura química das moléculas que se ligam ao sulco do DNA.



Para observar a capacidade dos compostos químicos de se interligar ao DNA, pode-se utilizar a constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ), uma medida quantitativa da interação entre os compostos orgânicos e o DNA (LAFAYETTE et al., 2007). Essas constantes são obtidas a partir das titulações resultantes das análises espectrais de absorção UV-vis e fluorescências, onde os compostos são colocados em solução na presença de quantidades de DNA. O valor é utilizado para comparar moléculas de estruturas diferentes bem como para indicar os meios de ligação ao DNA.

O  $K_b$  para os ligantes ao sulco varia de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  <sup>97</sup>.

Na opinião de Asaadi e Hajian (2017), técnicas como espectrometria UV-VIS, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, voltametria, difração de raio X e medidas de viscosidade dinâmicas são escolhidas para estudar a interação do DNA com vários tipos de moléculas orgânicas, pois além de sensíveis e fáceis, possuem um curto tempo de análise. Portanto, eles são os mais utilizados nesse tipo de estudo de interação.

## 2.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO DNA

Dentro do espectro visível, a luz vermelha tem um comprimento de onda mais longo e de maior energia que a luz azul. A medida que os compostos absorvem luz ultravioleta, excitam seus elétrons presentes dentro da molécula, passando de um nível e de menor energia para outro de uma energia mais excitada. Portanto, absorbância depende da estrutura molecular. A luz que não é absorvida é transmitida (GALLAGHER, 2011).

Para Chen *et al.* (2008), a espectroscopia de absorção é uma das técnicas mais utilizadas para estudos de interação com a molécula de DNA. As interações fármaco-DNA podem ser estudadas por comparação dos espectros de absorção UV-Visível dos complexos fármaco livre e fármaco-DNA, que geralmente são diferentes.

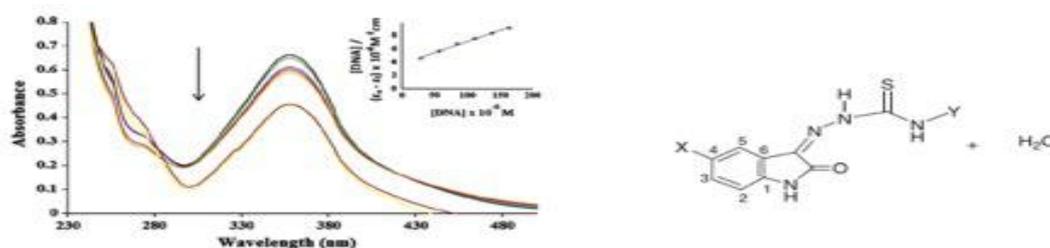
O espectro de absorção UV-Visível do DNA apresenta uma banda entre 200-350nm, com absorção máxima por volta de ~260nm. Essa absorção máxima acontece devido aos grupos cromóforos nas porções purina (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e timina), responsáveis pelas transições eletrônicas. Existe uma alta probabilidade dessas transições, por isso a absorção molar é de ordem de  $10^4$ .

Quando acontece intercalação com o DNA geralmente resulta em efeito hipocrômico (diminuição do valor do coeficiente de extinção molar) nos espectros de absorção UV-visível e mudança para um comprimento de onda mais longo, para a região do vermelho (efeito

batocrômico), envolvendo uma forte interação de empilhamento de elétrons entre um cromóforo aromático e os pares de bases do DNA. Espera-se que a força dessa interação de elétrons diminua à medida que o cubo da distância entre o cromóforo e as bases de DNA diminui. Ao diminuir a distância entre o composto intercalado (fármaco) e as bases de DNA, o hipocromismo ocorre aparentemente. Isso acontece devido a combinação de elétrons  $\pi$  dos compostos e os elétrons  $\pi$  das bases do DNA. Conseqüentemente, o nível de energia da transição de elétrons  $\pi - \pi$  diminui, o que causa uma mudança vermelha (SIRAJUDDIN; BADSHAH, 2013).

O hipocromismo surge da contração do ctDNA (timo do bezerro) no eixo da hélice, bem como das mudanças conformacionais. Resultados similares foram publicados por Ali *et al.* (2014) com derivados Isatin Tiossemicarbazona (*Figura 16*).

**Figura 16.** Derivados isatin tiossemicarbazona mostrando hipocromismo. (Ali *et al.* (2014))

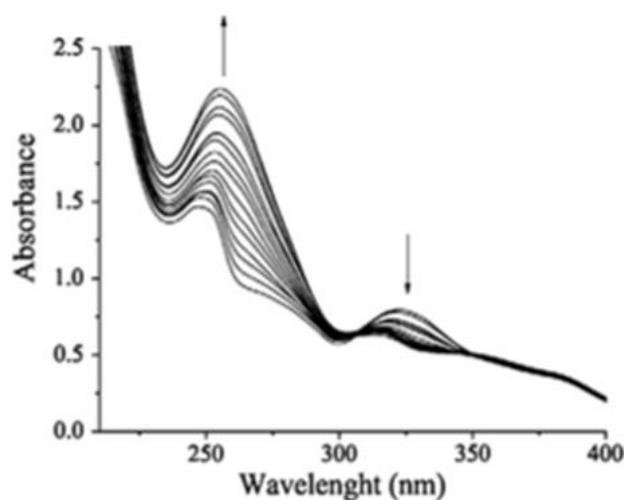


Por outro lado, pode ocorrer também o efeito hiperchromismo ( ) ao aumentar ou diminuir a concentração do DNA, que resulta de dano secundário da estrutura de dupla hélice de DNA. A extensão do hiperchromismo é indicativa de modos atração eletrostática entre o composto e o DNA. Isso reflete alterações na estrutura conformacional do DNA após a formação do complexo (DNA-Fármaco) ter sido formado (ESHKOURFU *et al.*, 2011). O efeito hiperchromico ocorre devido ao aumento da absorção do DNA após a desnaturação.

Quando a dupla hélice do DNA entra em contato com agentes desnaturantes, a força de interação que mantém a estrutura é desconectada, diminuindo a interação entre os pares de base da molécula, aumentando a absorção de luz UV da solução do DNA. A dupla hélice é separada em cadeias simples, e a absorção de luz de cadeia simples será maior 40% do que a do DNA de cadeia dupla na mesma concentração. O efeito hiperchromico também pode

ocorrer devido a presença de cátions que se ligam ao DNA através de atração eletrostática entre o grupo fosfato presente no DNA, causando assim danos gerais à estrutura do DNA.

**Figura 17.** Mostra o efeito hipercrômico. ( ESHKOURFUL et al 2011; ALI et al. 2014)



## 2.8. ALBUMINA

A albumina sérica humana (HSA) (*Figura* ) é a proteína encontrada em maior quantidade e abundância no plasma humano (40 mg/mL), representa 50% do total das proteínas sanguíneas. No organismo, ela está relacionada com diversas funções biológicas, dentre as quais, e em maior destaque, o transporte de muitos compostos endógenos e exógenos, como o transporte de fármacos, esteróides, ácidos graxos e hormônios da tireóide

A albumina vem sendo estudada por cientistas há mais de 40 anos. Um dos principais alvos dos estudos é o seu poder de ligação a uma grande variedade de substâncias. Nesse contexto, podemos identificar que farmacocinética e a farmacodinâmica de vários fármacos é muito afetada no sistema humano por suas interações com essa proteína plasmática, pois a biodisponibilidade, distribuição e metabolismo de compostos biologicamente ativos no corpo estão intimamente relacionados as suas afinidades para se ligar às proteínas de transporte na circulação sanguínea dos mamíferos(MARKOVIC et al., 2018).

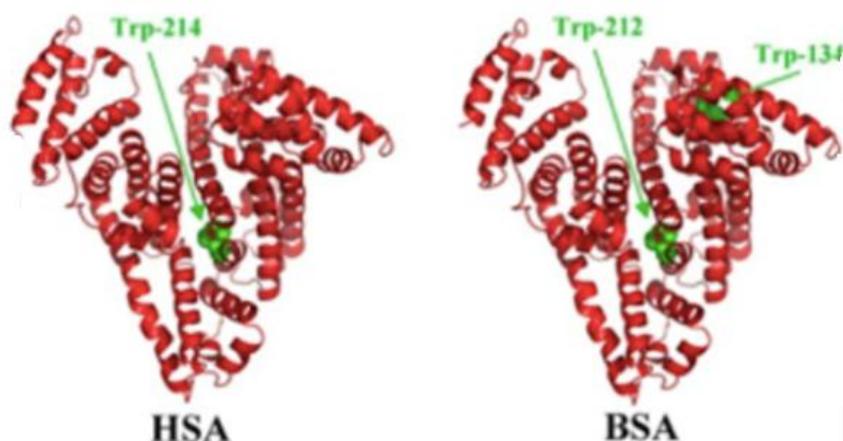
A estrutura molecular da proteína plasmática pode ser modificada quando conectada a compostos orgânicos sintetizados. Por isso, é importante estudar a relação da proteína e os seus ligantes para compreender como agem as novas moléculas no organismo humano. Essa

característica configura o papel de destaque nos estudos de interação fármaco-proteína (WANG et al., 2017) e, portanto, os seus efeitos terapêuticos.

A HSA é organizada em domínios (I, II e III) e subdomínios A e B, composta por uma única cadeia polipeptídica não glicosilada. Possui em sua sequência 585 resíduos de aminoácidos (66 kDa), sendo 17 de tirosina e 1 fragmento de triptofano (Trp-214), e 35 resíduos de cisteína (Cys). Possui um tiol, livre Cys34, constituindo quase 80% de todos os grupos tióis no plasma. O Cys-34 está localizado no subdomínio IA, por este motivo é provável que tenha um papel importante na vinculação de fármacos. As interseções entre domínios e subdomínios contribuem significativamente para a estabilidade da molécula de HSA. Os fármacos que se ligam à HSA com grande afinidade, geralmente interagem com um ou 2 sítios específicos da proteína (MACIAZEK et al., 2018).

A proteína do soro bovino (BSA) (*Figura* ) é a albumina extraída do soro bovino disponível no mercado e é muito utilizada em estudos biológicos em laboratório devido à sua estabilidade, disponibilidade, baixo custo e especialmente por ser muito similar à HSA (*Figura* ), graças a sua semelhança estrutural – 80% em relação a sequência homóloga e 76% em similaridade estrutural. A BSA é constituída por 582 aminoácidos, 20 grupos de tirosina e dois fragmentos de triptofano, Trp-134 e Trp-212 (BELATIK et al., 2012; KUDARHA et al., 2017).

**Figura 18.** Estruturas tridimensionais de HSA e BSA com resíduos de triptofano em cor verde. ( BELATIK *et al.*201).



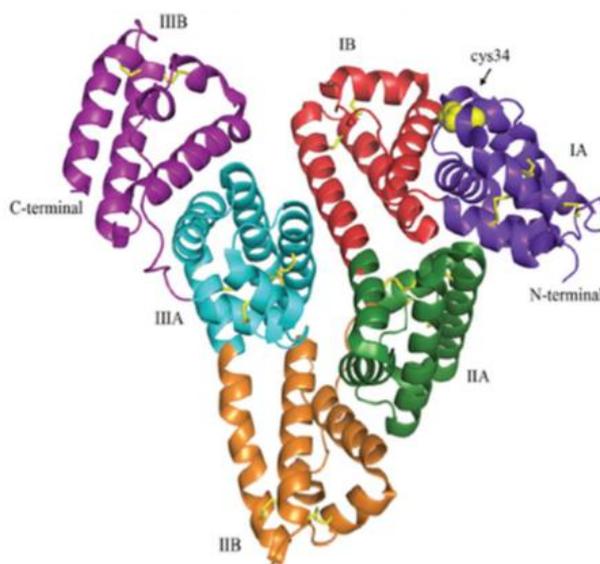
### 2.8.1. Sítios de ligação da BSA

Dois principais sítios de ligação de fármacos específicos são encontrados na molécula da Albumina, o sítio I e o sítio II (Figura 19). O sítio I localizado no subdomínio IIA e o sítio II no subdomínio IIIA) Estes locais de ligação são bolsos hidrofóbicos alongados com resíduos de aminoácidos catiônicos próximos de suas entradas(KUDARHA e SAWANT, 2017; SOSKIC e MAGNUS 2017).

**Sítios I (Sítio de Sudlow I)** – Situado no domínio IIA, possui uma região grande e flexível, acomoda e interagem com diversos ligantes, e é pouco seletiva. Ligantes fortemente vinculados: ácidos dicarboxílicos, moléculas heterocíclicas volumosas com cargas negativas.

**Sítio II (Sítio de Sudlow II)** – Localizado no domínio IIIA, possui uma cavidade em grande parte apolar, e uma parte polar dominante. Menor e mais estreito que o sítio I, é menos flexível e seletivo.

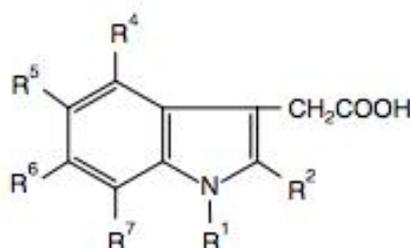
**Figura 19** - Estruturas tridimensionais de HSA e seus domínios. (KUDARHA et al. 2017)



Os ácidos dicarboxílicos e os compostos heterocíclicos volumosos com uma carga negativa se ligam principalmente ao sítio I de Sudlow, enquanto os pequenos ácidos carboxílicos aromáticos, como o ácido indol-3-acético (IAA), se ligam de preferência ao sítio II de Sudlow.

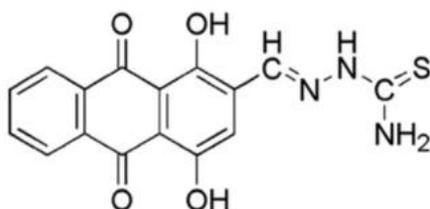
Nessa perspectiva de interação fármaco-proteína, os compostos indólicos tem sido estudado como potenciais ligantes à proteína albumina. No trabalho realizado por Soskic *et al.* (2007), foi testada a afinidade de ligação entre do hormônio vegetal ácido indol-3-acético (IAA)(Figura 20) e 34 de seus derivados substituídos em anel à HSA, como pró-fármacos contra células tumorais (SOSKIS e Magnus, 2007).

**Figura 20.** Estrutura Geral do derivado de ácido indol-3-acético(IAA). (SOSKIC E MAGNUS 2007)



Por sua vez, a Tiossemicarbazona, condensadas a derivados a aromáticos, hétero-aromáticos, alifáticos, carbaldeídos, é considerada como uma das moléculas importantes no desenvolvimento de protótipos promissores a fármacos antitumorais. No trabalho de Yu *et al.*, (2013), o 2-((1,4-di-hidroxi)-9,10-antraquinona) aldeído tiossemicarbazona (DHAQTS) (Figura 21) foi sintetizado como um novo fármaco e foi previamente examinado pelo Centro Nacional de Triagem de Fármacos.

**Figura 21.** Estrutura do DHAQTS. (YU *et al.* (2013)



Mais uma vez, a Proteína Albumina foi um receptor terapêutico escolhido para mostrar interações por forças hidrofóbicas com o composto sintetizado com porção tiossemicarbazona (DHAQTS).

Através de ensaios espectroscópicos de fluorescência e modelagem molecular foi mostrado uma reação de ligação entre o derivado DHAQTS e a Proteína albumina no sítio I (subdomínio IIA). Identifica que forças hidrofóbicas desempenham papel importante nessa

interação. Conclui-se, portanto, que de fato a albumina pode ser um importante carreador desse composto, e que este pode apresentar uma significância na farmacologia e prática clínica. Nesse sentido, o DHAQTS pode ser desenvolvido para uma nova droga tiossemicarbazona no futuro (YU et al., 2013).

A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta poderosa para o estudo da reatividade de sistemas químicos e biológicos (HU et al., 2005). É também um método simples e eficiente para prever o mecanismo de extinção de fluorescência que provavelmente ocorrerá quando a BSA entrar em contato com o composto (HEMALATHA et al., 2016).

## 2.9. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NA BSA

A ligação dos fármacos às proteínas é um parâmetro farmacocinético importante. Muitos métodos estão disponíveis para o estudo de fenômenos envolvendo a ligação de fármacos às proteínas plasmáticas ou teciduais. As interações que envolvem o deslocamento dos fármacos dos seus sítios de ligação do plasma ou do tecido foram relatadas como sendo os mecanismos causadores em muitas interações medicamentosas (MCELNAY e D'ARCY, 1986).

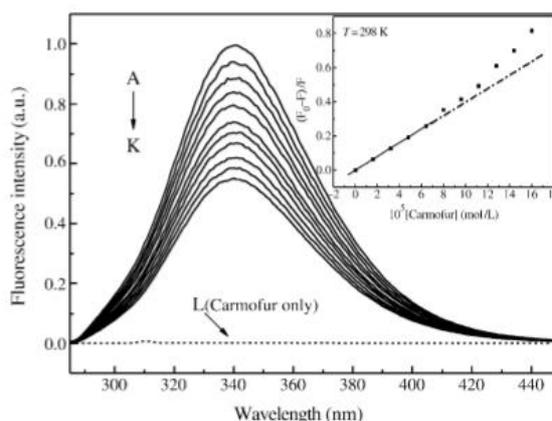
A albumina sérica frequentemente aumenta a solubilidade aparente de fármacos hidrofóbicos no plasma e modula a sua liberação para células *in vivo* e *in vitro*. Conseqüentemente, é importante estudar e compreender a interação de fármacos e pequenas moléculas bioativas com esta proteína (MCELNAY e D'ARCY, 1986).

A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta poderosa para estudos de ligação entre os fármacos e proteínas. As propriedades fluorescentes das proteínas acontecem principalmente devido aos aminoácidos, tais como resíduos de tirosina, fenilalanina e principalmente triptofano (HEMALATHA et al., 2016).

Muitas vezes a reação com os fármacos produzem uma extinção de fluorescência na proteína, procedimento conhecido por dois principais mecanismos, classificados como: (1) Extinção estática, que se origina da formação de um complexo de estado não fluorescente e (2) Extinção dinâmica, influenciada principalmente pelas interações moleculares como: reações do estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos, e a extinção ou diminuição da colisão entre as partículas (HU et al., 2005; VIKNESWARAN et al., 2016).

A diminuição da intensidade de colisão é conhecida pela equação de Stern-Volmer. A figura abaixo representa o espectro de fluorescência da BSA na presença do fármaco antitumoral, 1-hexilcarbamoil-5-fluorouracilo (Carmofur), onde fica evidente a diminuição da fluorescência a medida que aumenta a concentração da Carmofur, indicando assim, a interação molecular (HU et al., 2013) (Figura 22).

**Figura 22.** Extinção da fluorescência a medida que aumenta a concentração do fármaco. (HU et al. 2013).



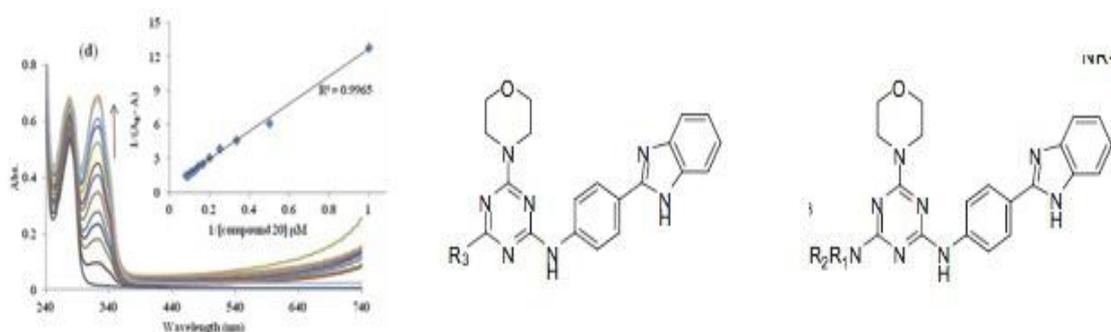
## 2.10. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NA BSA

A espectroscopia de absorção UV-VIS é um método simples e muito eficiente para a estudar e analisar as mudanças estruturais na proteína causados a partir da absorção de luz que são influenciados pela interação com os compostos testes (SEDIGHIPOOR et al, 2017).

O Espectro de absorção da albumina apresenta um comprimento de onda entre 220 e 280, que está relacionada ao pico máximo de absorção da estrutura dos polipeptídeos e aminoácidos aromáticos, como o triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (SINGA et al., 2016).

Em estudos publicados por Singla et al. (2016) a medida que a concentração de derivados indólicos aumenta, nota-se um aumento gradual no pico máximo de absorção que ocorre a 279nm e aparece uma nova banda em um comprimento de onda mais longo, geralmente a 324nm, isso possivelmente indica a interação do composto com a BSA, levando um aumento da hidrofobicidade nos locais dos resíduos de Trp, Tyr e Phe (Figura 23).

**Figura 23.** Resultados encontrados por Singla (2016). NR1R2: Morfonina: Ciclohexalamina - R3: Fenil; 4-Fluorfenil; 4-clorofenil



Nesse mesmo estudo, o comprimento de absorção máximo não houve nenhuma alteração, então Singla *et al.* (2016) deduziu que a interação entre os compostos a proteína foi de natureza não covalente, ocorridas provavelmente devido ao empilhamento de elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos dos compostos e os anéis de presentes nos resíduos de aminoácidos Trp, Tyr e Phe localizados nos sítios da BSA.

Os estudos encontrados na literatura nos conduziram ao planejamento, síntese e idealização de experimentos que nos permitissem avaliar a contribuição dos novos derivados 2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamidas descritos a seguir:

### 3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

#### 3.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS

##### 3.1.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados para obtenção dos compostos da série 2-((1H-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotioamida foram adquiridos pela *Sigma Aldrich* e os todos os solventes (álcool etílico, diclorometano, dimetilsulfóxido e ácido acético glacial) fornecidos pela Dinâmica.

