

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

AMÉLIA GALDINO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, ESTUDOS DE
INTERAÇÃO DE BIOMACROMOLÉCULAS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE
DE DERIVADOS QUINOLINA TIOSSEMICARBAZONAS**

Recife

2020

AMÉLIA GALDINO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, ESTUDOS DE
INTERAÇÃO DE BIOMACROMOLÉCULAS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE
DE DERIVADOS QUINOLINA TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ribeiro, Amélia Galdino

Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, estudos de interação de biomacromoléculas e inibição da topoisomerase de derivados quinolina tiossemicarbazonas / Amélia Galdino Ribeiro. - 2020.

101 f. : il.

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

Coorientadora: Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Farmacologia. 2. Mamas - Câncer. 3. DNA. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora). I. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de (coorientadora). III. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021 - 009

AMÉLIA GALDINO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, ESTUDOS DE
INTERAÇÃO DE BIOMACROMOLÉCULAS E INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE
DE DERIVADOS QUINOLINA TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do título de Doutor em
Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 14/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof.^a Dr.^a Maira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador externo)
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof. Dr. Rafael David Souto de Azevedo (Examinador externo)
Universidade de Pernambuco – UPE

Prof. Dr. Jorge Luiz Neves (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

*Aos meus pais Jonas Calixto Ribeiro (In Memoriam) e Maria do Socorro Galdino da Silva,
sem vocês eu não teria sido capaz de chegar até aqui!*

AGRADECIMENTOS

A princípio, sou grata a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades a mim concedidas. A certeza de que Ele está sempre comigo me ajudou a trilhar todo o caminho percorrido e tenho ciência de que continuará a me mostrar o próximo passo.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Carmo (Nena), que ao longo de todos os anos de pesquisa me concedeu oportunidades para viver essa experiência acadêmica, com seus valiosos ensinamentos científicos.

Também, sou grata à minha co-orientadora, Profa. Dra. Sinara Mônica, que me aceitou desde o mestrado no grupo de pesquisa para o câncer e até aqui tem me ajudado, compartilhando seu conhecimento e suas experiências.

Aos meus pais Jonas (*In Memoriam*) e Socorro que me educaram, me deram amor, sabedoria e me ensinaram os verdadeiros valores que devem ser perpetuados. Serei eternamente grata por tudo!

À minha família, em especial minhas irmãs Beatriz e Diana e minha tia Jonaide, que me incentivam em mais esta fase e me acompanharam nesta jornada de perto. E ao meu cunhado ‘Dencinho’, que sempre esteve na torcida, se alegrando em todas as minhas conquistas.

Ao meu noivo Luís, pelo amor, companheirismo, paciência, compreensão nos momentos mais difíceis e incentivo de todos os dias a conquistar tudo aquilo que mereço.

Aos meus queridos amigos do grupo Kayros que não medem esforços em ressignificar minha experiência com o Amado, mostrando o verdadeiro valor de tudo aquilo que Deus me concede.

Não poderia deixar de citar o meu grupo do câncer, onde fiz verdadeiras amizades: Emanuel (Manu), Keriolaine, Iris, Cleberson (Cleitinho). Agradeço o apoio e a convivência que tive com vocês, que foram fundamentais para tornar tudo mais leve.

Também deixo meu sentimento de gratidão a duas amigas que fiz neste mundo acadêmico: as queridas Aurenice e Denise. Obrigada pela valiosa amizade e pelos diversos momentos de apoio e descontração que compartilhamos.

À minha grande amiga Gabriela, que me acompanha desde a graduação. Sou grata por todo apoio, amizade e por toda torcida.

Aos colegas que fizeram/fazem parte do laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT): Pedro, Paula, Natanael, Hanna, César, Rubinho, Allana e Miguel, pela convivência no dia a dia de trabalho e momentos de aprendizagem e brincadeiras durante tanto tempo de convívio.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e ao Laboratório de Enzimologia (LABENZ-UFPE), que possibilitaram a realização dos experimentos necessários para o meu doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro, viabilizando este trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram por tudo isto e estiveram na torcida por mais esta conquista.