A comprovação estrutural e os dados físico-químicos foram realizadas através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e de Carbono (RMN 13C) realizados em Modelo Varian Plus Spectrofotometro (Varian, EUA) a 400 MHz, utilizando o solvente DMSO-d<sub>6</sub> e as análises de espectroscopia de Infravermelho foram realizadas num espectrômetro com transformada de Fourier – *Spectrum* (em UATR), e Espectrometria de massas foram no espectrômetro de massas MALDI-TOF.

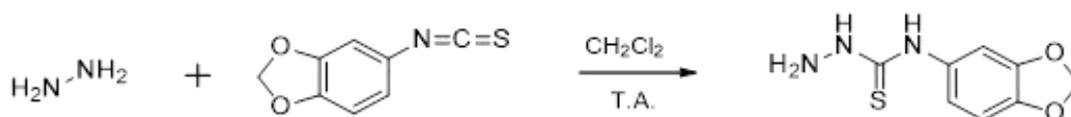
Os derivados foram analisados através da cromatografia em camada delgada, utilizando placas cromatográficas Polygram Sil G/UV 254 (0,20 mm), reveladas sob luz ultravioleta em 254 nm. O ponto de fusão foi determinado pelo aparelho de fusão a seco (Modelo 431D - Fisatom, Brasil).

##### 3.1.2. Procedimento experimental

###### 3.1.2.1. Síntese do intermediário tiossemicarbazida: *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotioamida (LQIT/JF-TDZA)

O derivado *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotioamida (TDZA) foi obtido por uma reação de adição nucleofílica entre 2 mols de solução de hidrazina e 1 mol do isotiocianato benzodioxolc (*Figura 24*). A reação foi mantida sob agitação e foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD). O produto foi purificação por cristalizações sucessivas.

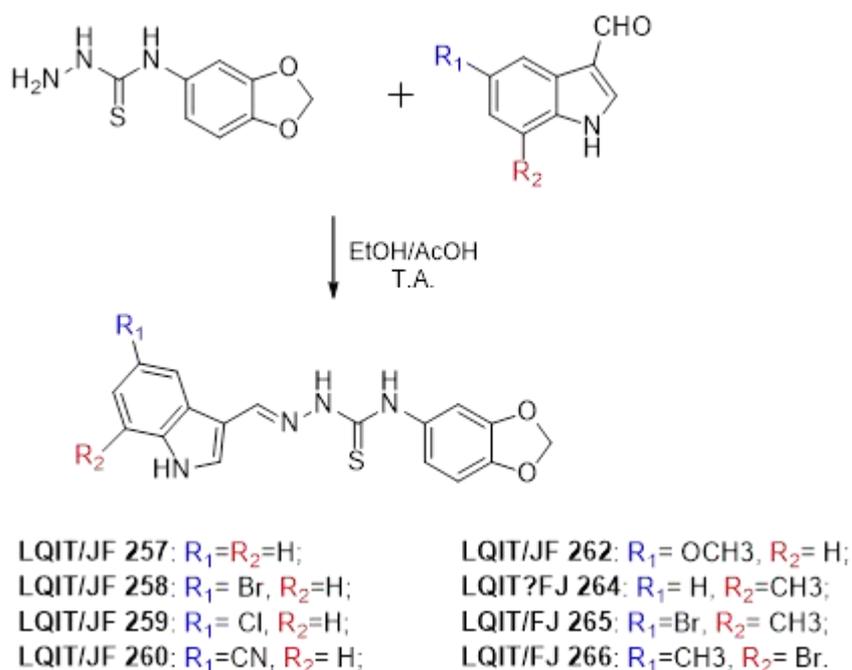
**Figura 24.** Esquema reacional para obtenção do intermediário tiossemicarbazida benzodioxol (TDZA).



### 3.1.2.2. Síntese dos derivados derivados 2-((1H-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamidas (LQIT/JFs)

A síntese dos derivados aril-tiossemicarbazonas ocorreu de acordo com a figura 25. O *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il) hidrazinacarbotoamida (LQIT/TDZA) foi solubilizado com etanol absoluto e mantido sob agitação à temperatura ambiente, na presença de um catalisador, ácido acético. A formação do composto final foi verificada por CCD. Os derivados foram purificados através de cristalizações sucessivas em solvente adequado.

**Figura 25.** Esquema reacional para obtenção dos derivados aril-tiossemicarbazonas.



2-(1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-257): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 1*H*-indol-3-carbaldeído (0,0687g) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-bromo-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-258): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 5-bromo-1*H*-indol-3-carbaldeído (0,1060g) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-cloro-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida e (LQIT/JF-259): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 5-cloro-1*H*-indol-3-carbaldeído (0,0847) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-260): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 3-formil-1*H*-indol-5-carbonitrila (0,0805g) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-metoxi-1*H*-indol-3-il) metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-262): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 5-metoxi-1*H*-indol-carbaldeído (0,0829) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-264): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,1g, 0,4733 mmol) e 7-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído (0,0952) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-bromo-7-metil-1*H*-indol-3-il) metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-265): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,08g, 0,3787 mmol) e 5-bromo-7-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído

(0,0901g) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL) e ácido acético glacial (1 mL).

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((7-bromo-5-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-266): Os reagentes *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (0,08 g, 0,3787 mmol) e 7-bromo - 5-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído (0,0901g) foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, na presença de etanol (20 mL).

## 3.2. ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM DNA

### 3.2.1. Reagentes e equipamentos

O DNA de timo bovino (ctDNA), bem como a BSA (Albumina de Soro Bovino) para análises de interação foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As medições dos espectros de UV-VIS (Ultravioleta-visível) foram obtidos a partir do aparelho espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO. Para avaliação das amostras na técnica de espectrometria de fluorescência, foi utilizado o aparelho Espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão).

### 3.2.2. Preparação do ctDNA

O DNA foi dissolvido em Tris-HCl 7,6, e mantido em refrigeração a 8°C por 24Horas. Após esse período, a solução é sonicada por 30 min e verificada sua absorbância em 260 nm para encontrar a concentração, usando o coeficiente de extinção molar de  $6600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>120</sup>. A razão dos valores de absorbância em 260 e 280 nm no tampão Tris foi utilizada para verificar a pureza do ctDNA.

### 3.2.3. Estudos espectroscópicos de absorção UV-VIS

Para os estudos espectroscópicos de absorção UV-VIS, foi preparado uma solução mãe dos compostos na concentração de 1mM e em seguida foram dissolvidos em tampão Tris-HCl, pH 7,6. As soluções dos experimentos, para a medição do espectro de absorção, foram preparadas em eppendorfs em concentrações definidas após varredura dos compostos.

A concentração dos derivados LQIT/JFs foi fixada em 25  $\mu\text{M}$ . Adicionadas a esta, concentrações aumentadas de ctDNA (0,10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ ). O volume final da solução foi de 1mL. As soluções contendo os derivados e ctDNA foram agitadas e após 10 min em repouso e temperatura ambiente, todas as amostras foram avaliadas, utilizando uma cubeta de quartzo retangular com comprimento de 1cm.

A constante de ligação intrínseca ( $K_b$ ) foi obtida através da equação de MCGEE AND VON HIPPEL (1974):

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

onde,  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$  e  $\epsilon_f$  são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. O gráfico da  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$  foi utilizado para obtenção do  $K_b$  a partir da razão entre a inclinação e o intercepto.

Todos os espectros de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot, versão 10.0.

#### **3.2.4. Análise de interação com albumina (BSA)**

Uma solução reserva de BSA na concentração de 1 mM foi preparada em tampão Tris HCl pH 7,6 e armazenada em  $-20^\circ\text{C}$  para uso posterior. Os derivados LQIT/JFs foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1mM para obtenção de uma solução mãe. Foram preparadas soluções de trabalho com diluição da BSA em tampão Tris HCl em concentração fixada de 10  $\mu\text{M}$ . Concentrações crescentes dos compostos em 0, 5,10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{M}$ , foram adicionadas a esta solução de BSA. Todas as medições foram realizadas em temperatura ambiente, utilizando cubeta de quartzo retangular de caminho óptico 1cm.

#### **3.2.5. Espectroscopia de Fluorescência**

As amostras para esta análise foram preparadas da mesma forma que na espectroscopia de absorção, utilizando concentrações dos derivados de 5-40  $\mu\text{M}$  e albumina fixada em 10  $\mu\text{M}$ . O comprimento de onda de excitação da BSA utilizado foi de 285 nm e a verificação da emissão de 310 a 400 nm foi monitorizado quanto aos estudos de ligação à

proteína. As fendas de excitação e de emissão foram em bandas 2,5 nm e a sensibilidade alta. Os dados de extinção foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer:

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

onde:  $F_0$  é a intensidade de emissão na ausência de composto,  $F$  é a intensidade de emissão na presença do composto,  $K_{sv}$  é a constante de extinção (Stern-Volmer), e  $[Q]$  é a concentração do composto (inibidor).

Todos os espectros de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot, versão 10.0.

### 3.3. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS EM LINHAS DO CÂNCER DA MAMA (MCF-7 E MDA-MB-231)

#### 3.3.1. Material e reagentes

As duas linhagens celulares utilizadas neste trabalho (MCF-7 e MDA-MB-231) foram generosamente fornecidas pelo INSA (Intituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal). O DMEM utilizado para manter as células em cultura foi adquirido à Lonza (Portugal), assim como o FBS. O GlutaMax-I (100X) e o PenStrep foram adquiridos à Life Technologies (Portugal). O DMSO utilizado para dissolver os compostos foi adquirido à VWR (Portugal). O MTT foi adquirido à AMRESCO (Portugal)

#### 3.3.2. Procedimento experimental

A citotoxicidade dos compostos foi testada em células do tipo epiteliais de câncer de mama MCF7 e do tipo mesenquimais MDA-MB-231. Pelo teste de citotoxicidade é possível encontrar o índice de citotoxicidade(IC50), que é definido como a concentração que inibe o crescimento de 50% das células tumorais e foi calculado a partir de uma curva dose-resposta resultante da representação gráfica do logaritmo da concentração individual de cada dose de composto contra a respectiva percentagem (%) de sobrevivência das células em cada dose.

As células foram mantidas em DMEM com 10% de FBS, 1% de GlutaMax-I (100X), e 1% de PenStrep.

Nos ensaios de viabilidade celular, foram utilizadas 15.000 células/poço com a linha MCF-7 e 10.000 células/poço com a linha MDA-MB-231, para cada placa de 96 poços. Cada

composto foi testado em seis concentrações diferentes - 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 0,5  $\mu\text{M}$  – diluídos em 1% de DMSO. Os grupos controle foram tratados com as mesmas condições dos grupos experimentais. Estes compostos foram incubados durante 72 horas, a 37°C.

A viabilidade de células tumorais foi quantificada recorrendo ao ensaio do MTT, um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Após 72 horas de incubação, a solução de MTT foi adicionada a cada poço de modo a se obter uma concentração final de 0,5 mg/ml, e incubado durante 3 horas e 30 minutos para a linha MCF-7 e durante 4 horas para a linha MDA-MB-231

Os cristais de formazan que se formaram foram diluídos em DMSO e a sua absorvância foi analisada a 570 nm no leitor de placas FLOUstar Leitor Omega MicroPlate. Os resultados foram analisados no software GraphPad Prism.

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

#### 3.4.1. Preparação de soluções stock e meio de cultura

Meio de cultura RPMI completo (RPMIc)

A preparação do meio de cultura de *Plasmodium falciparum* foi feita ao dissolverem-se 10,44g de meio RPMI 1640 (biowest<sup>®</sup>, P0860-N10L), 5g de AlbuMAX<sup>™</sup> II (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies<sup>™</sup>, 11021-037), 0,1g de Hipoxantina (Sigma-Aldrich), 5,94g de HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) (VWR<sup>®</sup>) e 2g de bicarbonato de sódio num litro de água ultrapura Milli-Q (Anexo I). A solução final foi esterilizada através da sua passagem por um filtro com poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenada a 4°C, sendo o seu pH de 7,8.

Solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Adicionou-se uma pastilha de PBS (VWR<sup>®</sup>) a 200 mL de água ultrapura Milli-Q. Após a mistura ter sido autoclavada, esta foi mantida a 4°C.

#### Solução de Sorbitol a 5%

Diluíram-se 50g de D-Sorbitol (Sigma-Aldrich) em água ultrapura Milli-Q num volume final de 1 litro. A solução foi armazenada a 4°C após ser autoclavada.

#### Solução Corante Giemsa a 20%

A preparação da coloração de Giemsa a 20% foi realizada ao adicionar-se 20 mL de uma solução de Giemsa puro a 80 mL de água tamponada (pH = 7,2), para perfazer os 100 mL de Giemsa a 20%. Após ter sido filtrada com papel de filtro, a mistura foi posteriormente armazenada a 4°C. O Giemsa é uma coloração de ácido nucleico usada para distinguir visualmente os parasitos de *Plasmodium spp.* das células circundantes.

#### Solução de NaOH a 0,1 M

Adicionaram-se 1 mL de NaOH (Hidróxido de sódio) (Sigma-Aldrich) a 5M a 49 mL de água ultrapura Milli-Q.

#### Solução de DMSO a 1%

Adicionaram-se 2400 µl de RPMIc a 24 µl de DMSO (100%).

#### Solução de DMSO a 2%

Pipetaram-se 1764 µl de RPMIc a 36 µl de DMSO (100%).

#### Solução de Éter (70% Éter; 30% etanol)

A preparação de Éter foi feita ao adicionar-se 70 mL de éter para 30 mL de etanol.

#### Solução para crioconservação

A preparação da solução de crioconservante foi feita com 28% de glicerol, 4,2% de sorbitol e 0,65% de cloreto de sódio (NaCl). Após a preparação da solução, esterilizou-se por filtração e conservou-se a 4°C.

#### Solução A (descongelação)

Adicionou-se 12% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

#### Solução B (descongelação)

Adicionou-se 1,6% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

#### Solução C (descongelação)

Juntou-se 0,2% de dextrose a 0,9% de NaCl em água destilada e esterilizou-se por filtração.

#### Cloroquina

Pesou-se a cloroquina e adicionou-se água ultrapura Milli-Q para obter uma concentração final de 10 µM.

#### Compostos LQIT/JF

Os nove compostos da série LQIT/JF foram pesados e individualmente numerados, e assim adicionou DMSO de modo a obter uma concentração final de 5mM.

#### Solução de eritrócitos humanos não parasitados a 50%

A colheita de sangue total venoso foi feita por um Técnico de Análises Clínicas do IHMT a dadores voluntários saudáveis portadores do grupo sanguíneo do tipo O, sem história de contacto prévio com *Plasmodium spp.*, através de punção venosa e recorrendo ao sistema SARSTEDT Monovette® com tubos suplementados com EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) KE/9 mL. O sangue total foi centrifugado a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 3

minutos e o plasma foi aspirado. Com o objectivo de a solução ficar reduzida a eritrócitos, o *pellet* resultante da aspiração foi lavado com PBS estéril e centrifugado. Estes últimos passos foram repetidos 5 vezes. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi removido por aspiração. Ao volume final de eritrócitos resultantes adicionou-se igual volume de meio RPMIc ficando a solução final com um hematócrito de 50%. A mistura foi armazenada a 4°C, não excedendo 15 dias.

### **3.4.2. Procedimento experimental**

#### **Estirpes 3D7 de *P. falciparum***

Esta foi originada a partir da NF54 após diluições limitadas e é caracterizada pela sua sensibilidade à Cloroquina(WALLIKER et al., 1987).

#### **Cultura de *Plasmodium falciparum* na fase eritrocitária assexuada**

Culturas contínuas da estirpe de *P. falciparum* (3D7) foram estabelecidas para, posteriormente, serem utilizadas nos testes de sensibilidade aos antimaláricos. Para isso, amostras de eritrócitos infetados com *P. falciparum*, previamente congeladas a - 80°C, foram descongeladas à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma lavagem desses eritrócitos com soluções de NaCl a 12% e 1,6% (onde ficam retidos os resíduos da solução crioprotectora). De seguida, fez-se outra lavagem com RPMI. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se eritrócitos não infetados até perfazer um volume final de 0.5 mL de eritrócitos. Ressuspendeu-se o volume final de eritrócitos em 9.5 ml de meio MCM para que o hematócrito final da cultura ficasse a 5 %. Transferiu-se a suspensão para um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e colocou-se a incubar a 37°C e a uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Manutenção e Monitorização das Culturas**

As culturas contínuas de *P. falciparum* foram mantidas a parasitémias (percentagem de eritrócitos infetados) inferiores a 2% e a um hematócrito de 5%. O meio de cultura foi substituído diariamente. Para avaliar o crescimento da cultura foram calculadas diariamente as respetivas parasitémias. Para isso esfregaços de sangue foram corados pelo método de

coloração de Giemsa. O esfregaço depois de seco foi fixado em metanol a 100% (Merck, Lisboa, Portugal) e corado durante 20 minutos com solução de Giemsa (Merck, Lisboa, Portugal) diluída 10 vezes em PBS 1x. A parasitemia foi calculada num microscópio óptico (ampliação 1000X): no de eritrócitos infectados/no de eritrócitos totais, em 10 campos (o resultado é expresso em %).

### **Sincronização da cultura**

Para obter um predomínio de formas jovens na cultura contínua, recorreu-se ao protocolo de sincronização utilizando uma solução de D-sorbitol (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) a 5%. Aos eritrócitos infetados que se encontravam em cultura (que correspondem a 0.5 mL de uma cultura de 10 mL) foram adicionados 10 mL de sorbitol a 5%. Incubou-se, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Depois fizeram-se duas lavagens com RPMI 1640, centrifugando a suspensão a 1800 rpm durante 5 minutos. Após as lavagens, o volume de eritrócitos foi medido e transferido para um frasco de cultura com 9.5 mL de MCM. Visto que este procedimento lisa os eritrócitos infetados com parasitos mais maduros, por vezes foi necessário adicionar eritrócitos não infetados para que o volume final de eritrócitos fosse de 0.5 mL e, conseqüentemente, para que o hematócrito se mantivesse a 5%.

### **Determinação do valor de IC<sub>50</sub>**

A potencialidade de atividade anti malária dos novos aril-tiossemicarbazonas da Série LQIT-JF foi avaliada pelo ensaio de susceptibilidade *in vitro* de *Plasmodium falciparum* usando SYBR Green I (MSF)<sup>122</sup>. O Sybr Green é um corante fluorescente que permite quantificar a presença do parasito da malária, uma vez que este liga-se ao DNA do parasito.

O objetivo do ensaio é avaliar o grau de desenvolvimento dos parasitos *Plasmodium falciparum* na presença de diferentes concentrações (diluição seriada) dos derivados JF.

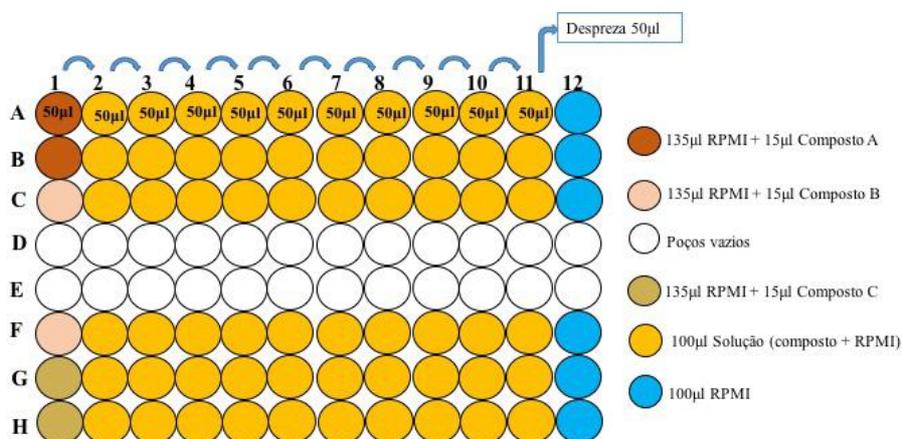
### **Ensaio Whole-Cell SYBR Green I para determinação do IC<sub>50</sub>**

Depois de verificar a parasitemia da cultura através da técnica de esfregaço sanguíneo (corados com giemsa), esta foi ajustada para 1%, em uma mistura de hematócrito (HTC) inicial a 5% com eritrócitos parasitados em estádios diversos (assíncronos), acertado para um

hematócrito a 3%, meio de cultura e eritrócitos não parasitados. Essa mistura foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo plano (Figura 26). Normalmente, em cada ensaio, foram testados 3 compostos por placa, em duplicata. Foram feitos 3 ensaios para os compostos que apresentaram curva dose-resposta.

Nos Poços A1, B1, C1, F1, G1 e H1 adicionou-se 135µl de eritrócitos parasitados (HTC 3% e parasitemia 1%) e 100 µl da mesma mistura nos restantes dos poços. Adicionou-se 15µl ([100 µM]) dos respectivos compostos nos poços A1, B1, C1, F1, G1 e H1. Homogeneizou o conteúdo dos poços A1, B1, C1, F1, G1 e H1 e transferiu-se 50 µl dessa solução para os poços subsequentes até os poços A11, B11, C11, F11, G11, H11. Constituindo uma diluição seriada de 1:3, e intervalo de concentrações entre 10000 nM-0,1693 nM. Os poços A12, B12, C12, F12, G12, H12 não recebendo composto, constituindo o controle negativo, conforme ilustrado na figura abaixo. A seguir, a placa foi incubada durante 72 horas a 37°C, e 5% de CO<sub>2</sub>.

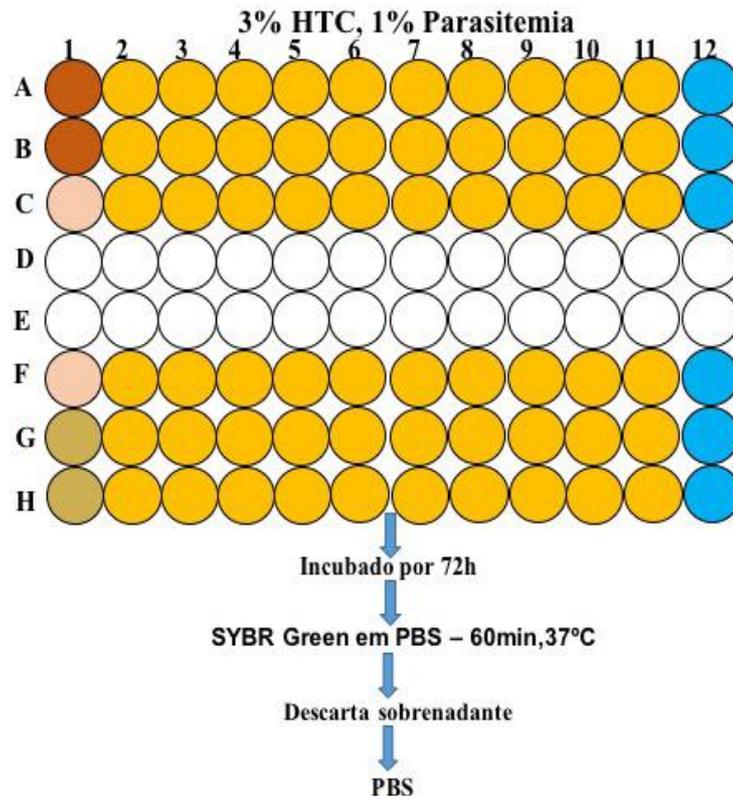
**Figura 26.** Solução dos compostos testados, indicando a diluição seriada.



Após 72 horas, foi adicionado, a cada um dos poços, 100 µl da solução de SYBR Green I em PBS não estéril. Incubou-se durante 60 minutos a 37°C, e 5% de CO<sub>2</sub>, afim de que ocorrer a ligação do SYBR Green I ao DNA do parasito. Após esse período, a placa foi submetida a centrifugação numa velocidade de 4000 rpm, durante 2 min. Descartou-se o sobrenadante, por aspiração, e adicionou-se PBS não estéril (Figura 27).

A fluorescência foi quantificada num espectro fluorímetro, leitor de microplacas multi-modo (Triad, Dynex Technologies) em 485 nm de excitação e 535 nm de emissão.

**Figura 27.** Esquema do Ensaio de avaliação da atividade antimalária com SYBR Green I. (MACHADO *et al.* 2016).

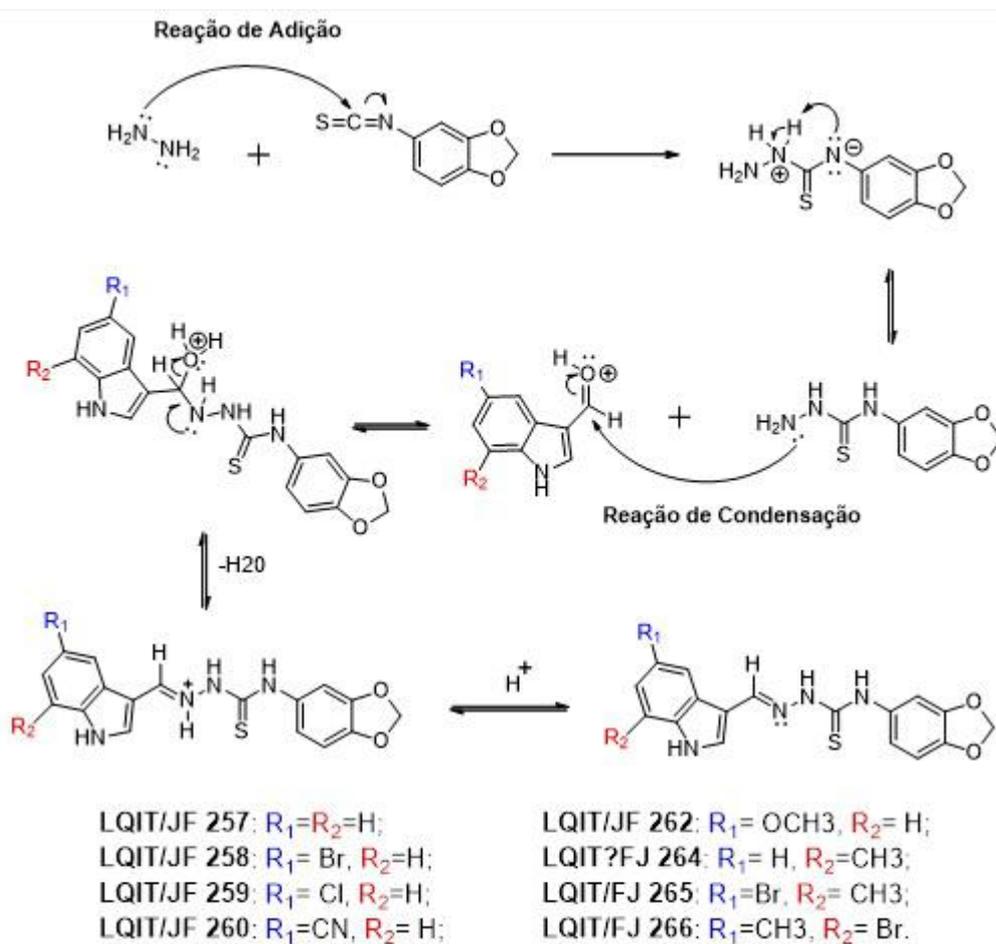


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. MECANISMO DE SÍNTESE

Os derivados LQIT/JF-TDZA e os demais derivados foram sintetizados conforme a *figura 28*.

**Figura 28.** Esquema de síntese dos derivados LQIT/JFs.



O composto LQIT/JF-TDZA foi sintetizado, de acordo com o que propõe Tenório 2015, em uma única etapa através da reação de adição nucleofílica entre a hidrazina e o isotiocianato substituído com a porção Benzodioxol. Este derivado foi utilizado como intermediário para a síntese dos demais 8 compostos JFs indol-tiosemicarbazonas, usando o

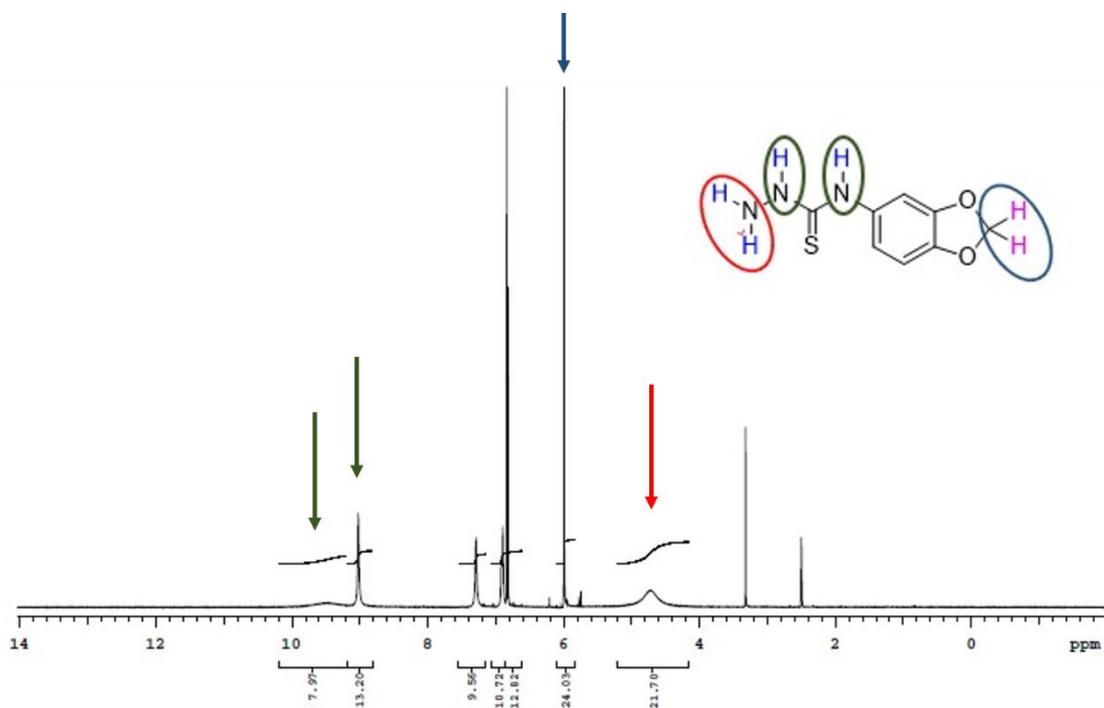
aldeído indol com diferentes substituições. Esta síntese ocorreu através da reação de condensação, com liberação de uma molécula de água (*Figura 28*).

#### 4.1.1. Caracterização estrutural

A análise estrutural dos hidrogênios dos compostos sintetizados realizada por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  permitiu-nos elucidar estruturalmente os diferentes hidrogênios presentes nos derivados 2-((1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotioamidas.

Na análise por RMN  $^1\text{H}$ , o derivado LQIT-TDZA mostrou sinais referentes à porção NH aromática e NH hidrazínica entre 9,02 ppm e 9,56 ppm, respectivamente. Outros sinais, como o NH<sub>2</sub> terminal e os Hidrogênios do CH<sub>2</sub> (anel benzodioxol) apresentaram-se em 4,71 ppm e 5,99 ppm, respectivamente (*Figura 29*).

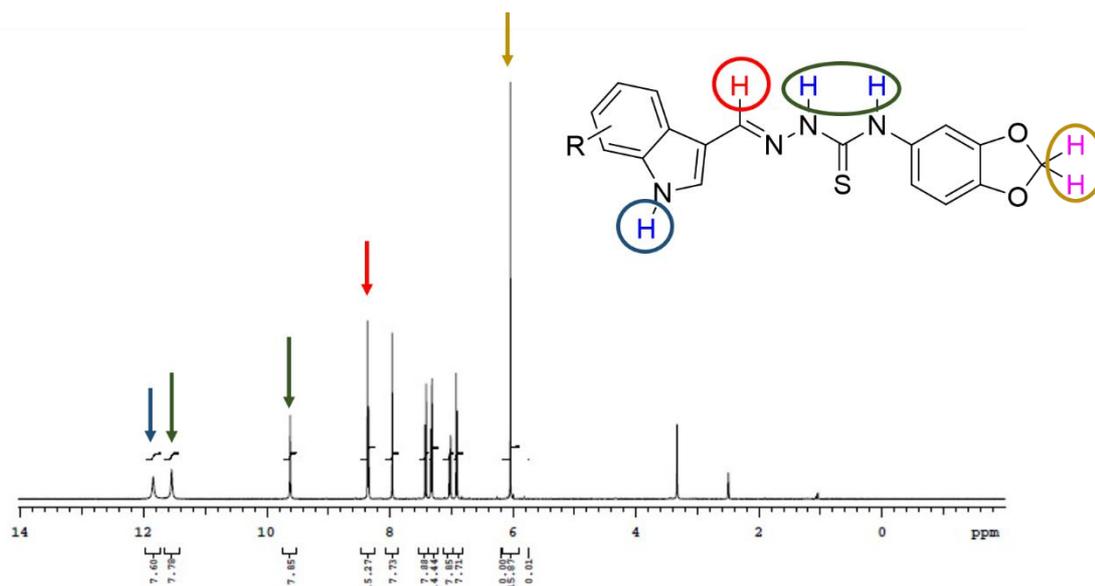
**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado LQIT/JF-TDZA.



Para os outros derivados LQIT/JFs, o sinal dos hidrogênios NH<sub>2</sub> terminal não foram visualizados. No entanto, sinais entre 11,54 ppm e 12,83 ppm que indicam o NH indólico e

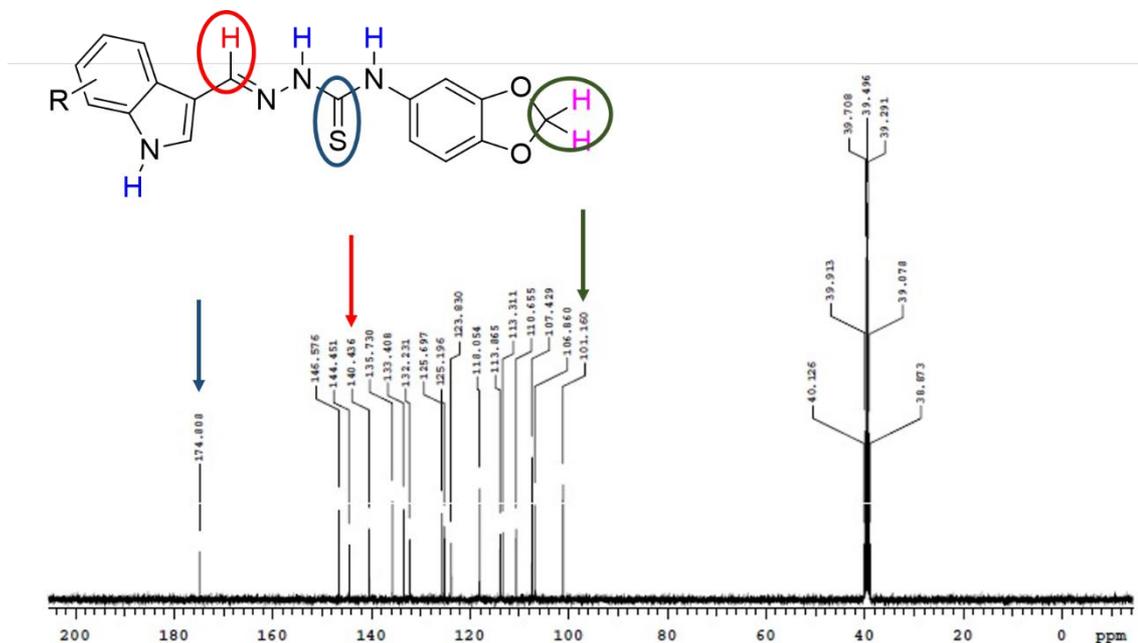
entre 8,36 ppm e 8,78 ppm que fazem referencia ao CH=N (imínico) puderam ser visualizados. Estes achados indicam o êxito da reação de condensação dos demais compostos (*Figura 30*).

**Figura 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado LQIT/JF-258.



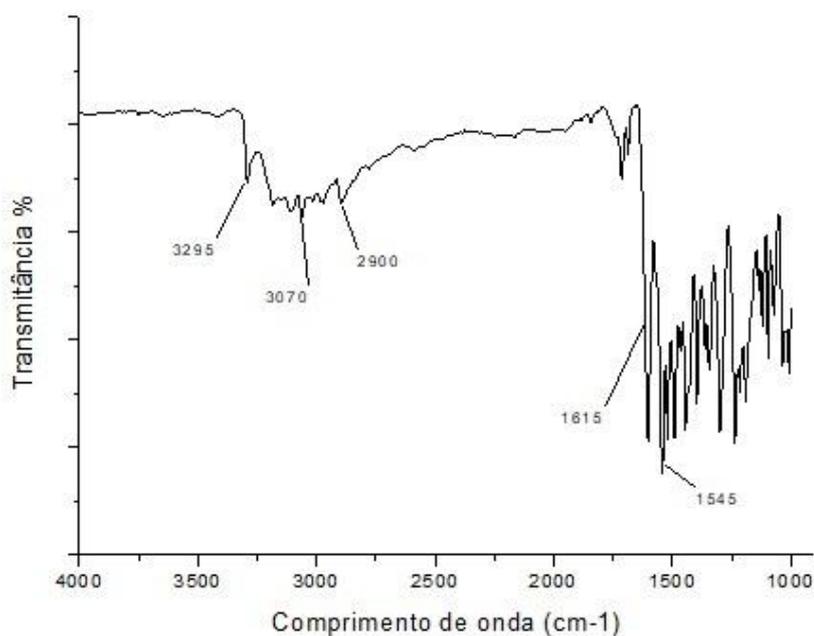
Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  também foram utilizados para confirmar a reação de condensação. Sinais entre 101,1 e 101,5 ppm foram encontrados para o  $\text{CH}_2$  da porção benzodioxol. O  $\text{CH}=\text{N}$  apresentou sinais entre 140,2 a 141,5 ppm e o  $\text{C}=\text{S}$  entre 171,8 a 175,4 ppm (*Figura 31*).

**Figura 31.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado LQIT/JF-258.



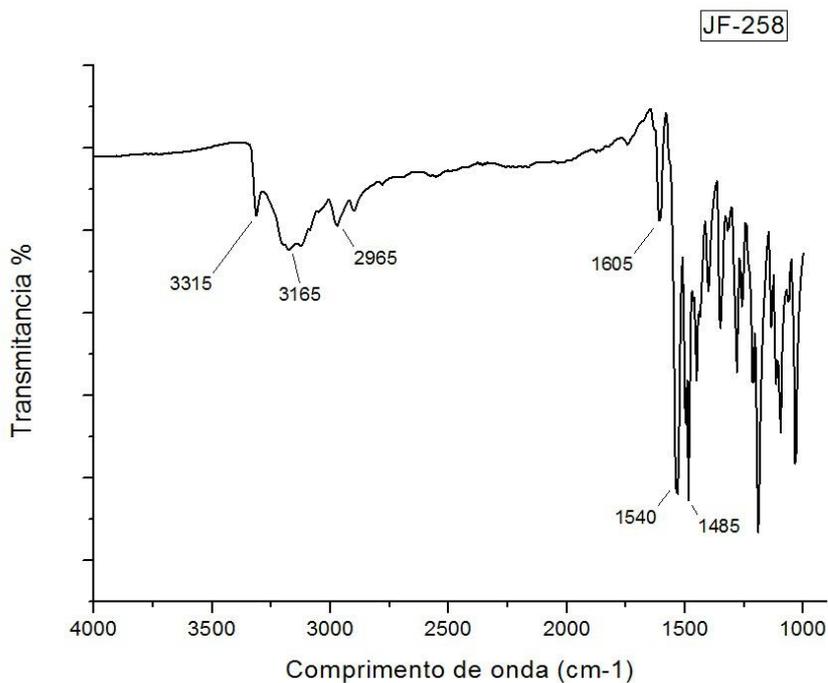
A espectroscopia de infravermelho confirma os achados nas espectroscopias de RMN pois mostra algumas bandas referentes aos grupos NH e C=S do derivado LQIT/JF-TDZA. Para o NH, podem ser visualizados os sinais entre  $3295$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$  e para o C=S, sinal em  $1545\text{ cm}^{-1}$  (Figura 32).

**Figura 32.** Espectro de infravermelho do derivado LQIT/JF-TDZA.



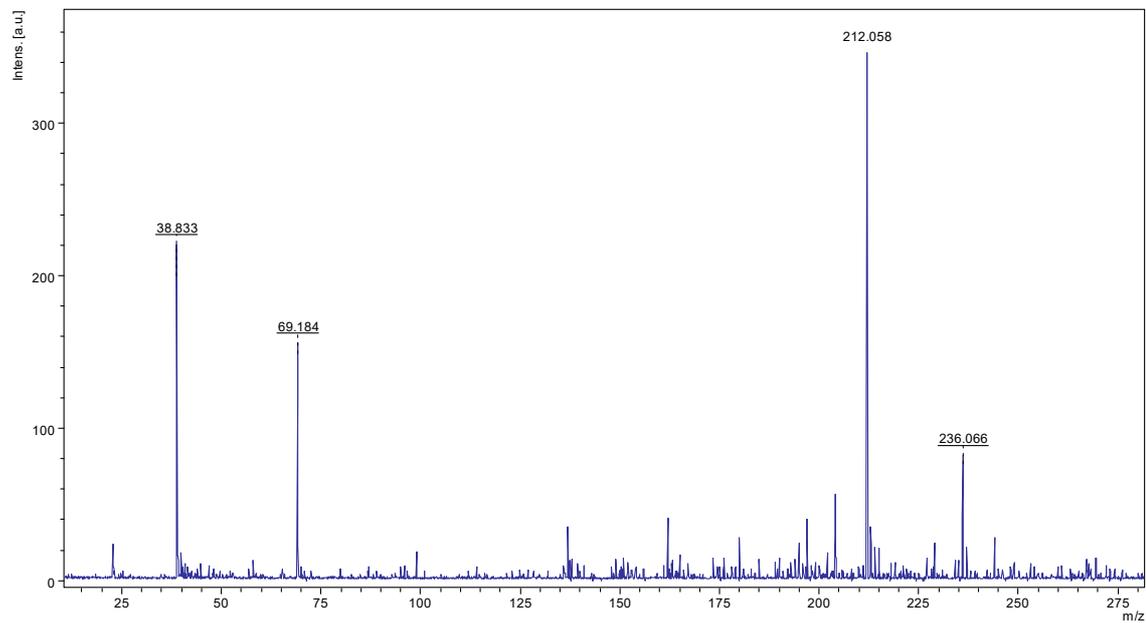
Para o LQIT/JF-258 (*Figura 33*), além das bandas referentes ao NH e C=S, observa-se também o estiramento do C=N, aparecendo em  $1615\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 33.** Espectro de infravermelho do derivado LQIT/JF-258.