RESUMO

O câncer mamário é um dos que mais acomete as mulheres mundialmente, sendo crescente a busca por novos fármacos que viabilizem seu processo terapêutico. Por isso, são considerados alguns alvos biológicos importantes, dentre eles, o DNA e a enzima topoisomerase (topo). O estudo de ligações à proteína albumina sérica humana (HSA) também é importante para avaliar o perfil farmacocinético de fármacos e por esta proteína ser superexpressa em células tumorais. Alguns derivados são considerados promissores para ligação à essas biomoléculas, inclusive os que contêm o núcleo quinolina (oriundo da simplificação molecular do anel acridina) e a porção tiossemicarbazona. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antiproliferativo, a capacidade de ligação ao DNA e HSA e inibição da topo II α de doze derivados 4-quinolina tiossemicarbazonas (**JF**). A análise de ligação ao DNA foi realizada por meio da viscosidade relativa e ensaio de competição usando o Laranja de Acridina (LA) como sonda e com a HSA foram aplicadas técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência e ensaio de competição com Ibuprofeno e Varfarina. No estudo antiproliferativo, foi utilizada a técnica de MTT com as linhagens tumorais de mama MCF-7, T-47D e MDA-MB-231 e de macrófagos RAW 264.7. A eletroforese em gel de agarose foi empregada para análise de inibição *in vitro* da topo II α . Nos estudos com o DNA, foi confirmada a ligação por intercalação dos derivados **JF** e, com a HSA, as alterações espectrais observadas indicam interações dos compostos **JF** à proteína. Na absorção, a maior constante de ligação para HSA foi de $2,17 \times 10^5$ referente ao **JF-89** (Naftil). Na fluorescência, todos os derivados ocasionaram a supressão fluorescente da HSA, as constantes de Stern-Volmer obtidas constataam que os perfis lipofílicos dos compostos **JF** ajudaram na melhor interação com a HSA. No estudo competitivo com HSA, foi verificada a ligação preferencial nos sítios I e II pelos derivados **JF-93** e **JF-86**, respectivamente. O menor IC₅₀ contra a MCF-7 foi para o **JF-92** (*p*-etil) (0,82 μ M) ocasionando também menor viabilidade da linhagem MDA-MB-231 (37,58%), o tipo mamário mais agressivo quando comparado com os demais, e inibição parcial da topo II α . Para a T-47D, o **JF-86** (fenetil) teve destaque (1,12 μ M) e foi o segundo melhor para a MDA, resultando em 38,87% de viabilidade. Destaca-se que ambos **JF-92** e **JF-86** possuem propriedades eletrônicas e lipofílicas similares pela semelhança estrutural. No entanto, sugere-se que a ação antiproliferativa do **JF-86** não ocorreu por ligação ao DNA, quando comparado com os demais derivados. Portanto, faz-se necessário estudos adicionais a fim de consolidar o mecanismo de ação antiproliferativo.

Palavras-chave: DNA. Albumina. Espectroscopia. Topoisomerase. Antiproliferativo.

ABSTRACT

Breast cancer is one that most affects women worldwide, and the search for new drugs that make their therapeutic process viable is growing. For this reason, some important biological targets are considered, among them, DNA and the enzyme topoisomerase (topo). The study of connections to the human serum albumin protein (HSA) is also important to evaluate the pharmacokinetic profile of drugs and because this protein is overexpressed in tumor cells. Some derivatives are considered promising for binding to these biomolecules, including those containing the quinoline nucleus (from the molecular simplification of the acridine ring) and the thiosemicarbazone portion. In this sense, this work aimed to evaluate the antiproliferative profile, the ability to bind to DNA and HSA and inhibition of the top II α of twelve 4-quinoline derivatives thiosemicarbazones (**JF**). The DNA binding analysis was performed by means of relative viscosity and competition test using Acridine Orange (AO) as a probe and with the HSA absorption and fluorescence spectroscopic techniques and competition test with Ibuprofen and Warfarin were applied. In the antiproliferative study, the MTT technique was used with the MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 breast tumor lines and RAW 264.7 macrophages. Agarose gel electrophoresis was used for in vitro inhibition analysis of top II α . In DNA studies, the binding by intercalation of the **JF** derivatives was confirmed and, with the HSA, the observed spectral changes indicate interactions of the **JF** compounds to the protein. In absorption, the highest binding constant for HSA was 2.17×10^5 for **JF-89** (Naftil). In fluorescence, all derivatives caused the fluorescent suppression of HSA, the Stern-Volmer constants obtained show that the lipophilic profiles of the **JF** compounds helped in better interaction with HSA. In the competitive study with HSA, preferential binding at sites I and II was verified by derivatives **JF-93** and **JF-86**, respectively. The lowest IC₅₀ against MCF-7 was for **JF-92** (p-ethyl) (0.82 μ M), also causing less viability of the MDA-MB-231 strain (37.58%), the most aggressive breast type when compared with the others, and partial inhibition of top II α . For the T-47D, **JF-86** (phenethyl) stood out (1.12 μ M) and was the second best for MDA, resulting in 38.87% viability. It is noteworthy that both **JF-92** and **JF-86** have similar electronic and lipophilic properties due to structural similarity. However, it is suggested that the antiproliferative action of JF-86 did not occur due to DNA binding, when compared to other derivatives. Therefore, further studies are necessary in order to consolidate the antiproliferative mechanism of action.