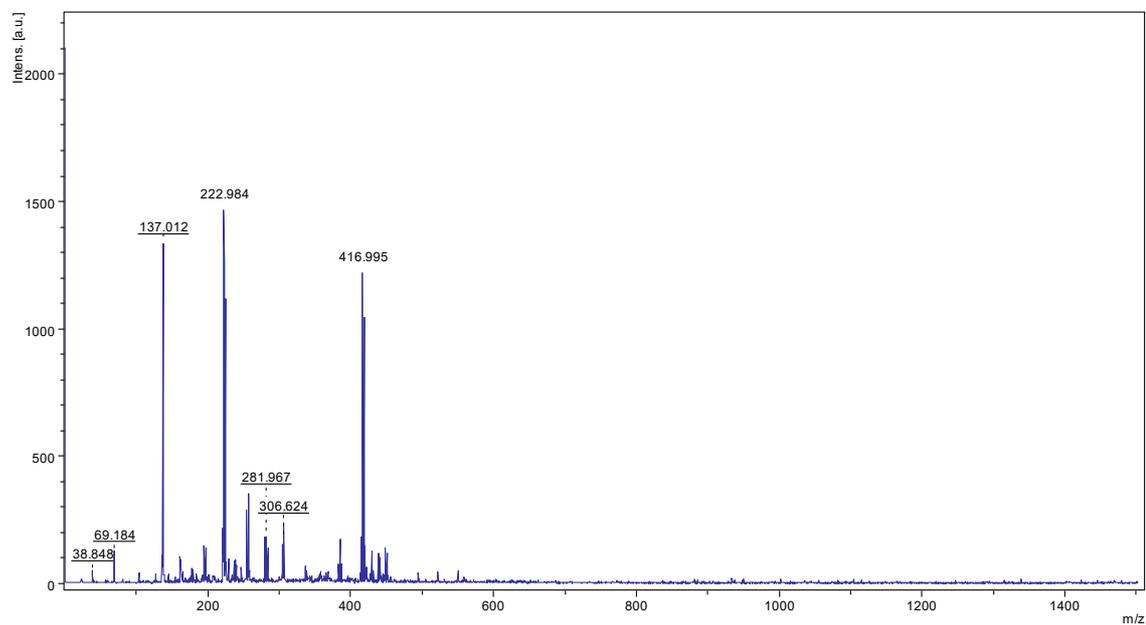


A partir da espectroscopia de massas, foram confirmadas as massas calculadas de todos os derivados, apresentando  $212,058\text{ g/mol}$  para o LQIT/JF-TDZA e entre  $339,089\text{ g/mol}$  e  $431,019\text{ g/mol}$  para os demais compostos indol-tiossemicarbazonas-benzodioxol (*Figura 34 e 35*).

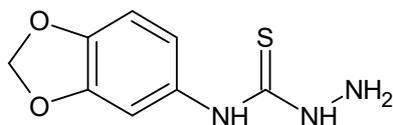
**Figura 34.** Espectro de massas do derivado LQIT/JF-TDZA com massa encontrada de 212,058 g/mol.



**Figura 35.** Espectro de massas do derivado LQIT/JF-258 com massa encontrada de 416,995 g/mol.



*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-TDZA)



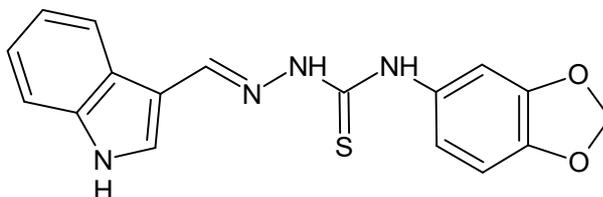
C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>S; Massa molar: 211,0415g/mol; Sistema: Hex/Acet (3:7) - R<sub>f</sub> 0,5; PF(°C): 161-163; Rendimento: 90,60%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>): δ = 4,71 (s, 2H), 5,99 (s, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 9,56 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 101,3 (CH<sub>2</sub>), 106,7 (CH), 107,3 (CH), 117,0 (CH), 133,3 (Cq), 143,8 (Cq), 146,4 (Cq), 179,5 ppm (Cq);

HRMS *m/z* [M + H] calculada: 212,0449; encontrada: 212,058.

2-(1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-257)

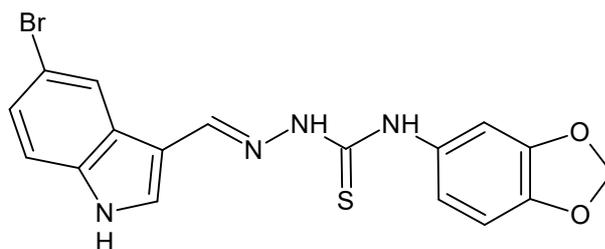


C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>4</sub>S; Massa molar: 338,0837 g/mol; Sistema: Hex/Acet (6:4) - R<sub>f</sub> 0,60; PF(°C): 204-206; Rendimento: 63,23%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>): δ = 6,04 (s, 2H), 6,90 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 6,96 (dd, *J* = 2/8 Hz, 1H), 7,06 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,18 (t, 7,6 Hz, 1 H), 7,25 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,6 Hz), 7,89 (s, 1H), 8,22 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,40 (s, 1H), 9,46 (s,1H), 11,52 (s, 1H), 11,66 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 101,1 (CH<sub>2</sub>), 107, 3 (CH), 107,4 (CH), 110,9 (Cq), 111,8 (CH), 118,7 (CH), 120,6 (CH), 121,8 (CH), 124,0 (Cq), 131,1 (CH), 133,3 (Cq), 137,0 (Cq), 141,1 (CH), 144,5 (Cq), 146,5 (Cq), 174,8 ppm (Cq); HRMS *m/z* [M + H] calculada: 339,0871; encontrada: 339,089.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-bromo-1*H*-indol-3-il)metileno)-hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-258)



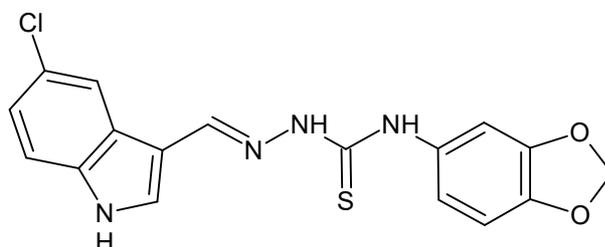
$C_{17}H_{13}O_2N_4S$ ; Massa molar: 415,9943g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - Rf 0,42 ; PF(°C): 209-210; Rendimento: 72,08%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 6,04 (s, 2H), 6,91 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,01 (dd,  $J$  = 2/8Hz, 1H), 7,33 (d,  $J$  = 2Hz, 1H), 7,33 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H), 7,42 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H), 7,96 (s, 1H), 8,34 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 8,36 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 11,54 (s, 1H), 11,84 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 101,1 (CH<sub>2</sub>), 106,8 (CH), 107,4 (CH), 110,6 (Cq), 113,3 (Cq), 113,8 (CH), 118,05 (CH), 123,8 (CH), 125,1 (CH), 125,6 (Cq), 132,2 (CH), 133,4 (Cq), 135,7 (Cq), 140,4 (CH), 144,4 (Cq), 146,5 (Cq), 174,8 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculada: 416,9976; encontrada: 416,995.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-cloro-1H-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida e (LQIT/JF-259)



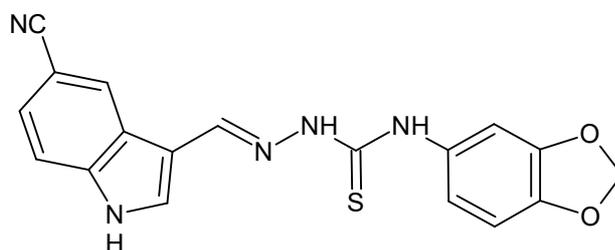
$C_{17}H_{13}O_2ClN_4S$ ; Massa molar: 372,0448g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - Rf 0,44 ; PF(°C): 205-207; Rendimento: 72,06%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 6,04 (s, 2H), 6,91 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 7,00 (dd,  $J$  = 2/8 Hz, 1H), 7,28 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 7,46 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,22 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 8,37 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 11,52 (s, 1H), 11,83 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 101,1 (CH<sub>2</sub>), 107,1 (CH), 107,4 (CH), 110,7 (Cq), 113,3 (CH), 118,3 (CH), 120,9 (CH), 122,6 (CH), 125,0 (Cq), 125,2 (Cq), 132,4 (CH), 133,4 (Cq), 135,4 (Cq), 140,5 (CH), 144,5 (Cq), 146,5 (Cq), 174,9 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 373,0481; encontrado: 373,045.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-ciano-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida  
(LQIT/JF-260)



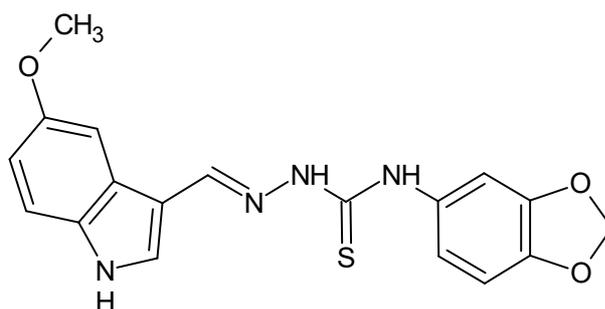
$C_{18}H_{13}O_2N_5S$ ; Massa molar: 363,0790g/mol; Sistema: Hex/Acet (2,5:7,5) - Rf 0,45 ; PF(°C): 233; Rendimento: 87,60 %.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 6,05 (s, 2H), 6,91 (dd,  $J$  = 3,6/8,4 Hz, 1H), 6,96 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 7,53 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H), 7,61 (dd,  $J$  = 3/8,8 Hz, 1H), 8,07 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H), 8,39 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 8,78 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 11,54 (s, 1H), 12,83 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 101,2 (CH<sub>2</sub>), 102,7 (Cq), 107,3 (CH), 108,0 (CH), 111,8 (Cq), 113,1 (CH), 119,3 (CH), 120,6 (Cq), 123,5 (Cq), 125,6 (CH), 127,6 (CH), 133,3 (CH), 133,5 (Cq), 138,8 (Cq), 140,2 (CH), 144,7 (Cq), 146,5 (Cq), 175,4 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 364,0824; encontrado: 364,089.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-metoxi-1*H*-indol-3-il) metileno)hidrazinacarbotoamida  
(LQIT/JF-262)



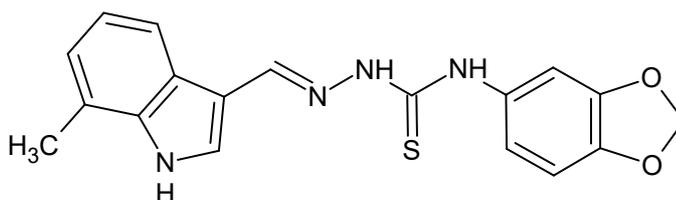
$C_{18}H_{16}O_3N_4S$ ; Massa molar: 368,0943g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - Rf 0,48 ; PF(°C): 203-206; Rendimento: 79,18%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3,79 (s, 3H), 6,03 (s, 2H), 6,85 (dd,  $J$  = 2/8,3 Hz, 1H), 6,89 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H), 7,03 (dd,  $J$  = 2/8 Hz, 1H), 7,34 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7,36 (d,  $J$  = 2 Hz), 7,65 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 7,84 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 8,39 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 11,54 ppm (s, 2H);

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 55,0$  ( $\text{CH}_3$ ), 101,1 ( $\text{CH}_2$ ), 103,5 (CH), 106,4 (CH), 107,4 (CH), 110,7 (Cq), 112,4 (CH), 112,5 (CH), 117,5 (CH), 124,6 (Cq), 131,4 (CH), 131,9 (Cq), 133,3 (Cq), 141,1 (CH), 144,3 (Cq), 146,5 (Cq), 154,4 (Cq), 174,4 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 369,0799; encontrado: 369,100.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-264)



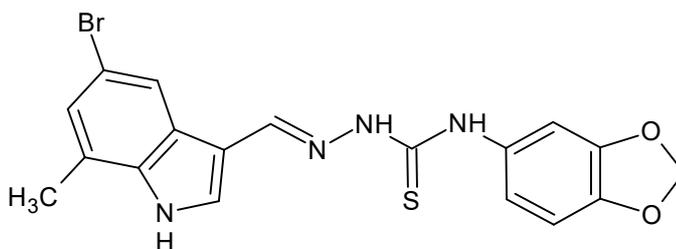
$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_4\text{S}$ ; Massa molar: 352,0994g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - Rf 0,55 ; PF( $^{\circ}\text{C}$ ): 204-206; Rendimento: 57,06%.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO - $d_6$ ):  $\delta = 2,49$  (s, 3H), 6,04 (s, 2H), 6,90 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 6,96 (dd,  $J = 2/8,6$  Hz, 1H), 6,99 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,06 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7,27 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7,91 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 8,04 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 8,41 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 11,53 (s, 1H), 11,66 ppm (s, 1H);

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 16,7$  ( $\text{CH}_3$ ), 101,5 ( $\text{CH}_2$ ), 107,0 (CH), 107,4 (CH), 111,3 (Cq), 118,7 (CH), 119,2 (CH), 120,8 (CH), 121,0 (Cq), 123,1 (CH), 123,8 (Cq), 130,7 (CH), 133,3 (Cq), 136,4 (Cq), 141,5 (CH), 144,5 (Cq), 146,5 (Cq), 174,8 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 353,1028. Encontrado: 353,104.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((5-bromo-7-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (LQIT/JF-265)



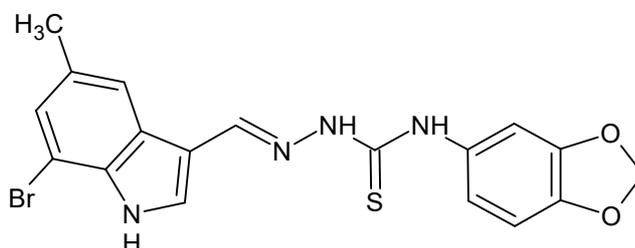
$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{BrN}_4\text{S}$ ; Massa molar: 430,0099g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - Rf 0,41; PF( $^{\circ}\text{C}$ ): 211-212; Rendimento: 78,41%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 2,48 (s, 3H), 6,04 (s, 2H), 6,91 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7,01 (dd,  $J$  = 2/8 Hz, 1H), 7,16 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 7,31 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 7,97 (s, 1H), 8,15 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 8,36 (s, 1H), 9,60 (s, 1H), 11,54 (s, 1H), 11,87 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 16,3 (CH<sub>3</sub>), 101,2 (CH), 106,8 (CH), 107,4 (CH), 111,0 (Cq), 113,3 (Cq), 118,0 (CH), 121,2 (CH), 123,5 (Cq), 125,5 (CH), 131,8 (CH), 133,6 (Cq), 135,4 (Cq), 140,4 (CH), 144,3 (Cq), 146,5 (Cq), 174,6 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 431,0133; encontrado: 431,017.

*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-((7-bromo-5-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (LQIT/JF-266)



C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>BrN<sub>4</sub>S; Massa molar: 430,0099g/mol; Sistema: Hex/Acet (4:6) - R<sub>f</sub> 0,42; PF(°C): 203-205; Rendimento: 69,99%.

RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 2,41 (s, 3H), 6,04 (s, 2H), 6,90 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7,01 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H) 7,27 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 11,57 (s, 1H), 11,77 ppm (s, 1H);

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 21,0 (CH<sub>3</sub>), 101,2 (CH<sub>2</sub>), 103,7 (Cq), 107,0 (CH), 107,4 (CH), 111,61 (Cq), 118,3 (CH), 120,7 (CH), 125,9 (Cq), 126,3 (CH), 131,6 (CH), 133,3 (Cq), 133,6 (Cq), 140,3 (CH), 144,5 (Cq), 146,5 (Cq), 174,9 ppm (Cq);

HRMS  $m/z$  [M + H] calculado: 431,0133; encontrado: 431,019.

## 4.2. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INTERAÇÃO COM O DNA

### 4.2.1. Espectroscopia de Absorção UV-Visível

A espectroscopia de absorção eletrônica UV-VIS é uma técnica fácil e comumente utilizada nos estudos de interação com o DNA, devido ao fato de fornecer diversas informações acerca do modo de ligação bem como a intensidade entre pequenas moléculas orgânicas ao DNA(WANG et al., 2011; LAFAYETTE et al., 2017). Esse estudo além de ser

muito importante para o desenvolvimento de novos fármacos, pode-se prever o mecanismo pelo qual ocorreu a interação do DNA, se foi através de intercalação, ligações nos sulcos, interação eletrostática, ligações de hidrogênio (SIRAJUDDIN et al., 2013).

Todos os comprimentos de onda de máxima absorção dos compostos livres e ligados, bem como outros dados espectrofotométricos, podem ser observados abaixo, na *Tabela 2*.

**Tabela 2** - Dados espectroscópico de absorção UV-vis dos derivados tiossemicarbazonas na ausência e presença do DNA.

ABSORÇÃO						
Derivados	$\lambda_{\text{max}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{max}}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocromismo (%) <sup>a</sup>	Hipercromismo (%) <sup>b</sup>	Kb (M <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
LQIT/TDZA	288	250	38	-	79,46	1,26 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-257	332	333	1	58,38	-	5,83 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-258	380	378	2	-	23,11	1,74 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-259	380	378	2	-	24,9	4,67 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-260	340	335	5	-	50,25	4,06 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-264	332	335	3	215	-	1,22 x 10 <sup>6</sup>
LQIT/JF-265	364	364	0	-	49,16	1,64 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-266	350	341	9	-	43,56	5,11 x 10 <sup>5</sup>

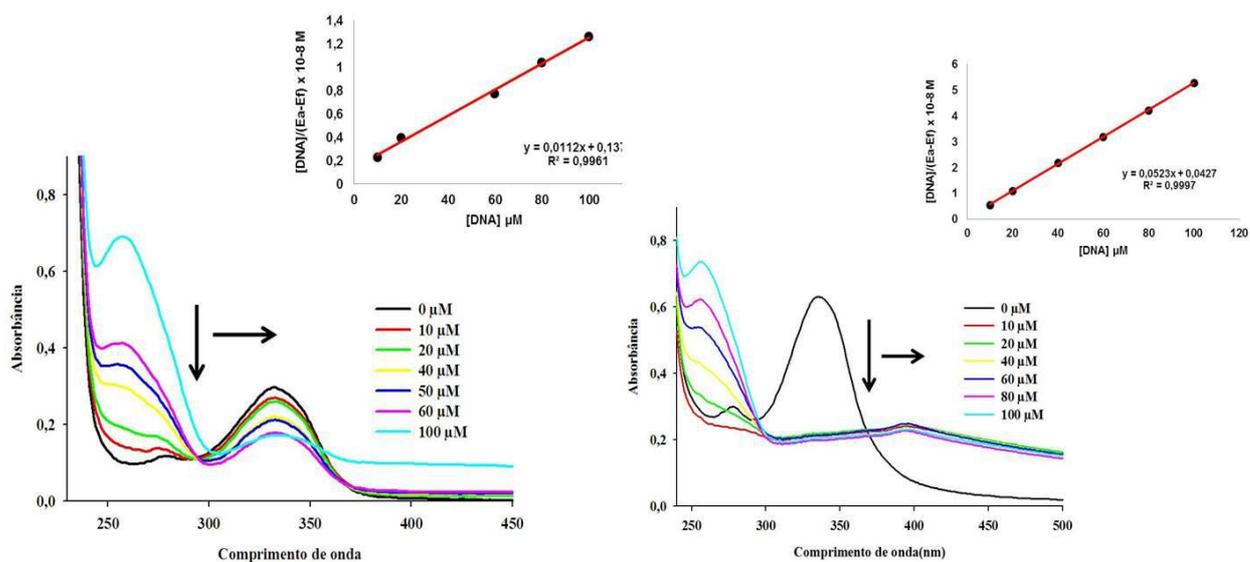
<sup>a</sup>. Hipocromismo resultante da formação de complexo entre os derivados indólicos e 100  $\mu\text{M}$  de ctDNA em comparação com os ligantes livres.

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

<sup>c</sup>. Constante de Ligação intrínseca entre os derivados e o DNA.

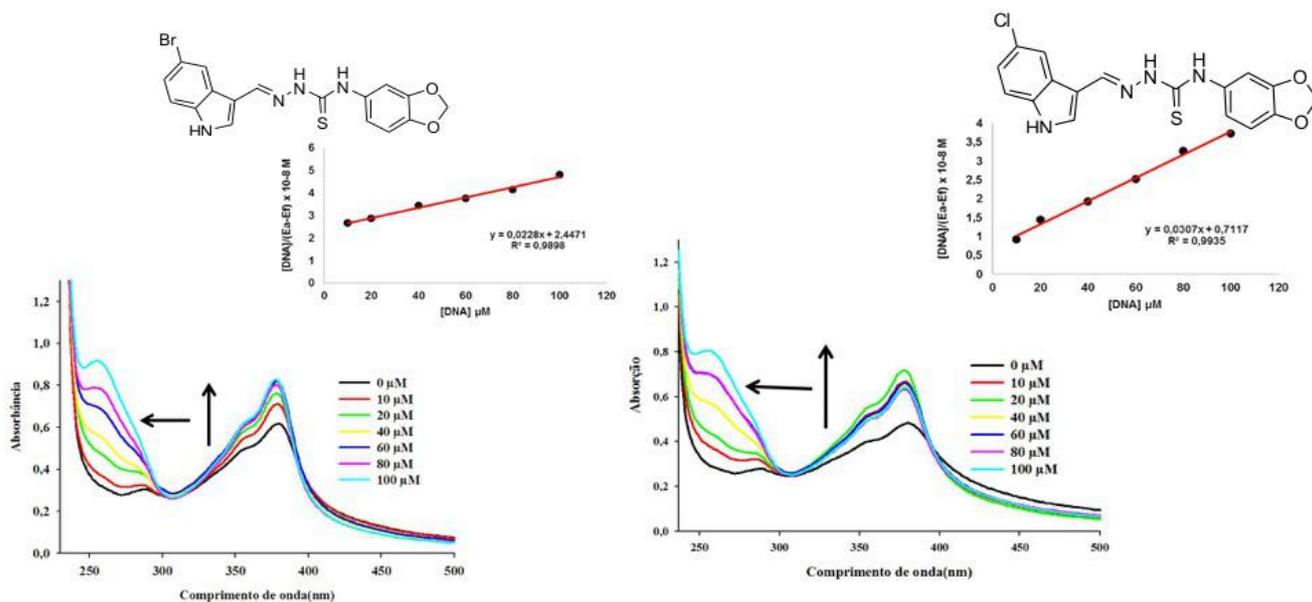
Na análise, foi verificado que os derivados LQIT/JF-257 e LQIT/JF-266 absorveram no comprimento de onda entre 300-350 nm (Figura 36) E uma constante de ligação na ordem de  $10^5$ .