Keywords: DNA. Albumin. Spectroscopy. Topoisomerase. Antiproliferative.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das causas internas e externas do câncer e seus respectivos percentuais (10-20% fatores internos; 80-90% fatores externos).....	19
Figura 2 – Alterações celulares que permitem a progressão tumoral.....	20
Figura 3 – Representação interna da glândula mamária com seus respectivos componentes. .	24
Figura 4 – Prognóstico e nível de agressividade dos subtipos moleculares do câncer de mama	25
Figura 5 – Estrutura helicoidal da molécula de DNA e seus componentes.....	27
Figura 6 – Representação dos diferentes modos de ligação ao DNA.....	28
Figura 7 – Estrutura química de alguns quimioterápicos antineoplásicos.	30
Figura 8 – Ilustração dos mecanismos de inibição do tipo catalítico (à esquerda) e do tipo "veneno" (à direita) da enzima topoisomerase.	31
Figura 9 – Estrutura química de alguns inibidores tipo "veneno" das enzimas topo I e II.....	32
Figura 10 – Estrutura da HSA com seus respectivos sítios de ligação.....	33
Figura 11 – Efeitos espectrais que podem ser observados após interação entre HSA e ligantes.	35
Figura 12 – Estrutura molecular do núcleo quinolina.	36
Figura 13 – Moléculas com potenciais citotóxicos antitumorais: cinamamidas (a), aril dihidrodioxinos (b) e benzoquinolínicos (c).	37
Figura 14 – Derivados quinolínicos com melhores atividades citotóxicas contra células tumorais de mama: MCF-7 (d) e T-47D (e).	37
Figura 15 – Promissoras moléculas para atividade anticâncer que apresentam o núcleo quinolina.	38
Figura 16 – Estrutura química da porção tiossemicarbazona.	38
Figura 17 – Derivados tiossemicarbazonas com potenciais atividades antiproliferativas e ligação ao DNA.	39
Figura 18 – Compostos da classe tiossemicarbazona com atividades antiproliferativas in vitro.	39
Figura 19 – Derivados 4-quinolina-tiossemicarbazonas (JF) utilizados neste e nos demais estudos.	41
Figura 20 – Estrutura química da Asulacrina	44
Figura 21 – Viscosidade relativa do ssDNA na presença dos ligantes JF e <i>m</i> AMSA.....	47
Figura 22 – Espectro de absorção da HSA na presença de quantidades crescentes do JF-96 .	50