**Figura 36.** Espectros dos derivados LQIT/JF-257 e LQIT/JF-266 em interação com o DNA

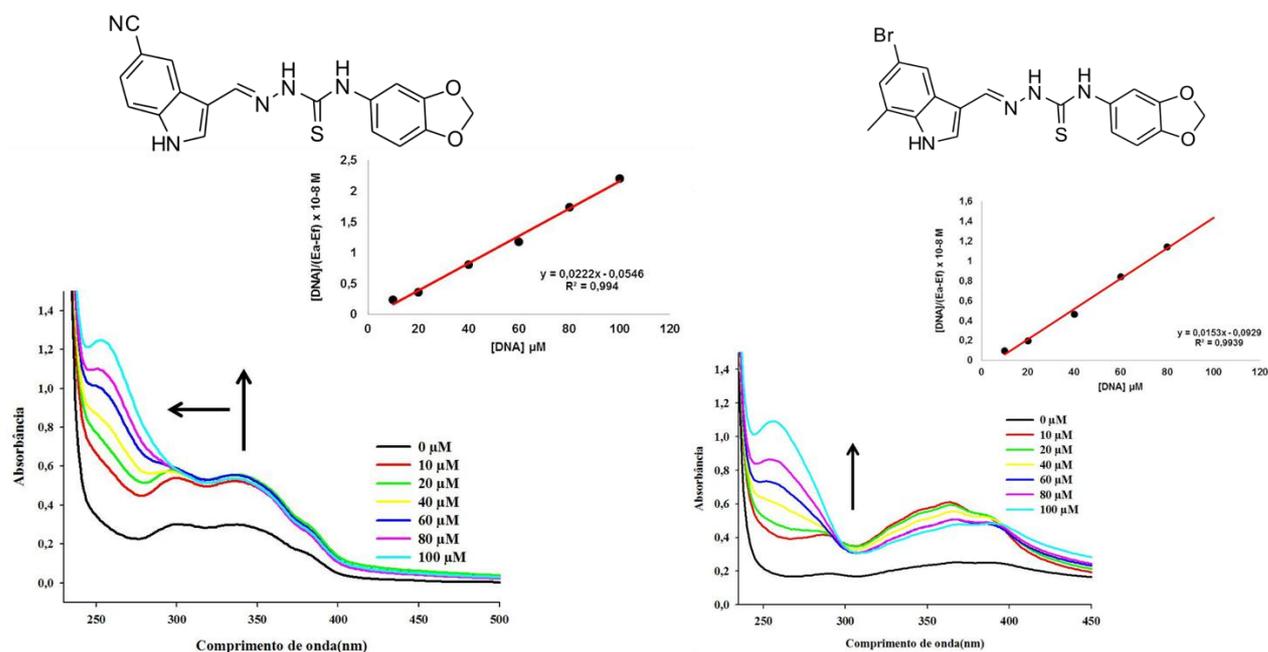


Já os derivados LQIT/JF-258, LQIT/JF-259(Figura 37), LQIT/JF-260 e LQIT/JF-265 (Figura 37), a absorção ocorreu em um comprimento de onda maior, 350-400. E apresentaram efeito hiperocrômico e desvio para esquerda(efeito hipsocrômico).

**Figura 37.** Espectros de absorção dos derivados LQIT/JF-258 e LQIT/JF-259

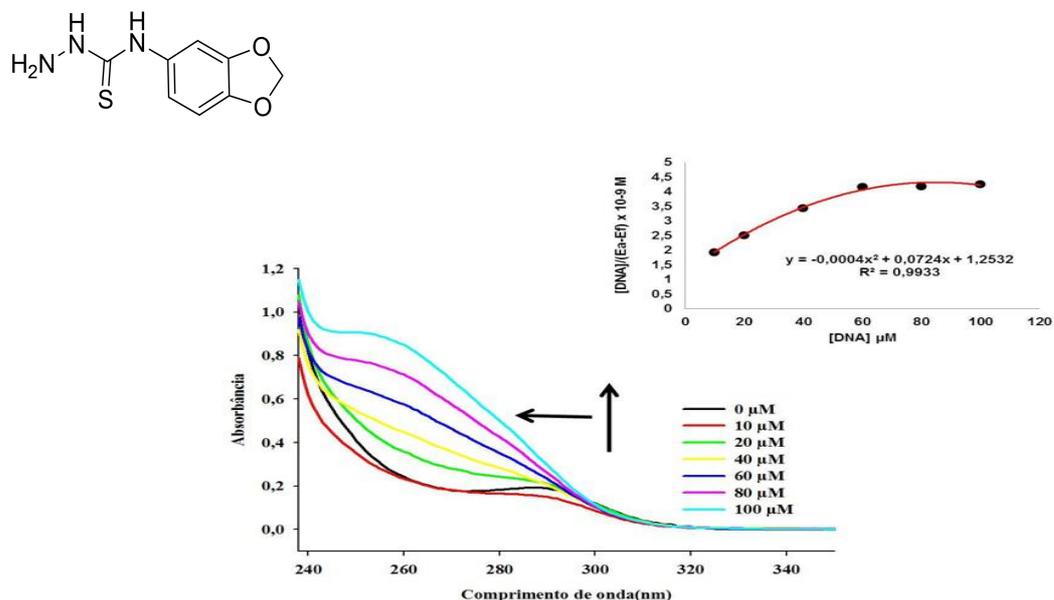


**Figura 38.** Espectros de absorção dos derivados LQIT/JF-260 e LQIT/JF-265



O comprimento de onda do derivado tiossemicarbazida(LQIT/JF-TDZA), que se trata de um intermediário de síntese utilizado na obtenção dos compostos finais por sua vez, apresentou-se em uma região mais baixa que os demais, entre 250-280 nm (*Figura 39*). E um menor Kb, na ordem de  $10^4$ . No entanto, este apresentou a maior hiper Cromicidade 79,46%. A hiper Cromicidade e desvio para a região do azul (hipsocrômico) pode caracterizar modo de interação por ligação ao sulco do DNA neste comprimento de onda (HAJIAN et al., 2017).

**Figura 39.** Espectro de absorção do derivado LQIT/JF-TDZA em interação com o DNA

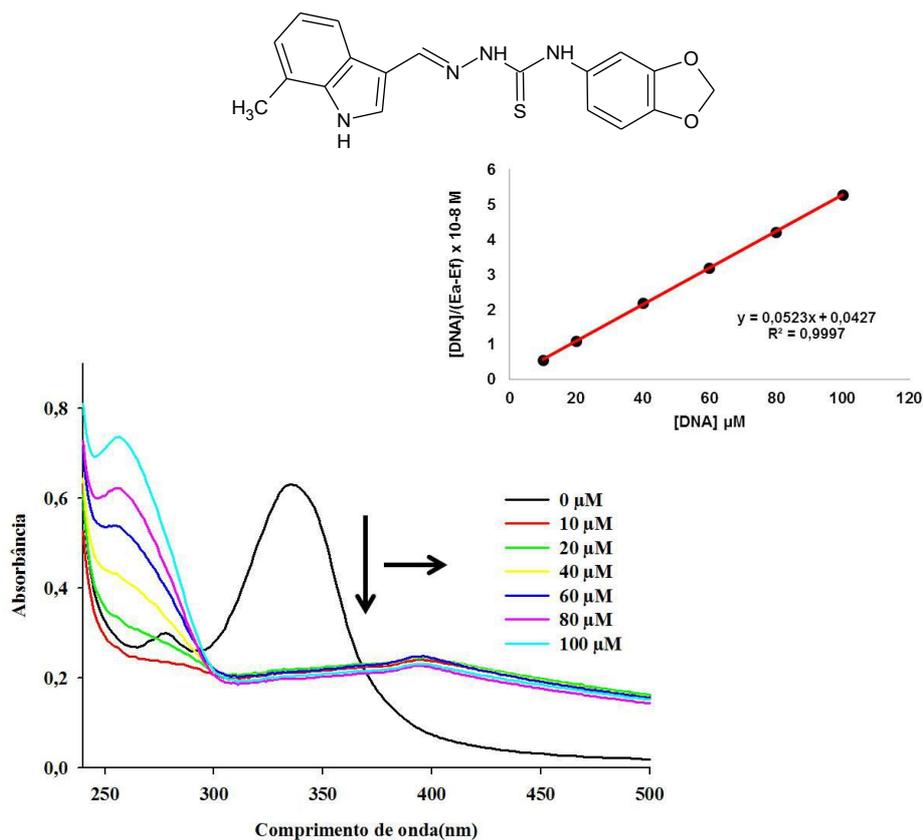


Quando os grupos cromóforos aromáticos das moléculas interagem com a estrutura da dupla hélice do DNA, ocorre mudanças nos espectros de absorção, tais como mudança para a região do vermelho ou azul, e também efeito hipercrômico e hipocrômico (HAJIAN et al., 2017).

Após a ligação com o DNA, os compostos analisados sofreram alteração nas propriedades espectroscópicas, apresentando aumento ou diminuição da intensidade de luz absorvida, caracterizando efeito hipercrômico e hipocrômico, respectivamente. Também ocorreram alterações na forma no comprimento de onda, com desvio para a região do vermelho (efeito batocrômico) e também para a região do azul (efeito hipsocrômico).

A maior hipocromicidade foi apresentada pelo LQIT/JF-264 de 215% (Figura40).

**Figura 40.** Maior hipocromicidade do derivado LQIT/JF-264



Além do efeito hipocrômico maior, observa-se também uma maior força de interação com o DNA, onde a constante de ligação apresentou um valor significativo,

$1,22 \times 10^6$ . Dessa forma, pode-se presumir que a mudança na posição do grupamento metil é favorável para essa interação.

O efeito hipocrômico tem relação com a interação com o DNA graças a interação entre os cromóforos presentes em solução, provenientes das porções de purina (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e timina) e da porção aromática dos derivados, que são responsáveis pelas diminuições das transições eletrônicas (diminuição nos níveis de elétrons) tornando a dupla hélice do DNA mais estável (SIRAJUDDIN et al., 2013). Esse efeito hipocrômico, acompanhado de um desvio para a região do vermelho, sugere a ocorrência de intercalação do composto e os pares de bases do DNA, devido a presença de sistemas poliaromáticos fundidos e contendo átomos de nitrogênio (indol) ligada ao sistema anelar, que conferem uma estabilidade a molécula. Resultados semelhantes foram descritos por Zhang *et al.* (2004), Ali *et al.* (2014) e Hajian *et al.* (2017).

Nos espectros de absorção dos derivados LQIT/JF-258, LQIT/JF-259, LQIT/JF-260, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266 (*Figura 37 e 38*), foi observado que a medida que a concentração do DNA aumenta, também aumenta o efeito hipercrômico, ocorrendo desvio para região do azul (efeito hipocrômico). A maior hipercromicidade foi apresentada pelo derivado LQIT/JF-260, de 50,25%. Segundo Hajian *et al.* (2017), isso caracteriza modo de interação por ligação ao sulco e/ou atração eletrostática ao DNA neste comprimento de onda. Devido à ruptura das ligações de hidrogênio da molécula de DNA, o que possibilita mais absorção de luz (HAJIAN et al., 2017).

O efeito hipercrômico pode acontecer também devido a interação eletrostática, ocorrida principalmente pela presença dos cátions e o grupamento fosfato da molécula de DNA, provocando uma alteração na conformação e estrutura. Os pares de bases do DNA ficam mais expostos, devido a desnaturação provocada pela formação do complexo DNA-fármaco, destruindo as ligações de hidrogênio, provocando um aumento na absorção de luz (efeito hipercrômico). Sugere-se que o modo de interação para os compostos que apresentaram hipercromicidade é ligação ao sulco no DNA ou atração eletrostática.

A constante de ligação ( $K_b$ ) dos derivados apresentou valores na ordem de  $10^4$  mols e  $10^6$  mols. A forma, polaridade, cadeias laterais, ausência e presença de núcleos aromáticos, como o indol, nos derivados podem influenciar nos modos de ligação ao DNA e na força de interação (ZANG et al., 2004).

#### 4.2.2. Avaliação dos resultados da interação com a BSA

Através da interação com substâncias como a albumina, as propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção), relacionadas diretamente ao efeito terapêutico do fármaco podem ser alteradas. Nesse contexto, as técnicas de espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de absorção UV-vis são comumente utilizadas para analisar quantitativamente a ligação dos compostos orgânicos à proteína, pois são técnicas fáceis e que apresentam resultados rápidos (SOSKIC et al., 2017).

#### 4.2.3. Espectroscopia de Absorção UV-Visível

A espectroscopia de absorção UV-visível é uma técnica que tem sido bastante utilizada como forma de obter dados de mudanças estruturais da proteína, bem como estudar a formação entre a proteína e a pequenas moléculas orgânicas. Na espectroscopia de absorção, os resíduos de triptofano presente na molécula da proteína são sensíveis a este ambiente e capazes de absorver luz (CHINNATHAMBI et al., 2014).

Além disso, segundo Belatik *et al.* (2012), a absorção ocorre devido aos esqueletos dos polipeptídeos e resíduos de aminoácidos aromáticos, como o Trp (triptofano), Tyr (tirosina) e Phe (fenilalanina).

Os resultados demonstram que Não foi verificada interferência em relação ao pico máximo de intensidade na região da albumina, ficando todos os derivados na intensidade de absorção máxima em 279 nm. Esse comportamento em relação às diferenças no comprimento de onda, dos compostos livres e ligados a albumina e outros dados avaliados, podem ser verificados logo abaixo na *Tabela 3*.

**Tabela 3** - Dados da espectroscopia de absorção UV-vis dos derivados tiossemicarbazona, na presença e na ausência da proteína Albumina (BSA).

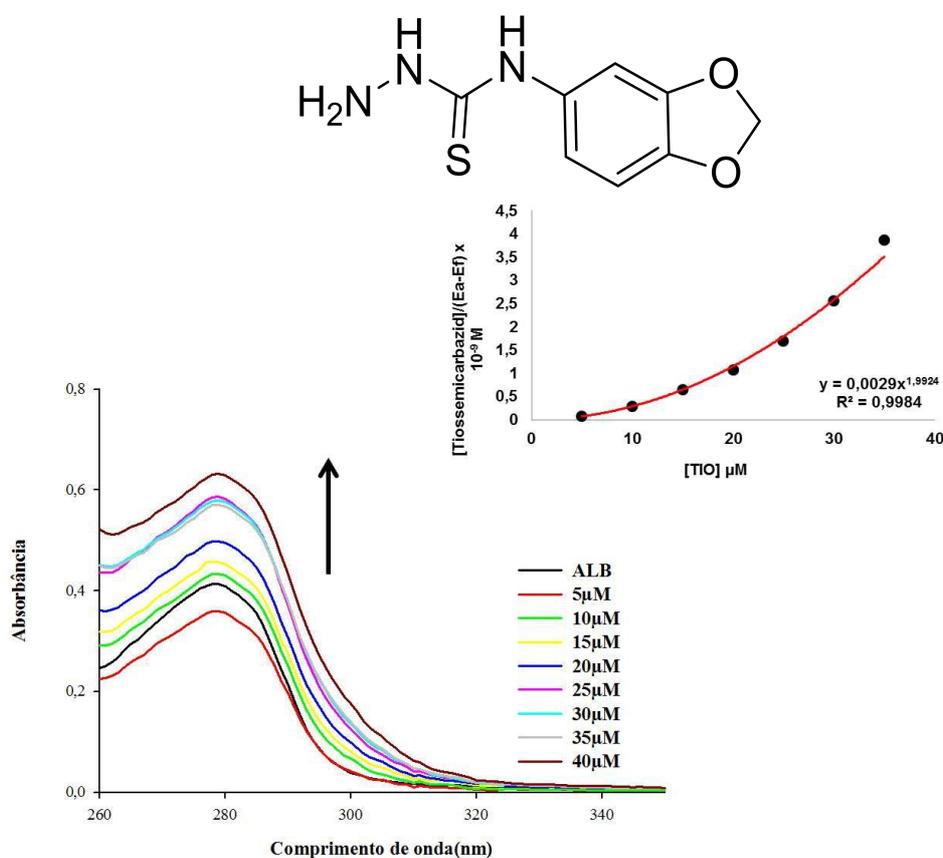
ABSORÇÃO						
Composto	$\lambda_{\max}$ livre (nm)	$\lambda_{\max}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocromicidade (%)	Hipercromicidade (%) <sup>a</sup>	Kb M <sup>-1</sup>
LQIT-JF-TDZA	279	279	0	-	69,84	1,14 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-257	279	279	0	-	60,78	1,29 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-258	279	279	0	-	60	8,69 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-259	279	279	0	-	48,82	5,24 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-260	279	279	0	-	67,68	1,16 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-262	279	279	0	-	74,53	9,87 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-264	279	279	0	-	34,99	7,42 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-265	279	279	0	-	66,15	1,09 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-266	279	279	0	-	68,05	1,27 x 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup>. Hipercomismo resultante da formação de complexo entre os derivados indólicos BSA em comparação com os ligantes livres.

<sup>c</sup>. Constante de Ligação intrínseca entre os derivados e a BSA.

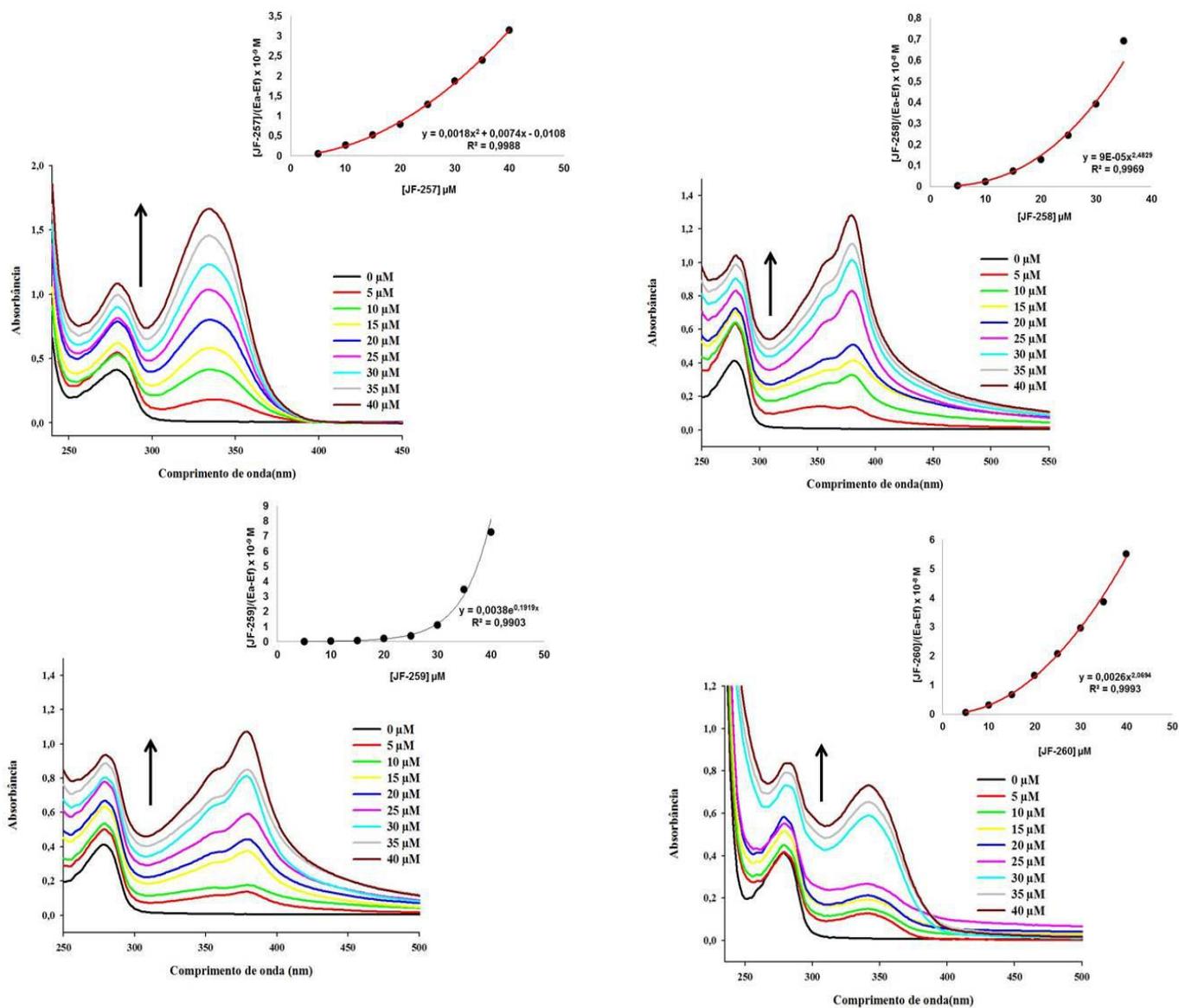
O derivado tiossemicarbazida, mostrou um comportamento diferente em relação aos demais derivados analisados. Sua absorção ocorreu entre os comprimentos de onda de 260 a 300 nm (Figura 41), mostrando também apenas uma banda de absorção máxima em 279 nm. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a ausência do núcleo indol, presente na estrutura dos demais derivados. Concluimos, portanto, que a presença ou ausência do núcleo indol nas estruturas pode afetar a interação com a albumina também.

**Figura 41.** Espectro de absorção do derivado LQIT/JF-TDZA em interação com albumina

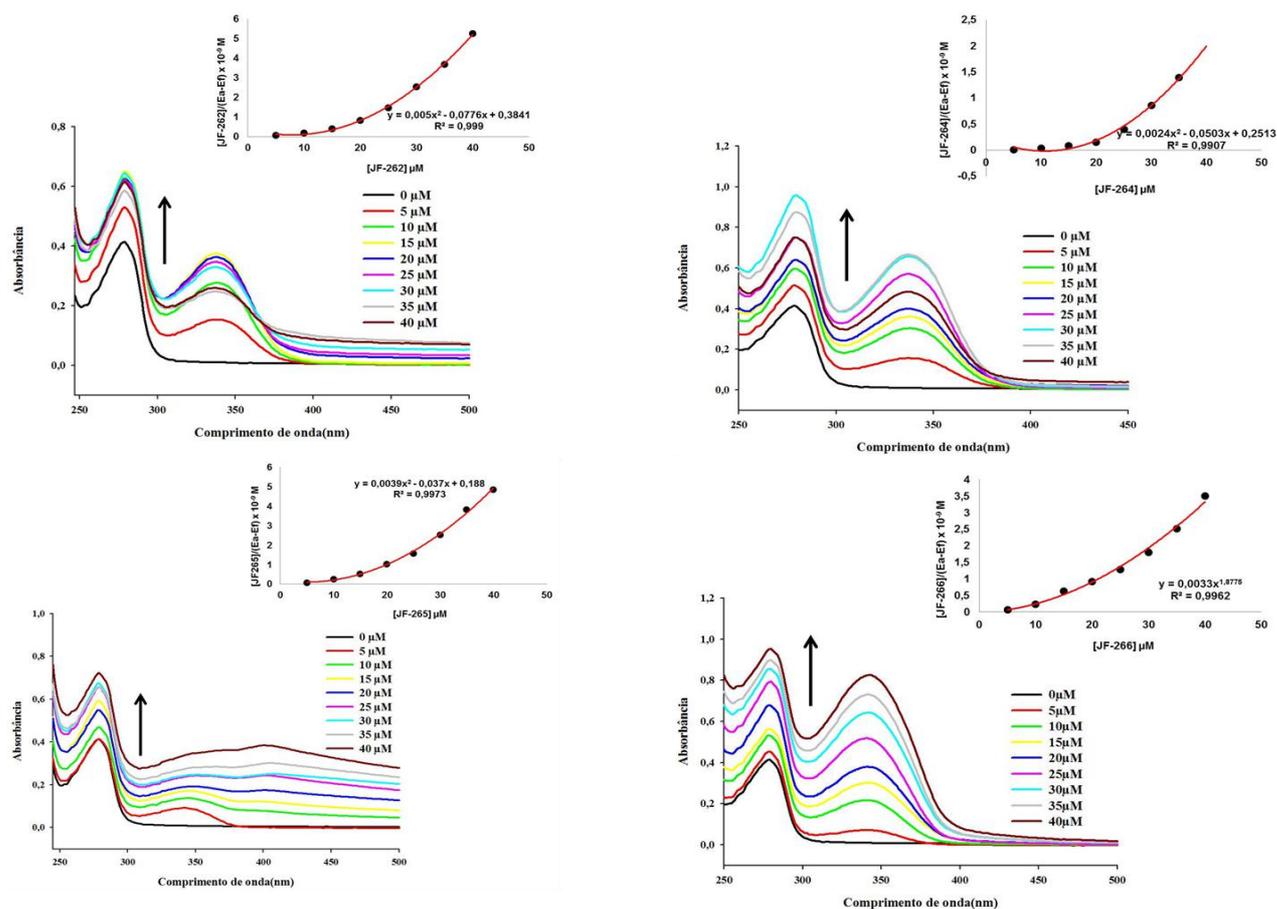


Nos derivados estudados, à medida que a concentração dos derivados aumentou, verificou-se um aumento no pico de absorção (efeito hiperacrômico) o que pode caracterizar a interação molecular, entre os derivados e a BSA. Isto pode ser observado em todos os compostos avaliados (Figuras 42).

**Figura 42.** Espectro de absorção dos derivados LQIT/JF 257 a 260 na presença de quantidades crescentes dos derivados (0,5, 10,15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{M}$  em contato com a concentração fixa 25 $\mu\text{M}$  de BSA. A curva de inserção é o gráfico de  $[\text{BSA}]/(\text{E}_a - \text{E}_f)$  em função da concentração de BSA, verificados conforme os dados obtidos nos espectros.



**Figura 43.** Espectro de absorção dos derivados LQIT/ JF-262, JF-264, JF-265 JF-266na presença de quantidades crescentes dos derivados (0,5, 10,15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{M}$  em contato com a concentração fixa 25 $\mu\text{M}$  de BSA. A curva de inserção é o gráfico de  $[\text{BSA}]/(\text{Ea} - \text{Ef})$  em função da concentração de BSA, verificados conforme os dados obtidos nos espectros.



A força de interação entre a albumina e os derivados JF's, foram calculados de acordo com a constante de ligação (Kb). O gráfico da curva de inserção  $[\text{JFs}]/(\text{Ea} - \text{Ef})$  versus  $[\text{LQIT/JFs}]$  foi construído para calcular o valor do Kb, que consiste na razão entre a inclinação e o intercepto (MCGHEE e VON HIPPEL, 1974).

As constantes de ligação (Kb) dos derivados apresentaram-se na ordem de  $10^4$  mols (LQIT/JF-258, LQIT/JF-259, LQIT/JF-262 e LQIT/JF-264) e  $10^5$  mols (tiossemicarbazida, LQIT/JF-255, LQIT/JF-260, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266).

Os compostos analisados, são capazes de se unirem aos sítios hidrofóbicos I e II nos subdomínios IIA e IIIA da proteína, onde é verificado a presença dos resíduos triptofano. Essa localização facilita, portanto, a interação do composto com a proteína. Segundo Belatik *et al.* (2012), isso acontece devido as suas porções aromáticas e heterocíclicas, presentes tanto no composto quanto nos aminoácidos.

Nos derivados analisados, à medida que foi aumentada a concentração dos compostos em contato com a proteína, houve um aumento da intensidade de absorção da BSA, mas não afetou o comprimento de onda de absorção máxima. Nesse contexto, de acordo com Singla *et al* (2016), isso implica que, o mecanismo de interação entre os derivados analisados e a albumina foi de natureza não covalente, ocorridas provavelmente devido ao empilhamento de elétrons  $\pi$  entre os anéis aromáticos dos compostos e os anéis de presentes nos resíduos de aminoácidos Trp, Tyr e Phe localizados nos sítios da BSA.

#### 4.2.4. Espectroscopia de fluorescência com BSA

Quando acontece a extinção de fluorescência, diz-se que ocorreu uma diminuição do rendimento quântico dessa fluorescência por meio dos fluoróforos que são induzidos a partir das variadas concentrações dos derivados(CHAVES *et al.*, 2018).

Os resíduos de triptofano e tirosina presente na proteína são os principais responsáveis pela emissão da fluorescência, no entanto quando a BSA se liga a compostos orgânicos esta poderá ser atenuada ou até mesmo ser extinta.

A fluorescência da proteína é característica da alta sensibilidade do triptofano e seu ambiente local. Quando ocorrem mudanças nos espectros de emissão de triptofano é devido às transições conformacionais de proteínas, ligação ao substrato ou desnaturação (BELATIK *et al.*, 2017). Nesse contexto, avaliando a fluorescência, poderemos obter informações a respeito da estrutura, mecanismos dinâmicos e estáticos e reações de interação do complexo fármaco-BSA.

Quando as moléculas se ligam especificamente na região que contém os resíduos de triptofano e são excitadas a 285 nm ocorre a extinção de fluorescência(TABASSAUM *et al.*, 2016).

Na análise dos derivados, o efeito de diminuição significativa da fluorescência ocorreu em todos os derivados no comprimento de onda entre 310-380 nm. Na *Tabela 4* poderão ser verificados os comprimentos de onda de absorção máxima dos derivados ligados e livres e outros dados espectrofluorimétricos obtidos.

**Tabela 4** - Dados da espectroscopia de fluorescência dos derivados tiossemicarbazona, na presença e na ausência da proteína Albumina (BSA).

FLUORESCÊNCIA								
Composto	$\lambda_{\max}$ livre (nm)	$\lambda_{\max}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)	Bandas Exc_Emi (nm)	Hipocromicidade (%) <sup>a</sup>	Ksv (M <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
LQIT/TDZA	343	342	1	285	343	2,5	13,21%	6,5 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-257	343	344	1	285	343	2,5	81%	1,8 x 10 <sup>3</sup>
LQIT/JF-258	343	343	0	285	343	2,5	21,9%	4,6 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-259	343	342	1	285	343	2,5	22,43	4,4 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-260	343	342	1	285	343	2,5	27%	4,3 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-264	343	343	0	285	343	2,5	55,28%	4,4 x 10 <sup>4</sup>
LQIT/JF-265	343	332	1	285	343	2,5	34,97%	1,6 x 10 <sup>5</sup>
LQIT/JF-266	343	342	1	285	343	2,5	34,97%	7,3 x 10 <sup>5</sup>

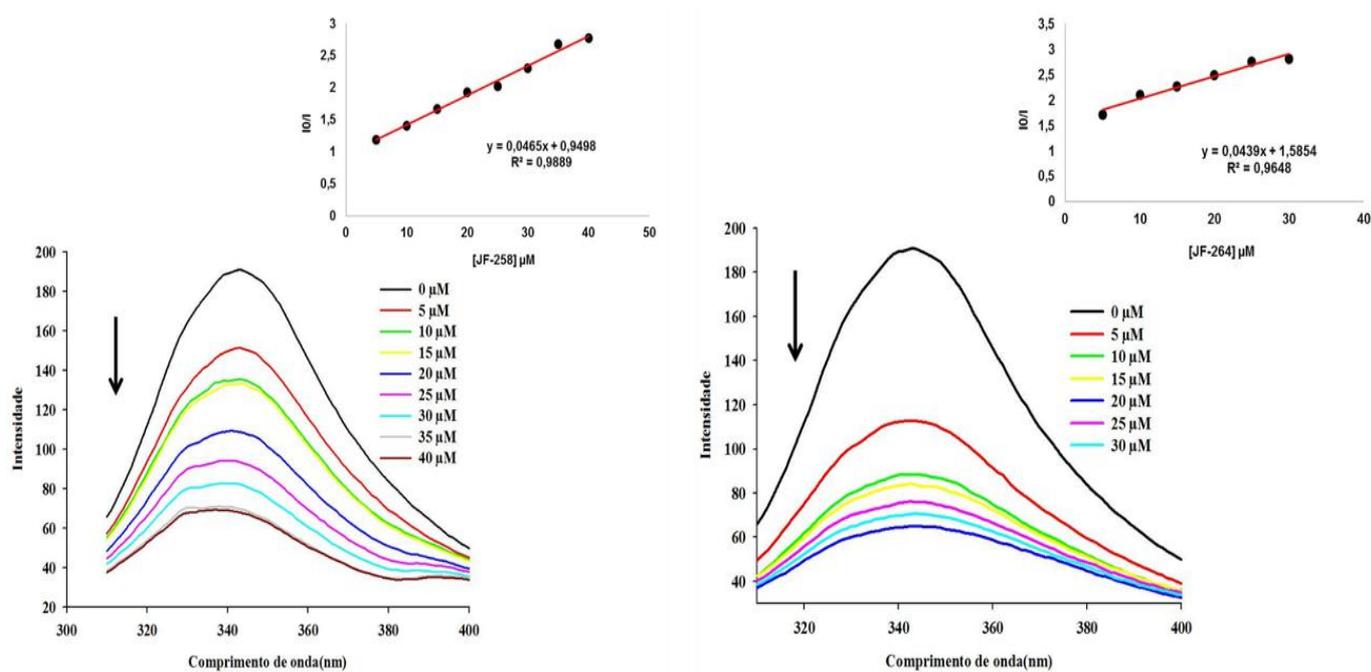
Para calcular a porcentagem do efeito hipocrômico foi utilizado a concentração de 5  $\mu$ M.

<sup>a</sup>. Hipocromismo resultante da formação de complexo entre os derivados indólicos BSA em comparação com os ligantes livres.

<sup>b</sup>. Constante de supressão de Stern–Volmer, KSV, obtida a partir dos dados de fluorescência com ctDNA.

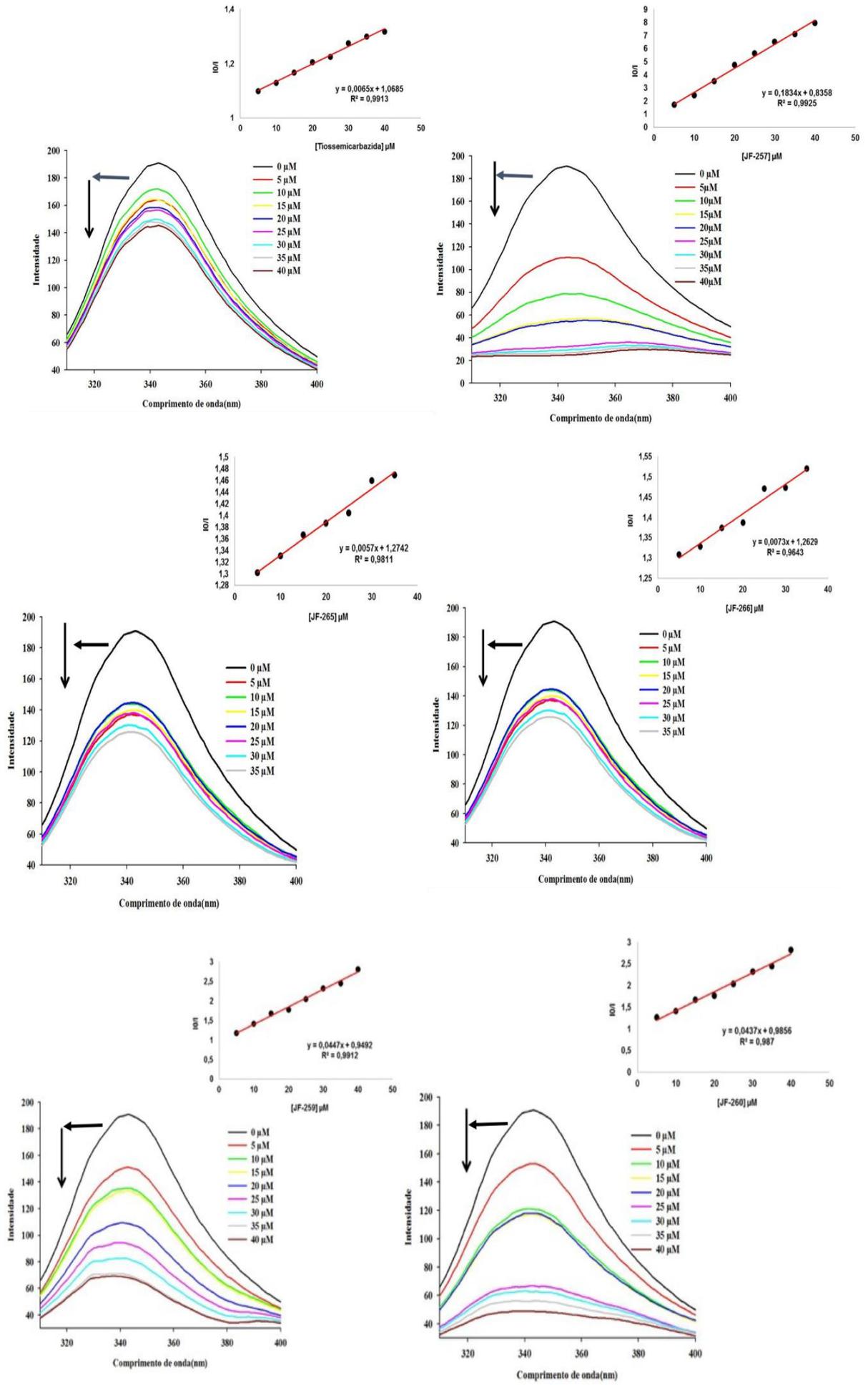
O efeito hipocrômico, ou seja, a diminuição da fluorescência ocorreu à medida que foi aumentada a concentração do composto. Apenas os derivados LQIT/JF-258 e LQIT/JF-264, não tiveram nenhuma alteração quanto ao desvio do pico de intensidade de absorção máxima depois de ligado com a albumina. (Figura 44)

**Figura 44.** Espectro de fluorescência dos derivados LQIT/JF-258 e LQIT/JF-264.



Os demais derivados tiossemicarbazida, LQIT/JF-257, LQIT/JF-259, LQIT/JF-260, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266, apresentaram um pequeno desvio, de 1 nm, para a região do azul (hipsocrômico). (Figura 45)

**Figura 45.** Espectros de fluorescência dos derivados tiossemicarbazonas. LQIT/JF-257, LQIT/JF-259, LQIT/JF-260, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266 evidenciando o desvio para a região do azul.



De acordo com Raja *et al.* (2011) e Tabassum *et al.* (2016), o efeito hipocrômico é caracterizado, principalmente ao fato de que a ligação fármaco-proteína ocorre dentro da cavidade hidrofóbica da BSA.

A diminuição da intensidade de fluorescência, à medida que aumenta a concentração do composto bem como o desvio no seu maior pico de absorção para a região do azul, sugerem que essa interação fármaco-proteína torna o ambiente local em torno do triptofano mais hidrofóbico.

A extinção da fluorescência pode ocorrer de duas formas: estático, quando ocorre formação de complexo entre os ligantes (derivados) e o fluoróforo (BSA), provocando alterações nos espectros de absorção, no estado fundamental; enquanto que o mecanismo de extinção dinâmica, ocorre por meio da colisão entre os ligantes e os fluoróforos, não causando alteração nesses espectros.

Dessa forma, corroborando com os resultados obtidos durante a análise na espectroscopia de absorção UV-vis (onde ocorreu um efeito hiper-crômico da absorção da albumina), os dados indicam que o mecanismo de extinção fluorescente, na presença dos derivados, foi de natureza estática.

A constante de extinção de fluorescência ( $K_{sv}$ ) foi encontrada pela equação de Stern-Volmer, onde o máximo do efeito foi na ordem de  $10^5$ . O derivado LQIT/JF-265 e LQIT-JF-266 apresentaram o mesmo percentual de hipocromismo, 34,97%, porém o valor de  $K_{sv}$  foi maior para o derivado LQIT/JF-266 ( $7,3 \times 10^5$ ). Indicando que a posição dos substituintes Br e  $CH_3$ , influenciam na melhor capacidade de ligação com a albumina.

O derivado LQIT/JF-257 apresentou uma magnitude menor, na ordem de  $10^3$ . No entanto, o mesmo apresentou um hipocromismo de 81%. Isso significa que o efeito hipocrômico não está relacionado a maior força de ligação.

#### 4.3. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS EM LINHAGENS DE CÂNCER DA MAMA (MCF-7 E MDA-MB-231)

Os compostos sintetizados foram testados tanto numa linhagem de câncer da mama epitelial e menos agressiva (MCF-7), assim como numa linha de câncer da mama mesenquimal e mais agressiva (MDA-MB-231), com o objetivo de testar a sua ação anticancerígena e viabilizando assim novas entidades farmacológicas que possam ser eficazes no tratamento de diversas neoplasias.

Desta forma, para cada composto foi determinado qual a concentração ( $IC_{50}$ ) que resultava em 50% da inibição do crescimento celular destas duas linhas celulares (*Tabela* ).

**Tabela 5** – Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) dos derivados Tiossemicarbazonas testados em linhas de câncer da mama- MCF-7 e MDA-MB-231.

<b>Composto</b>	<b>Linhagem Celular</b>	
	<b>MCF-7</b>	<b>MDA-MB-231</b>
LQIT/JF-01	8,1	3,0
LQIT/JF-257	19,3	14,0
LQIT/JF-258	17,6	14,0
LQIT/JF-259	10,2	15,7
LQIT/JF-260	19,6	14,7
LQIT/JF-262	9,7	5,9
LQIT/JF-264	11,2	5,2
LQIT/JF-265	8,4	13,1
LQIT/JF-266	11,7	15,5

Tendo em conta os valores de  $IC_{50}$  determinados para as duas linhas celulares utilizadas, destaca-se o fato de em todos os compostos (com exceção dos compostos LQIT/JF-259, LQIT/JF-265 e LQIT/JF-266) o valor determinado ser inferior para a linha MDA-MB-231 do que para MCF-7. Isto significa que para a grande maioria dos comportos a sua actividade é mais eficaz contra uma linhagem mais agressiva, sendo que para estes compostos é necessária uma menor dose de composto para irradiar 50% das células cancerígenas MDA-MB-231, quando comparados com os valores apresentados para as células MCF-7, que se trata de uma linha cancerígena menos agressiva.

De todos os compostos testados, o derivado LQIT/JF-01, tiossemicarbazida, foi o que apresentou melhor actividade em ambas as linhas celulares, com um valor de  $IC_{50}$  determinado de 8.1  $\mu M$  e 3.0  $\mu M$  para MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente. Esse composto é o intermediário de síntese (TDZA), onde o núcleo indol não está presente. Podemos então considerar que este composto se apresenta como um potencial agente anti-

cancerígeno pois, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), um potencial agente anti-cancerígeno tem o seu valor de  $IC_{50}$  é inferior ou igual a  $4,0 \mu M$ .