Figura 23 – Espectro de emissão da HSA na presença de quantidades crescentes do JF-95 .	51
Figura 24 – Viabilidade celular dos derivados JF e <i>m</i> AMSA frente à linhagem MDA-MB-231.	53
Figura 25 – Efeito dos derivados JF e da <i>m</i> AMSA na inibição da Topoisomerase II α Humana.	53
Figura 26 – Efeito dos derivados JF e da <i>m</i> AMSA na inibição da Topoisomerase II α Humana em comparação com os derivados LT .	54
Figura 27 – Espectro de emissão do ctDNA-LA na presença de quantidades crescentes do JF-85 .	55
Figura 28 – Espectro de emissão do ctDNA-LA na presença de quantidades crescentes do JF-92 .	55
Figura 29 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Ibuprofeno (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do JF-86 .	56
Figura 30 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Ibuprofeno (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do JF-93 .	57
Figura 31 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Varfarina (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do JF-86 .	58
Figura 32 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Varfarina (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do JF-93 .	58
Figura 33 – Estrutura química dos derivados JF-95 e JF-96 .	61
Figura 34 – Estrutura química dos derivados JF-86 e JF-92 .	62
Figura 35 – Estrutura química dos derivados LT-27 e 36 e JF-88 e 93 .	64
Figura 36 – Estrutura química do Ibuprofeno, Varfarina e dos derivados JF-86 e 93 .	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados espectroscópicos de absorção UV-Vis e emissão de fluorescência da HSA na ausência e presença dos derivados JF	49
Tabela 2 – Valores de CC ₅₀ e IC ₅₀ dos derivados JF , <i>m</i> AMSA e Asulacrina em macrófagos e linhagens tumorais.	52
Tabela 3 – Dados espectroscópicos de emissão fluorescente do DNA com o marcador Laranja de Acridina (LA), na ausência e presença dos derivados JF-85 e 92	56
Tabela 4 – Dados espectroscópicos de emissão fluorescente da HSA com os marcadores Ibuprofeno e Varfarina na ausência e presença dos derivados JF-86 e 93	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina do soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CC₅₀	Concentração Citotóxica em 50%
CII	Células Imune Infiltrantes
ctDNA	DNA de timo bovino (do inglês <i>calf thymus DNA</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMT	Transição Epitélio Mesenquimal (do inglês <i>epithelial–mesenchymal transition</i>)
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HER-2	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
HSA	Albumina do soro humano (do inglês <i>Human Serum Albumin</i>)
IC₅₀	Inibição em 50% das células (do inglês <i>Inhibitory Concentration</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
Kb	Constante de ligação
kDa	Quilodalton (do inglês <i>Kilodalton</i>)
Ki-67	Marcador de Proliferação Nuclear
Ksv	Constante de Stern-Volmer
LA	Laranja de Acridina
mAMSA	Derivado de acridina Amsacrina
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma de mamário
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
RPMI	Do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ssDNA	DNA de esperma de salmão (do inglês <i>salmon sperm DNA</i>)
T-47D	Linhagem celular de carcinoma mamário
Topo	Enzima Topoisomerase
Tris	Tetrametilhidroxiaminometano
Trp	Aminoácido triptofano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 CÂNCER.....	19
2.1.1 Câncer de mama	23
2.1.2 Alvos biológicos para o tratamento do câncer	26
2.1.2.1 DNA (terapia alvo)	26
2.1.2.2 Topoisomerase como alvo para terapia antitumoral.....	30
3.2 ALBUMINA SÉRICA HUMANA (HSA).....	32
3.3 QUÍMICA MEDICINAL: IMPORTANTE CIÊNCIA NA BUSCA DE NOVAS TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS	35
3.3.1 Quinolina e Tiossemicarbazonas.....	36
4 METODOLOGIA.....	41
4.1. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS QUINOLINA TIOSSEMICABAZONAS	41
4.2 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA	41
4.3 ESTUDOS DE ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA COM HSA	42
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	43
4.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE IIA HUMANA.....	44
4.5.1 Estudo comparativo entre os derivados JFs e LTs na inibição da topoisomerase ..	45
4.6 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA	45
5 RESULTADOS	47
5.1 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA NA PRESENÇA DOS DERIVADOS JF	47
5.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA.....	47

5.4 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA EM MACRÓFAGOS E CÉLULAS TUMORAIS	51
5.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA	53
5.6 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA	54
6 DISCUSSÃO	59
6.1 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA	59
6.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA.....	60
6.3 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA.....	61
6.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA	63
6.5 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA	65
7 CONCLUSÃO.....	67
7.1 PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS E EMISSÃO DA HSA COM OS DERIVADOS JF	79
APÊNDICE B – ARTIGO	85

1 INTRODUÇÃO

O crescimento celular desordenado e a capacidade de invadir diferentes tecidos e órgãos são algumas das principais características do câncer, termo utilizado para designar uma neoplasia maligna de alta incidência global e responsável por milhares de mortes por ano. Por este motivo, é considerada um grave problema de saúde pública (AKHTAR et al., 2017; INCA, 2020). As células normais do corpo, ao sofrerem mutações devido às agressões oriundas de diversas causas (internas ou externas), podem adquirir certas funcionalidades, denominadas em inglês de *Hallmarks*. São elas: sustentação de sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, evasão da destruição imune, desregulação energética celular, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, mutação e instabilidade genômica e promoção da inflamação tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2017). Estas características demonstram a grande complexidade da célula tumoral o que dificulta, muitas vezes, a eficiência do tratamento.

As modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do câncer incluem a cirurgia para a remoção do tumor, transplante de medula óssea, radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e quimioterapia (INCA, 2019). Esta última é comumente utilizada para o tratamento de muitos tipos de tumores, inclusive o câncer de mama. Pelas estatísticas, o câncer mamário é o tipo que mais afeta mulheres em todo o mundo, com previsão de mais de 66 mil novos casos nos próximos dois anos, atrás somente do câncer de pele não melanoma (INCA, 2020). Por sua alta complexidade, o tumor mamário foi classificado em 5 subtipos: Luminal A, Luminal B HER-2 positivo, Luminal B HER-2 negativo, Superexpressão de HER-2 e Triplo negativo/Basal. Eles diferem pela presença de certos biomarcadores existentes na membrana celular, o que influencia no seu prognóstico e agressividade (FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018; KONDOV et al., 2018).

O entendimento desta complexidade durante a proposição de novos fármacos é de suma importância, pois favorece a busca por alvos biológicos e ajuda na compreensão de como a ligação a esses alvos contribuem na resposta biológica. Alguns deles são utilizados em muitos estudos, como por exemplo, o DNA e a enzima topoisomerase (topo). A molécula de DNA é considerada um importante alvo por ser protagonista no processo de replicação celular, primordial para a proliferação sustentada da célula tumoral. A topo, por sua vez, auxilia neste processo, pois permite a abertura do DNA mediante a quebra de uma ou das duas fitas desta biomolécula e posterior religamento (MOTEGI et al., 2019; GOUVEIA et al., 2018; HU et al., 2018; RESCIFINA et al., 2014; ZHU et al., 2014).

Já é relatado que alguns quimioterápicos possuem como mecanismo de ação a interação ao DNA e inibição da topo como, por exemplo, a Amsacrina (*mAMSA*) e a Doxorubicina (quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama). O processo de interação entre ligantes e DNA pode ocorrer de diferentes formas, seja por meio de intercalação entre os pares de bases, seja por ligações nos sulcos menores e/ou maiores da dupla hélice. Estes mecanismos podem ser avaliados por meio de técnicas espectroscópicas de absorção Ultravioleta-Visível (UV-Vis), fluorescência e dicroísmo circular (DC), viscosidade relativa e por ensaios de deslocamento competitivo utilizando sondas fluorescentes como, por exemplo, o Laranja de Acridina (LA) (MIRZAEI-KALAR, 2018; ALMEIDA e al. 2017; SAWAR et al., 2017; LAFAYETTE et al., 2013). A capacidade de inibição da topo também é um fator relevante para a estagnação do ciclo celular e posterior apoptose, sendo os inibidores desta enzima classificados em catalíticos ou do tipo “veneno”. Este último atua formando um complexo ternário intermediário DNA-inibidor-topo que prejudica a religação da dupla fita. Já o inibidor catalítico impede a ligação da topo ao DNA por causa da ligação ao sítio ativo da enzima, necessário para o desempenho da função ligase (ALMEIDA et al., 2017).

Faz-se necessário também compreender as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das substâncias a serem estudadas como promissoras para o tratamento do câncer, pois estas propriedades influenciam na chegada ao alvo biológico e sua posterior ligação. Uma das maneiras de investigar estas propriedades é analisando a capacidade de ligação à proteína sérica albumina, uma biomolécula abundante no sistema biológico e que exerce a função de transportar diferentes ligantes, além de auxiliar na absorção, metabolismo e excreção, o que afeta o perfil farmacocinético de fármacos. Essa distribuição é de primordial importância para a chegada do fármaco ao seu local de ação, especialmente nas células tumorais devido à alta acumulação da albumina neste tipo celular e maior captação por essas células (GUHATHAKURTA et al., 2017; MONDAL et al., 2017). Técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e DC também são aplicadas para analisar, experimentalmente, a capacidade de interação entre ligantes e a albumina, além de ensaios de deslocamento competitivo para averiguar os locais preferenciais de ligação à esta biomolécula (JIANG et al., 2020; MU et al., 2019; KARAMI et al., 2017; YEGGONI et al., 2014; POÓR et al., 2013).