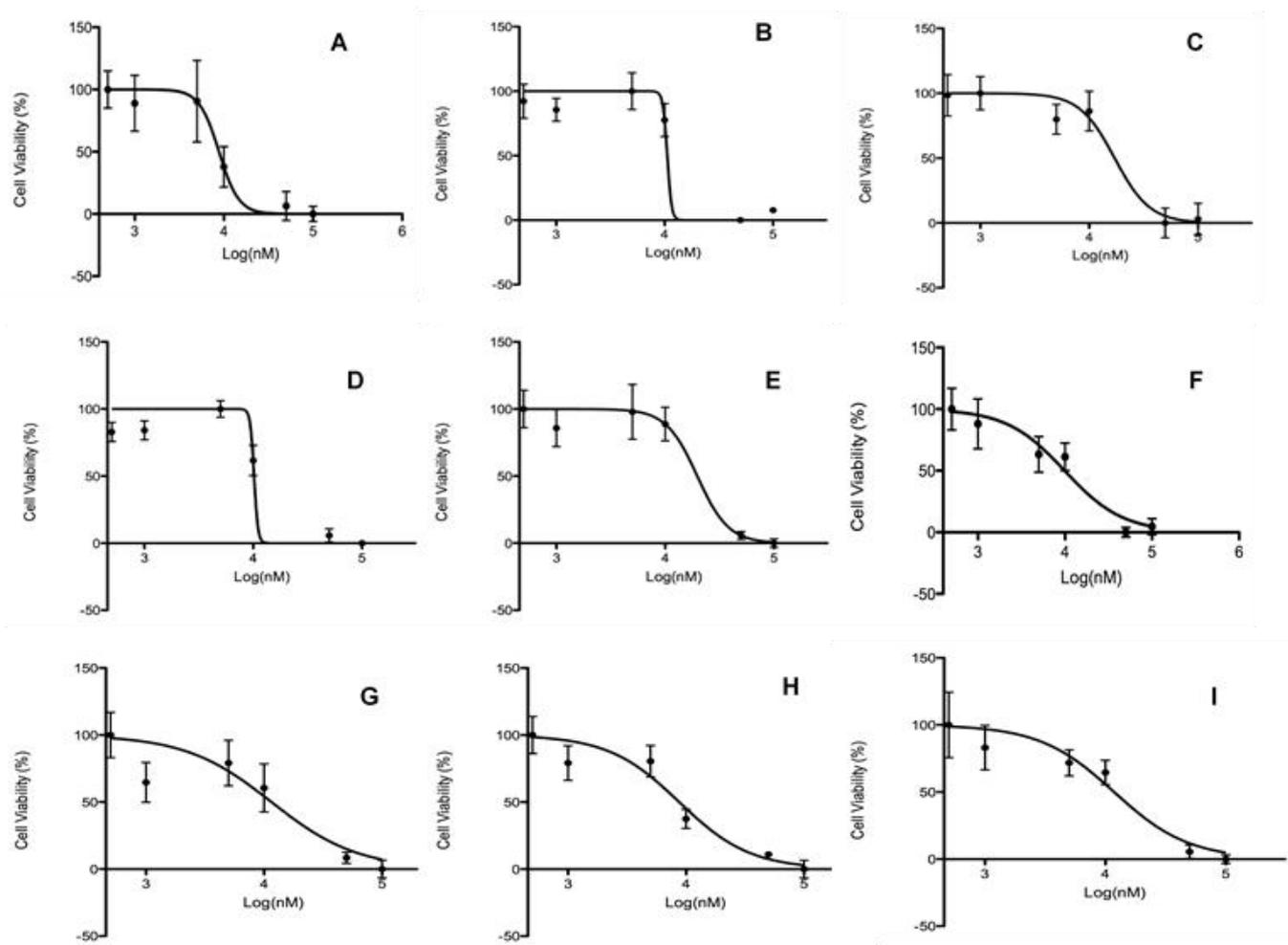
Analisando as curvas dose-resposta destes comportos nas células MCF-7 (Figura 46) verifica-se que o comportamento do composto LQIT.JF-01 destaca-se dos restantes compostos testados. Da mesma forma, os compostos LQIT.JF-262, LQIT.JF-264, LQIT.JF-265 e LQIT.JF-266 apresentam uma curva dose-resposta semelhante, assim como os compostos LQIT.JF-260 e LQIT.JF-258 e os compostos LQIT.JF-259 e LQIT.JF-257.

Isto significa que em termos de interação com os componentes moleculares da célula cancerígena podem provavelmente ser semelhantes, no entanto, apenas os compostos LQIT.JF-259, LQIT.JF-265 e LQIT.JF-266 é que apresentam um valor de  $IC_{50}$  inferior ao apresentando para as células MDA-MB-231 (*Tabela* ).

O segundo melhor composto da série é o LQIT-JF-264, que apresentou um valor de  $IC_{50}$  que é o segundo mais baixo ( $5,2 \mu M$ ) nas células MDA-MB-231, no entanto ainda é acima do derivado TDZA. Este facto pode ser explicado pela inserção do radical metil na estrutura deste composto.

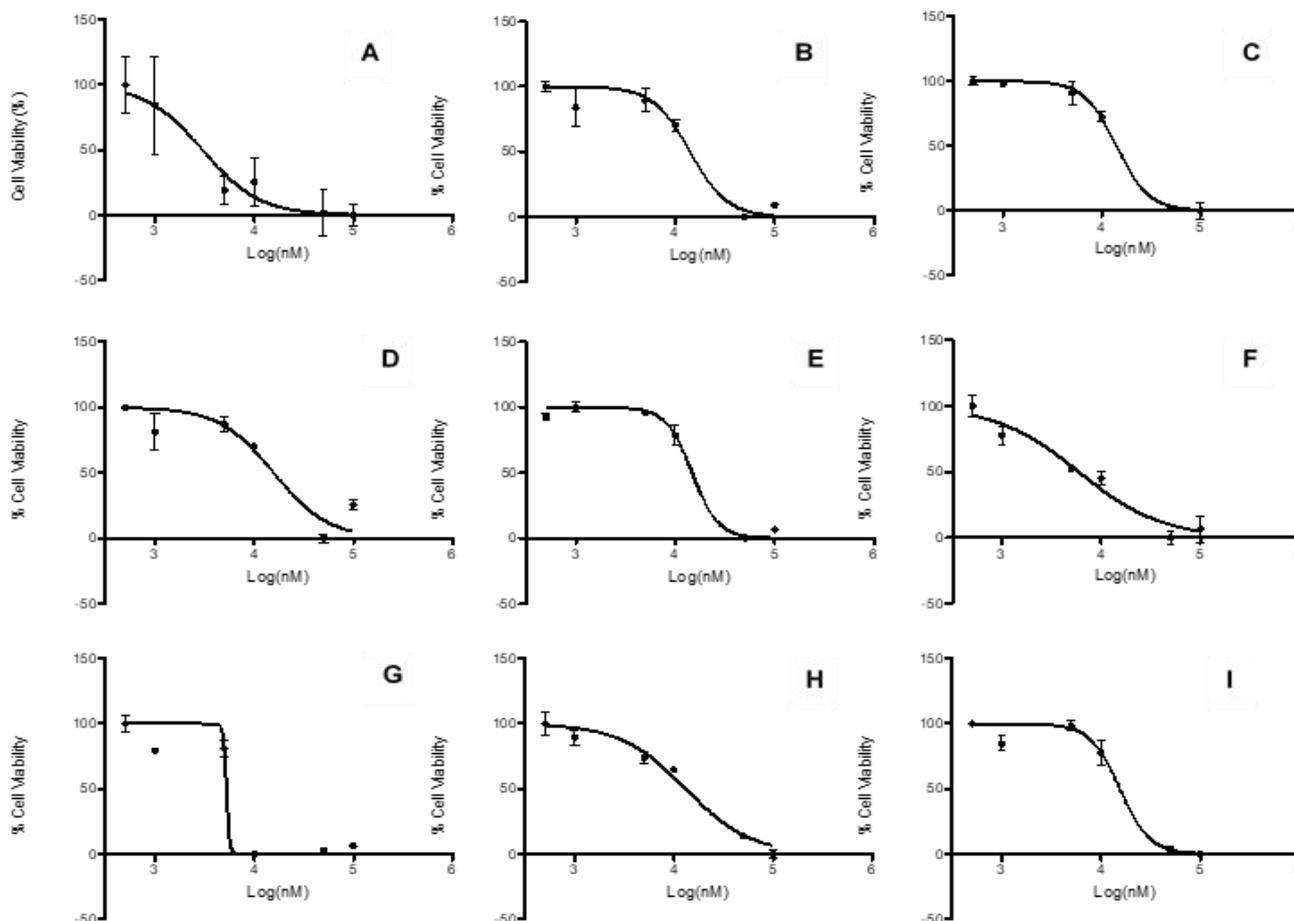
Os resultados do ensaio de viabilidade aliados aos resultados da análise da estrutura dos compostos testados, conclui-se que o núcleo indol pode ter uma relação direta com a atividade citotóxica de cada um dos compostos. Ora aumentando, ora diminuindo sua atividade. Relativamente aos restantes compostos, uma vez que a diferença estrutural se encontra apenas nas variações dos substituintes e nas suas posições, pode-se concluir que estas não afetam a sua actividade anti-cancerígena nem melhoram o  $IC_{50}$ .

**Figura 46.** Curvas dose-resposta dos compostos LQIT/JFs em células MCF-7, após 72 horas de incubação.



Quando estes mesmos compostos são incubados com as células MDA-MB-231, a curva dose-resposta que cada um apresenta modifica-se (*Figura 47*), o que pode ser indicativo de que os mesmos compostos não interagem com os componentes membranares da mesma forma, supostamente devido às estruturas químicas e seus substituintes.

**Figura 47.** Curvas dose-resposta dos compostos LQIT/JFs em células MDA-MB-231, após 72 horas de incubação.



Ao contrário do que aconteceu com as células MCF-7, o composto LQIT.JF-264 foi o único que apresentou uma curva dose-resposta diferente das restantes. Apenas os compostos LQIT.JF-258, LQIT.JF-260, LQIT.JF-262 e LQIT.JF-265 são os que mantêm uma curva dose-resposta igual nas duas linhas celulares utilizada. Isto pode ser indicativo de que estes compostos podem actuar nos mesmos componentes celulares nestas duas linhas.

Em ambos os casos, as curvas dose-resposta de cada um dos compostos são representativas de uma resposta dependente da concentração do fármaco na qual, a viabilidade celular decresce com o aumento da concentração do composto testado.

É a sobre-expressão da bomba de efluxo P-gp que torna as células cancerígenas resistentes a um dado fármaco anti-cancerígeno, dado que esta proteína tem a capacidade de transportar o fármaco contra o seu gradiente de concentração e impedir que este se acumule

no interior da célula(SUI et al., 2012; KATAYAMA et al., 2014). Desta forma, quanto mais agressiva e resistente uma linha cancerígena for maior a sua expressão de P-gp.

No entanto, de acordo com o trabalho de Delou *et al.* (2017), quanto mais agressiva for a linha cancerígena e, desta forma, pior o diagnóstico do paciente, menor a expressão deste transportador de efluxo(DELOU et al., 2005). Os resultados aqui obtidos estão de acordo com o trabalho de Delou *et al.* (2017), uma vez que a maioria dos compostos foi mais eficaz nas células MDA-MB-231, que são caracterizadas como sendo mais tumorogênicas e com pior diagnóstico, visto que o valor de IC<sub>50</sub> determinado foi inferior quando comparado com as células MCF-7 para os mesmos compostos. Este menor valor poderá ser o resultado de uma maior acumulação destes compostos intracelularmente, como resultado da inatividade da P-gp sobre estes compostos.

Por outro lado, estes compostos podem atuar sobre ao nível da expressão da P-gp, e até da alteração da sua conformação. De acordo com o trabalho feito por Chung *et al.* (2005), a utilização de compostos naturais, podem reverter o fenótipo MDR (do inglês Multidrug resistance) através da inibição a expressão da P-gp(CHUNG et al., 2005). Se partirmos do princípio que o mesmo é aplicável aqui, estes compostos ao atuarem sobre a P-gp inibem a sua função e, conseqüentemente, o composto acumula-se no interior da célula e actua sobre o seu alvo.

Este efeito será mais visível na linha celular que inicialmente já tinha uma maior expressão de P-gp (MDA-MB-231), no qual ao fim de 72 horas de incubação com os compostos, os níveis de expressão desta proteína podem ter sido reduzidos a níveis tão baixos para os quais a célula pode não ter conseguido dar uma resposta no sentido de repor esses níveis. No caso das células MCF-7, como os níveis de P-gp são inferiores aos níveis das células MDA-MB-231, visto que se trata de uma linha menos agressiva, mesmo que os compostos testados actuem sobre a P-gp que as células expressam num nível basal, há-de sempre haver uma percentagem do composto testado que vai atravessar a membrana e acumular-se intracelularmente, uma vez que as células MCF-7 não apresentam os mesmo níveis de P-gp que as células MDA-MB-231.

Claro que todas estas hipóteses necessitam de mais experiências, e o nível de expressão da P-gp teria de ser comprovado para cada uma das concentrações e compostos testados por, por exemplo, RT-qPCR ou Western Blot.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Através do ensaio de suscetibilidade *in vitro* de cultura de *Plasmodium falciparum* 3D7, usando SYBR Green I (MSF), foi calculado o IC<sub>50</sub>, que representa a concentração de composto necessária para inibir 50% da atividade do parasito. A determinação do valor de IC<sub>50</sub> foi obtida a partir de uma curva dose-resposta e usando uma regressão não linear. Os dados foram plotados utilizando o do Software GraphPad prism, versão 5.0 para MAC.

Os 9 compostos foram avaliados em triplicados e com o mínimo de dois ensaios. Assim, foi possível avaliar o IC<sub>50</sub> em nanomolar (nM), através de uma curva dose-resposta para o intervalo de concentrações testadas (10.000-0.1692nM), bem como o desvio padrão de 3 compostos em todos os 3 ensaios (*Tabela* ).

Os demais não apresentaram uma curva dose-reposta, e por isso não foi possível avaliar o IC<sub>50</sub> até a concentração inibitória máxima de 10 µM. Possivelmente os outros compostos apresentariam atividade acima da concentração testada, o que não é ideal como fármaco antimalárico neste estudo. Os valores máximos desejáveis e ideal para um antimalárico variam, podendo ser por volta dos 20 nM (CQ) ou dos 800 nM (quinino) para uma estirpe sensível. Muito embora, há fármacos utilizados na clínica onde a concentração na faixa de micromolar, como é o caso do desferroxamina (DFO) que tem o IC<sub>50</sub> por volta de 20 µM<sup>129</sup>.

A Cloroquina foi utilizada como controle positivo nestes ensaios.

**Tabela 6** - IC<sub>50</sub> dos derivados LQIT/JF no ensaio de susceptibilidade *in vitro* de *P. falciparum* (3D7) em nanomolar (nM).

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> -E1	IC <sub>50</sub> -E2	IC <sub>50</sub> -E3	IC <sub>50</sub> (média)	Desvio Padrão
LQIT/JF-TDZA	3058	4048	3515	3540,3	495,5
LQIT/JF-259	2365	5368	2021	2877,3	1198,1
LQIT/JF-260	X	870,6	680	775,3	134,8
Cloroquina	4,815	5,379	11,0	7,1	3

Os compostos LQIT/JF-259, e o LQIT/JF-260, *Figuras 49 e 50*, respectivamente, foram os que apresentaram melhores resultados, tanto em relação ao desvio padrão, quanto na média dos IC<sub>50</sub> (3,2 µM e 0,7 µM, respectivamente), e isto pode caracterizar compostos promissores em relação a atividade anti-malária. Ambos os compostos possuem a mesma estrutura química, diferenciando apenas em relação aos seus substituintes, na mesma posição, o derivado LQIT/JF-259, o grupo metoxi, e o LQIT/JF-260, que possui o grupamento ciano. O destaque para o LQIT/JF260 que poderá vir a ser um excelente promissor a fármaco antimalárico. A influência dos diferentes substituintes ou a inserção do núcleo indol pode caracterizar a melhora em relação a atividade do composto na estirpe 3D7 de *Plasmodium falcipaum*.

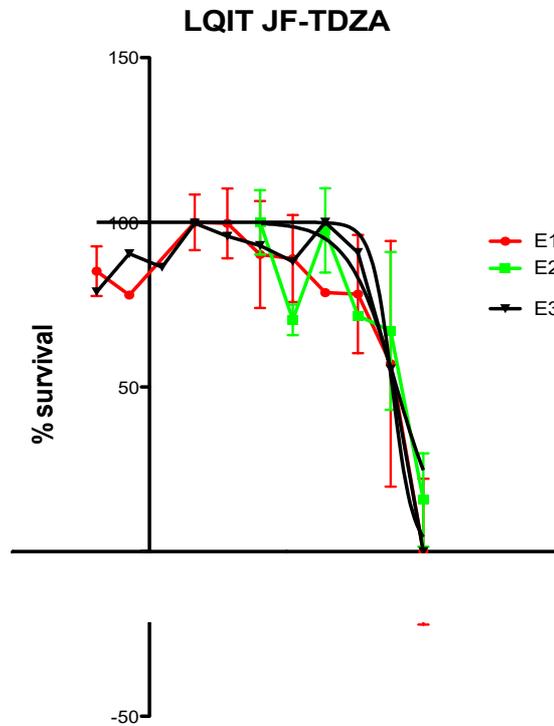
Em estudos publicados, os indóis são um fragmento antimalárico emergente presente em vários fármacos com novos mecanismos de ação, como as classes espiroindolona(BURROWS et al., 2013) e aminoindoles(CARVALHO et al., 2013). Nos resultados de Alexandra P. *et al.* (2014), derivados indólicos mostraram uma ampla gama de atividades citostáticas, variando de altamente ativo (IC<sub>50</sub> = 25 nM contra W2) a pouco ativo (IC<sub>50</sub> = 2,5 µM, contra 3D7)(PAULO et al, 2014).

Compostos relatados por Walcourt *et al.* (2013), com a porção Tiossemicarbazonas presentes também na estrutura de todos os derivados da série JF, afetaram todas as fases do desenvolvimento do *P. falciparum* (fase de anel, trofozoito e esquizontes) com concentrações de 10,3 e 3,6 µM (WALCOURT et al., 2013).

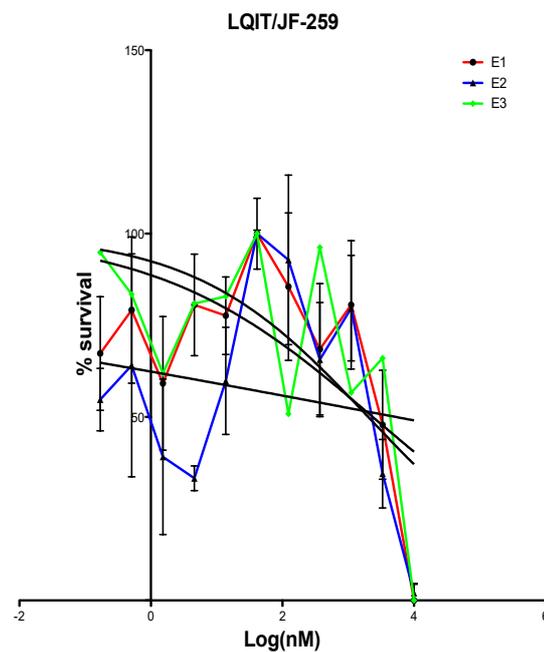
O derivado LQIT/JF TDZA, que é o intermediário de síntese, e não apresenta o núcleo indol em sua estrutura, apresentou o IC<sub>50</sub> mais elevado, no entanto, em relação a curva dose-reposta (*Figura 48*), que caracteriza a estabilidade do composto, esta apresentou coerência nos 3 ensaios.

Quando se trata de desvio padrão, o composto LQIT/JF 259 foi o que apresentou o pior desvio padrão, apesar de um IC<sub>50</sub> na concentração de 3 µM, o desvio padrão de 1841 pode revelar um composto pouco estável.

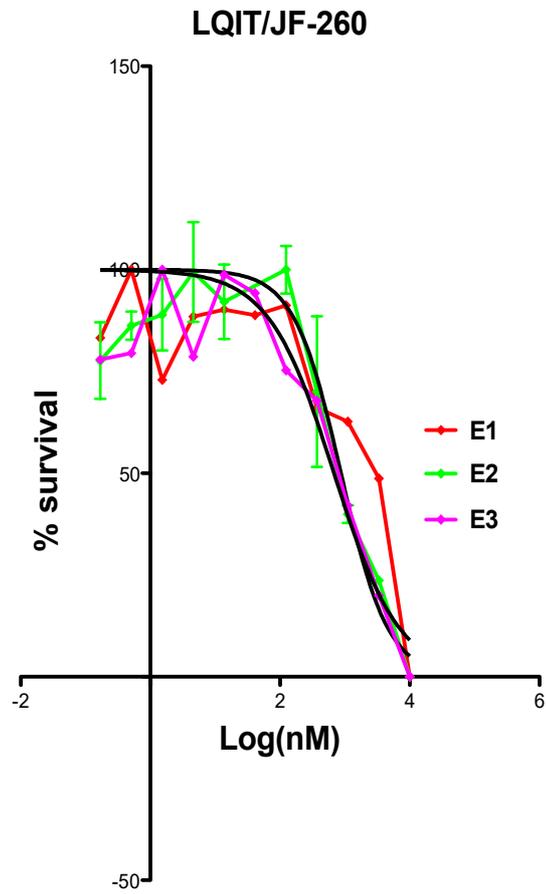
**Figura 48.** Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade *in vitro* de *P. falciparum* (3D7) LQIT/JF-TDZA.



**Figura 49.** Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade *in vitro* de *P. falciparum* (3D7) LQIT/JF-259



**Figura 50.** Representação da curva dose resposta gerada com o ensaio de susceptibilidade *in vitro* de *P. falciparum* (3D7) LQIT/JF-260.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E NOVAS PERSPECTIVAS

Os novos derivados LQIT/JFs, foram obtidos através de uma rota de síntese eficiente, rápida e com rendimento favorável. Tiveram suas estruturas químicas confirmadas a partir de caracterização de RMN<sup>1</sup>H, espectroscopia de massas.

Os derivados LQIT/JFs, mostraram que os resultados podem sugerir uma boa afinidade de interação com o DNA. O LQIT/JF-TDZA foi destaque e mostrou constantes de ligação (K<sub>b</sub>) na faixa de  $1,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  bem como uma maior atividade antiproliferativa na linha celular mais agressiva MDA-MB-231, com IC<sub>50</sub> de 3 μM.

Os resultados apresentados podem nos dar uma visão a cerca do mecanismo de interação entre os derivados e o DNA, que ora aconteceu por intercalação entre os pares de base, ora por ligação ao sulco. Essa interação com o DNA, e a atividade antiproliferativa, pode sugerir que a atuação do composto seja impedir a divisão celular.