Todo esse estudo está compreendido na Química Medicinal, uma importante ciência responsável por planejar, identificar, interpretar e propor modificações moleculares em diversas substâncias químicas, com o objetivo de descobrir novos candidatos à fármacos com melhor eficácia farmacológica e que causem menores efeitos adversos (PLOWRIGHT et al., 2017). Essa busca se faz necessária devido aos relatos de resistência das células tumorais à muitos

quimioterápicos utilizados na clínica. Neste sentido, aumentar o arsenal terapêutico para a terapia antiblástica e que apresentem habilidades de se ligar a importantes alvos como DNA e a topo, além de interagir com a albumina, é de grande interesse farmacêutico.

Podemos destacar compostos que possuem, em sua estrutura, o núcleo quinolina e a porção tiossemicarbazona pois ambos apresentam importantes propriedades terapêuticas, inclusive antitumoral, além da capacidade de se ligar à albumina (BARBOSA-LIMA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2015). Estudos recentes têm relatado a importância destas porções para o caráter promissor de moléculas voltadas à terapia do câncer, apresentando efeitos antiproliferativos para diversas linhagens tumorais, inclusive de mama (KATARIYA; SHAH; REDDY, 2020; BOZGEYIK et al., 2020).

Nesta perspectiva, doze derivados quinolina-tiossemicarbazonas (**JF**) foram sintetizados previamente por nosso grupo de pesquisa a fim de comparar a ação destes compostos, contendo a quinolina, com os derivados acridina tiossemicarbazona (**LT**) sintetizados por Almeida e colaboradores (2015), analisando de que maneira a remoção de um anel aromático na porção acridina (formando o anel quinolina) influencia na resposta antiproliferativa e de ligação a biomoléculas. Os derivados **LT** apresentaram resultados promissores em ensaios antiproliferativos, de ligação ao DNA e de inibição da enzima topo; e espera-se, portanto, que a simplificação molecular do anel acridina não interfira negativamente na resposta biológica dos derivados **JF**.

Para analisar esses perfis, os derivados **JF** foram submetidos a estudos de interação com o DNA e albumina sérica bovina (BSA) e os resultados iniciais apontaram o caráter promissor destes compostos, indicando a utilização destes em estudos subsequentes. Dos resultados obtidos anteriormente, verificou-se que todos os compostos apresentaram afinidade de ligação ao DNA de timo bovino (ctDNA) e BSA de acordo com os valores das constantes de ligação (K_b) e supressão fluorescente (K_{sv}) obtidos. Um deles (**JF-92**) teve destaque, apresentando os maiores valores de K_b e K_{sv} tanto para o ctDNA (K_b : $1,62 \times 10^6$) quanto para a BSA (K_b = $1,43 \times 10^5$; K_{sv} = $16,05 \times 10^4$). Além disso, o **JF-92** ainda ocasionou efeito hipercrômico nos espectros de absorção do ctDNA e BSA além de uma supressão fluorescente no espectro de emissão da BSA (RIBEIRO et al. 2019).

Visando avançar nos estudos com os derivados da série **JF**, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antiproliferativo destes derivados em linhagens celulares de câncer de mama, proceder com demais estudos de interação com a molécula de DNA, analisar a capacidade de interação com a proteína albumina sérica humana (HSA) e seu potencial inibidor frente à enzima topoisomerase II α humana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil antiproliferativo, a capacidade de interação com DNA e com a proteína albumina sérica humana (HSA) e o potencial inibidor da topoisomerase dos derivados quinolina tiossemicarbazonas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o modo de ligação entre DNA e os derivados quinolina-tiossemicarbazonas (**JF**) por meio de estudos de viscosidade relativa do DNA;
- Analisar a capacidade de ligação dos derivados **JF** com a Albumina Sérica Humana (HSA);
- Realizar ensaios de deslocamento competitivo com sondas específicas para intercalação ao DNA e sítios da HSA, a fim de comprovar os mecanismos e sítios de ligação com estas biomoléculas;
- Investigar o perfil antiproliferativo dos derivados contra células tumorais mamárias e macrófagos *in vitro*;
- Verificar o potencial inibidor dos compostos frente à enzima topoisomerase II α Humana e comparar os resultados de inibição dos derivados **JF** com análogos derivados acridina-tiossemicarbazona (**LT**).