Já em relação aos valores de ligação a BSA, podemos concluir que de acordo com a constante de interação (K<sub>b</sub>), os compostos apresentaram uma boa afinidade de ligação aos resíduos de triptofano presente nos sítios hidrofóbicos desta esta proteína.

Em relação a atividade antimalárica, 3 derivados apresentaram uma inativação das formas eritrocitárias do parasito. Atenção especial para o composto LQIT/JF-260. Foi o mais ativo, com IC<sub>50</sub> de 0,77 μM e portanto, pode ser considerado como um promissor fármaco antimalárico. Essa informação é importante e servirá de base para incrementar estudos posteriores, como investigar o mecanismo de ação pelo qual ele atua contra o parasito.

Uma característica que podemos observar diante dos dados é que as estruturas químicas dos derivados, a ausência e presença do núcleo heterocíclico indol, bem como seus substituintes, são recursos que podem aumentar ou diminuir a afinidade de ligação com biomoléculas estudadas.

Notadamente, o núcleo heterocíclico indol, o benzodioxol e a porção tiossemicarbazonas são scaffolds promissores na síntese de derivados antimaláricos e antitumorais, e pudemos perceber em nossos achados que os derivados estudados podem ser usados na pesquisa para novos fármacos.

Por outro lado, os dados apresentados não são conclusivos e não podem por si só afirmar que os derivados podem ser usados como moléculas promissoras destas problemáticas. Nesse sentido, faz-se necessários estudos adicionais que possam corroborar os achados e melhorar as perspectivas futuras.

Assim, novas técnicas darão continuidade aos estudos desse trabalho, tais como:

- Dicroísmo circular e viscosidade para incrementar os estudos com DNA e BSA.
- Mecanismo de ação, através do ensaio de inibição da topoisomerase, enzima que participa do processo de replicação do DNA:
- Mecanismo de inibição dos cristais de hemozoína, que faz parte do metabolismo do *Plasmodium falciparum*
- Docking molecular para prevê a melhor orientação entre a molécula biológica (BSA) e os derivados LQIT/JFs;

## REFERÊNCIAS

- ADWAS, A. A. ., Elkhoely, A. A. ., Kabel, A. M. ., Abdel-Rahman, M. N. & Eissa, A. A. **Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice.** *J. Infect. Chemother.* 22, 36–43, 2016.
- AHMAD, A. et al. **Mechanisms and Therapeutic Implications of Cell Death Induction by Indole Compounds.** *Cancers (Basel).* 3, 2955–2974, 2011.
- AHN, S. G.; Kim, S. J.; Kim, C.; Jeong, J. **Molecular classification of triple-negative breast cancer.** *J. Breast Cancer* 19, 223–230, 2016.
- AL-OTAIBI, J. S. ., Spittle, P. T. & El Gogaryce, T. M. **Interaction of anthraquinone anti-cancer drugs with DNA:Experimental and computational quantum chemical study.** *J. Mol. Struct.* 1127, 751–760, 2017.
- ALCOLEA, V. et al. **Chalcogen containing heterocyclic scaffolds: New hybrids with antitumoral activity.** *Eur. J. Med. Chem.* 123, 407–418, 2016.
- ALI, A. Q. et al. **Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding and cleavage activities.** *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 125, 440–448 (2014).
- ALI, A.; Bhattacharya, S. **DNA binders in clinical trials and chemotherapy.** *Bioorg. Med. Chem.* 22, 4506–4521, 2014.
- ALMEIDA, S. M. V. de et al. **New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases.** *Int. J. Biol. Macromol.* 92, 467–475, 2016.
- ANDRICOPULO, A., Salum, L.; Abraham, D. **Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry.** *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 771–790, 2009.
- ARIEY, F. et al. **A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria.** *Nature* 505, 50–55 2014.
- ASAADI, S.; Hajian, R. **DNA binding studies of Sunset Yellow FCF using spectroscopy, viscometry and electrochemical techniques.** *J. Mol. Struct.* 1146, 861–867, 2017.
- ASHLEY, E. A., Pyae Phy, A.; Woodrow, C. J. **Malaria.** *Lancet (London, England)* 391, 1608–1621, 2018.
- AVELLAR, W. de O. et al. **Cancer patent scenario in Brazil: Analysis of competitive advantages.** *J. Cancer Policy* 12, 28–33, 2017.
- BARREIRO, E. J. ., Fraga, C. A. M. ., Miranda, A. L. P. ; Rodrigues, C. R. **A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-Protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos.** *Quim. Nova* 25, 129–148, 2002.

- BARTEK, J., Bartkova, J.; Lukas, J. **DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression.** *Oncogene* 26, 7773–7779, 2007.
- BARTKOVA, J. et al. **DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis.** *Nature* 434, 864–870, 2005.
- BARTSCH, R.; Ziebermayr, R.; Zielinski, C. C.; Steger, G. G. **Triple-negative breast cancer.** *Wiener Medizinische Wochenschrift* 160, 174–181, 2010.
- BEKHIT, A. A., Hymete, A., Damtew, A., Mohamed, A. M. I.; Bekhit, A. E.-D. A. **Synthesis and biological screening of some pyridine derivatives as anti-malarial agents.** *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27, 69–77, 2012.
- BELATIK, A.; Hotchandani, S.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H.-A. **Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins.** *PLoS One* 7, e36723, 2012.
- BERA, R.; Sahoo, B. K.; Ghosh, K. S.; Dasgupta, S. **Studies on the interaction of isoxazolcurcumin with calf thymus DNA.** *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 14–21, 2008.
- BHARTI, N. et al. **Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 3475–3478, 2002.
- BOYER, A.-S.; Walter, D.; Sørensen, C. S. **DNA replication and cancer: From dysfunctional replication origin activities to therapeutic opportunities.** *Semin. Cancer Biol.* 37–38, 16–25, 2016.
- BURROWS, J. N., Hooft van Huijsduijnen, R., Möhrle, J. J., Oeuvray, C. & Wells, T. N. **Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication.** *Malar. J.* 12, 187, 2013.
- CANALS, A. ., Purciolas, M., Aymami, J.; Coll, M. **The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs.** *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 51, 1009–1012, 2005.
- CARVALHO, P. A.; Coelho, L.; Martins, R. C.; Nogueira, F. **Differences between synthetic  $\beta$ -haematin and native hemozoin crystals.** *Microsc. Microanal.* 19, 49–50, 2013.
- Chabner, B. A.; Roberts, T. G. **Chemotherapy and the war on cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72, 2005.
- CHADHA, N. & Silakari, O. **Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view.** *Eur. J. Med. Chem.* 134, 159–184, 2017.
- CHAVES, O. A. et al. **Multi-Spectroscopic and Theoretical Analysis on the Interaction between Human Serum Albumin and a Capsaicin Derivative-RPF101.** *Biomolecules* 8, 1–30, 2018.
- CHEN, L.-M. et al. **Synthesis, characterization, DNA-binding and spectral properties of complexes [Ru(L)4(dppz)]<sup>2+</sup> (L = Im and MeIm).** *J. Inorg. Biochem.* 102, 330–341, 2008.

CHINNATHAMBI, S., Velmurugan, D., Hanagata, N., Aruna, P. R.; Ganesan, S. **Investigations on the interactions of 5-fluorouracil with bovine serum albumin: Optical spectroscopic and molecular modeling studies.** *J. Lumin.* 151, 1–10, 2014.

CHUNG, S. Y. et al. **Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells.** *Arch. Pharm. Res.* 28, 823–8, 2005.

DA SILVA, J. G., et al. **Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones.** *Eur. J. Med. Chem.* 65, 415–426, 2017.

DAWOOD, S. **Triple-Negative Breast Cancer - Epidemiology and Management Options.** *Drugs* 70, 2247–2258, 2010.

DELOU, J. M. de A. et al. **Loss of constitutive ABCB1 expression in breast cancer associated with worse prognosis.** *Breast cancer (Dove Med. Press.* 9, 415–428, 2017.

DEVITA, V. T. & Chu, E. **A History of Cancer Chemotherapy.** *Cancer Res.* 68, 8643–8653, 2008.

DOMINGUEZ-SOLA, D.; Gautier, J. **MYC and the Control of DNA Replication.** *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, 1–20, 2014.

DUFLOS, A., Kruczynski, A.; Barret, J.-M. **Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids.** *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* 2, 55–70, 2002.

EBRAHIMI, H.; Hadi, J. S.; Al-Ansari, H. S. **A new series of Schiff bases derived from sulfa drugs and indole-3-carboxaldehyde: Synthesis, characterization, spectral and DFT computational studies.** *J. Mol. Struct.* 1039, 37–45, 2013.

EL-GOGARY, T. M. ; El-Gendey, E. M. . **Noncovalent attachment of psoralen derivatives with DNA: Hartree-Fock and density functional studies on the probes.** *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 59, 2635–2644, 2003.

ESHKOURFU, R. et al. **Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide.** *J. Inorg. Biochem.* 105, 1196–1203, 2011.

ESWARAN, R., Bertani, R., Sgarbossa, P.; Karuppanan, N.; Nattamai S.P., B. **Synthesis, crystal structure, DNA and protein binding studies of novel binuclear Pd(II) complex of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde-4(N,N) dimethylthiosemicarbazone.** *J. Inorg. Biochem.* 155, 1–8, 2016.

FORNANDER, L. H.; Wu, L.; Billeter, M.; Lincoln, P.; Nordén, B. **Minor-Groove Binding Drugs: Where Is the Second Hoechst 33258 Molecule?** *J. Phys. Chem. B* 117, 5820–5830, 2013.

GAILLARD, H.; García-Muse, T.; Aguilera, A. **Replication stress and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 15, 276–289, 2015.

GALLAGHER, S. R. in **Current Protocols in Neuroscience** 56, A.1K.1-A.1K.14 (John Wiley & Sons, Inc., 2011).

GALSKY, M. D. et al. **Phase 2 trial of the topoisomerase II inhibitor, amrubicin, as second-line therapy in patients with metastatic urothelial carcinoma.** *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76, 1259–1265, 2015.

GE, X. Q., Jackson, D. A. & Blow, J. J. Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are  
Gingras, B. A., Hornal, R. W. & Bayley, C. H. **The preparation of some thiosemicarbozones and their copper complexes.** Part I. *Can. J. Chem.* 38, 712–719, 1960.

GIUDO, R. V. C., Andricopulo, A. D.; Oliva, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** *Estud. Avançados* 24, 81–98, 2010.

HAIJIAN, R., Hossaini, P., Mehrayin, Z., Woi, P. M.; Shams, N. **DNA-binding studies of valrubicin as a chemotherapy drug using spectroscopy and electrochemical techniques.** *J. Pharm. Anal.* 7, 176–180, 2017.

HANAHAN, D.; Weinberg, R. A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell* 144, 646–74, 2011.

HANNON, M. J. Supramolecular DNA recognition. *Chem. Soc. Rev.* 36, 280–295, 2007.  
Hemalatha, K.; Madhumitha, G.; Al-Dhabi, N. A.; Arasu, M. V. **Importance of fluorine in 2,3-dihydroquinazolinone and its interaction study with lysozyme.** *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 162, 176–188, 2016.

HILAL-DANDAN, R; Laurence; Brunton L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman,** McGraw Hill, 2015.

HU, Y.-J., Liu, Y., Shen, X.-S., Fang, X.-Y. & Qu, S.-S. **Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin.** *J. Mol. Struct.* 738, 143–147, 2005.

HURLEY, L. H. **DNA and its associated processes as targets for cancer therapy.** *Nat. Rev. Cancer* 2, 188–200, 2002.

HUSAIN, K.; Abid, M.; Azam, A. **Synthesis, characterization and antiamoebic activity of new indole-3-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Pd(II) complexes.** *Eur. J. Med. Chem.* 42, 1300–1308, 2007.

IBARRA, A.; Schwob, E.; Méndez, J. **Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8956–8961 (2008).

IHMELS, H.; Otto, D. in **Supramolecular Dye Chemistry** 161–204 (Springer-Verlag, 2005).  
INCA - Instituto Nacional de Câncer.

JACKSON, S. P. & Bartek, J. **The DNA-damage response in human biology and disease.** *Nature* 461, 1071–1078, 2009.

Johns Hopkins Medicine. **Breast Cancer and Breast Pathology**. Disponível em: <http://pathology.jhu.edu/breast/index.php>.(Acessado: 17 Junho 2017).

KALARIA, P. N., Karad, S. C.; Raval, D. K. **A review on diverse heterocyclic compounds as the privileged scaffolds in antimalarial drug discovery**. Eur. J. Med. Chem. 158, 917–936, 2018.

KARIMABAD, M. N., Falahati-pour, S. K., Hassanshahi, G. & Koochakzadeh, L. **The anti-cancer properties in parallel with toxic effects of indole-3-carbinol derivatives**. Immunol. Lett. 15, 1–20, 2017.

KATAYAMA, K.; Noguchi, K.; Sugimoto, Y. **Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells**. New J. Sci. 2014, 1–11, 2014.

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

KHALAF, A. I.; Al-Kadhimi, A. A. H.; Ali, J. H. DNA Minor Groove Binders-Inspired by Nature. Acta Chim. Slov. 63, 689–704, 2016.

KOLIFARHOOD, G. et al. Prophylactic efficacy of primaquine for preventing Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasitaemia in travelers: A meta-analysis and systematic review. Travel Med. Infect. Dis. 17, 5–18, 2017.

KUDARHA, R. R.; Sawant, K. K. **Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches**. Mater. Sci. Eng. C 81, 607–626, 2017.

LAFAYETTE, E. A. et al. **Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities**. Eur. J. Med. Chem. 136, 511–522, 2017.

LARSEN, A. K.; Skladanowski, A. **Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death**. Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr. 1400, 257–274, 1998.

LEHMANN, B. D. et al. **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies**. J. Clin. Invest. 121, 2750–2767, 2011.

LIONTOS, M. et al. **Deregulated Overexpression of hCdt1 and hCdc6 Promotes Malignant Behavior**. Cancer Res. 67, 10899–10909, 2007.

MACHADO, M., Murtinheira, F., Lobo, E. & Nogueira, F. **Whole-Cell SYBR Green I Assay for Antimalarial Activity Assessment**. Ann Clin Med Microbio 2, 2016.

Macheret, M.; Halazonetis, T. D. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 10, 425–448, 2015.

- MAGDALOU, I.; Lopez, B. S.; Pasero, P.; Lambert, S. A. E. **The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 30, 154–164, 2014.
- MARKOVIĆ, O. S. et al. **Human serum albumin binding of certain antimalarials.** *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 192, 128–139, 2018.
- MARTIN, N. O. et al. **Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities.** *Front. Chem.* 5, 1–9 (2017).
- MCDERMOTT, S. P.; Wicha, M. S. **Targeting breast cancer stem cells.** *Mol. Oncol.* 4, 404–419, 2010.
- MCELNAY, J. C.; D'Arcy, P. F. **Aluminium content of infusion and irrigation fluids.** *Int. J. Pharm.* 33, 261–263, 1986.
- MCGHEE, J. D. & von Hippel, P. H. **Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice.** *J. Mol. Biol.* 86, 469–489, 1974.
- MELIXETIAN, M. et al. **Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53.** *J. Cell Biol.* 165, 473–482, 2004.
- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay.** *J. Immunol. Methods* 65, 55–63, 1983.
- MOTA, M. M., Hafalla, J. C. R. & Rodriguez, A. **Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection.** *Nat. Med.* 8, 1318–1322, 2002.
- OLIVEIRA, J. F. et al. **Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay.** *Eur. J. Med. Chem.* 136, 305–314 2017.
- PAULO, A. et al. **Bis-alkylamine Indolo[3,2-b]quinolines as Hemozoin Ligands: Implications for Antimalarial Cytostatic and Cytocidal Activities.** *J. Med. Chem.* 57, 3295–3313, 2014.
- PAVLIDIS, V. H. **Classics in total synthesis II: more targets, strategies, methods.,** 2003.
- PLOWRIGHT, A. T. . et al. **Joining Forces: The Chemical Biology–Medicinal Chemistry Continuum.** *Cell Chem. Biol.* 24, 1058–1065, 2017..
- PLSIKOVA, J. et al. **3,6-Bis (3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents.** *Eur. J. Med. Chem.* 57, 283–295, 2012.
- POMMIER, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. **DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs.** *Chem. Biol.* 17, 421–433 (2010).

RADEVA-PETROVA, D., Kayentao, K., ter Kuile, F. O., Sinclair, D. & Garner, P. **Drugs for preventing malaria in pregnant women in endemic areas: any drug regimen versus placebo or no treatment.** Cochrane database Syst. Rev. CD000169, 2014.

RANA, A., Alex, J. M., Chauhan, M., Joshi, G.; Kumar, R. **A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents.** Med. Chem. Res. 24, 903–920, 2015.  
required for human cells to survive replicative stress. Genes Dev. 21, 3331–41, 2007.

SEDIGHIPOOR, M.; Kianfar, A. H.; Kamil Mahmood, W. A.; Azarian, M. H. **Synthesis and electronic structure of novel Schiff bases Ni/Cu (II) complexes: Evaluation of DNA/serum protein binding by spectroscopic studies.** Polyhedron 129, 1–8, 2017.

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.** Eur. J. Med. Chem. 97, 552–560, 2015.

SHIMA, N. et al. **A viable allele of Mcm4 causes chromosome instability and mammary adenocarcinomas in mice.** Nat. Genet. 39, 93–98, 2007.

SILVA, L. M. et al. **New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis.** Chem. Biol. Interact. 283, 20–29, 2018.

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

SIRAJUDDIN, M., Ali, S.; Badshah, A. **Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry.** J. Photochem. Photobiol. B Biol. 124, 1–19, 2013.

SOLIER, S., -W. Zhang, Y., Ballestrero, A., Pommier, Y. & Zoppoli, G. **DNA Damage Response Pathways and Cell Cycle Checkpoints in Colorectal Cancer: Current Concepts and Future Perspectives for Targeted Treatment.** Curr. Cancer Drug Targets 12, 356–371, 2012.

SORIA-VALLES, C., López-Soto, A., Osorio, F. G.; López-Otín, C. **Immune and inflammatory responses to DNA damage in cancer and aging.** Mech. Ageing Dev. 165, 10–16, 2017.

ŠOŠKIĆ, M. & Magnus, V. **Binding of ring-substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin.** Bioorg. Med. Chem. 15, 4595–4600, 2007.

STEWART, B. W.; Wild, C. **International Agency for Research on Cancer & World Health Organization.** World cancer report, 2014.

STOCKMANS, G., Deraedt, K., Wildiers, H., Moerman, P. & Paridaens, R. **Triple-negative breast cancer.** Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 20, 614–620, 2015.

SUI, H., Fan, Z. Z.; Li, Q. **Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells.** *J Int Med Res* 40, 426–435, 2012.

TABASSUM, S. et al. **Synthesis and crystal structure determination of cobalt(II) mixed-ligand complex containing 1,10-phenanthroline and 5-(2-carboxybenzyloxy)isophthalic acid: Their biological evaluation viz. DNA/protein binding profile, pBR322 DNA cleavage activity.** *Inorganica Chim. Acta* 451, 216–226, 2016.

TAHA, M. et al. **Molecular hybridization conceded exceptionally potent quinolinyl-oxadiazole hybrids through phenyl linked thiosemicarbazide antileishmanial scaffolds: In silico validation and SAR studies.** *Bioorg. Chem.* 71, 192–200, 2017.

TENÓRIO, R. P. et al. **Tiosemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica.** *Quim. Nova* 28, 1030–1037, 2005.

VAZIRI, C. et al. **A p53-Dependent Checkpoint Pathway Prevents Rereplication.** *Mol. Cell* 11, 997–1008, 2003.

VIDEIRA, M.; Reis, R. L.; Brito, M. A. **Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance.** *Biochim. Biophys. Acta* 1846, 312–325, 2014.

VIKNESWARAN, R.; Eltayeb, N. E.; Ramesh, S.; Yahya, R. **New alicyclic thiosemicarbazone chelated zinc(II) antitumor complexes: Interactions with DNA/protein, nuclease activity and inhibition of topoisomerase-I.** *Polyhedron* 105, 89–95, 2016.

VOGELSTEIN, B. & Kinzler, K. W. **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat. Med.* 10, 789–799, 2004.

WALCOURT, A. et al. **Anti-plasmodial activity of aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators: Effect on erythrocyte membrane integrity, parasite development and the intracellular labile iron pool.** *J. Inorg. Biochem.* 129, 43–51, 2013.

WALKER, N. F., Nadjm, B.; Whitty, C. J. M. **Malaria.** *Medicine (Baltimore).* 46, 52–58, 2018.

WALLIKER, D. et al. **Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Science* 236, 1661–6, 1987.

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

WANG, Y. et al. **Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazone derivatives.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 2360–2363 2017.

WELLEMS, T. E., Hayton, K.; Fairhurst, R. M. **The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities.** *J. Clin. Invest.* 119, 2496–505, 2009.

WHITE, N. J. et al. **Malaria.** *Lancet (London, England)* 383, 723–35, 2014.

XIE, M. et al. **Bcl2 induces DNA replication stress by inhibiting ribonucleotide reductase.** *Cancer Res.* 74, 1–19, 2014.

YALOWICH, J. C. et al. **The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II $\alpha$ .** *Biochem. Pharmacol.* 84, 52–58 2012.

YU, W.; Shi, L.; Hui, G.; Cui, F. **Synthesis of biological active thiosemicarbazone and characterization of the interaction with human serum albumin.** *J. Lumin.* 134, 491–497, 2013.

ZEMAN, M. K.; Cimprich, K. A. **Causes and consequences of replication stress.** *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9, 2014.

ZHANG, M.-Z., Chen, Q.; Yang, G.-F. **A review on recent developments of indole-containing antiviral agents.** *Eur. J. Med. Chem.* 89, 421–441, 2015.

ZHANG, S. et al. **A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity.** *J. Inorg. Biochem.* 98, 2099–2106, 2004.

ZHU, J.; Chen, L.; Dong, Y.; Li, J.; Liu, X. **Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe.** *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 124, 78–83, 2014.