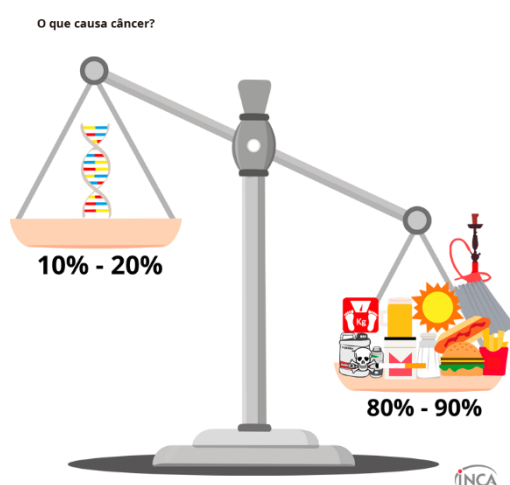
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

O câncer é definido como uma neoplasia maligna, caracterizada pela proliferação celular descontrolada e sustentada. Sua alta incidência é motivo de grande preocupação mundial, principalmente por ser a doença que mais acomete homens e mulheres, atrás somente das doenças cardiovasculares (AKHTAR et al., 2017). É considerado um grave problema de saúde pública por ser capaz de ocasionar mais de 600 mil mortes por ano em todo o mundo, e estima-se que a cada ano no triênio 2020-2022, mais de 625 mil novos casos sejam relatados no Brasil (INCA, 2020).

O crescimento tumoral ocorre devido à grande instabilidade genômica e ao amplo poder de plasticidade e autonomia que muitas células normais começam a apresentar (LABIB et al., 2018; SAINI; GUPTA, 2018). Essa instabilidade pode ser promovida por diversos danos na molécula de DNA e em proteínas de reparo, em resposta à liberação de citocinas por neutrófilos e macrófagos quando há presença de patógenos (DUIJF et al., 2019; ALNAJJAR; SWEASY 2019). Os fatores externos como sedentarismo, tabagismo, má alimentação, exposição à luz solar, entre outros, são elementos que também possuem grande relevância nesse processo de mudança a nível molecular, representando até 90% das causas de câncer (Figura 1) (INCA, 2020).

Figura 1 – Representação das causas internas e externas do câncer e seus respectivos percentuais (10-20% fatores internos; 80-90% fatores externos).



Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA).

A proliferação desordenada da célula tumoral leva, em estágio avançado, à saída de seu local primário para outras regiões do corpo, invadindo diferentes tecidos e órgãos, processo denominado de metástase tumoral (BIST et al., 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Esta capacidade de deslocamento é considerada como uma das marcas características do câncer (Figura 2), e envolve a perda da molécula de adesão E-caderina, ocasionando a Transição Epitélio Mesenquimal (EMT) (ABAD; GRAIFER, LYAKHOVICH, 2020; HANAHAN; WEINBERG, 2017). Essa migração pode ocorrer também pela penetração de tecidos adjacentes e pelos vasos linfáticos, sendo um processo complexo e auxiliado por células acessórias do microambiente tumoral. Ao longo da progressão maligna, também são desenvolvidas pela célula tumoral outras propriedades, conforme descritas por Hanahan e Weinberg (2017) (Figura 2).

Figura 2 – Alterações celulares que permitem a progressão tumoral.



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg (2017).

A figura 2 expõe dez características encontradas na maioria dos cânceres humanos, que contribuem para o desenvolvimento e permanência dos tumores, denominadas *Hallmarks*. A **sustentação da sinalização proliferativa** se dá por meio de um conjunto complexo de sinais que induzem a divisão celular descontrolada e, conseqüentemente, o crescimento acelerado da célula tumoral. Um fator que facilita esse processo é a **evasão dos supressores de crescimento** (Figura 2). Na divisão celular normal, os genes supressores de tumor codificam proteínas que

regulam a proliferação, por exemplo a proteína supressora de tumor p53, que desencadeia a morte celular programada, se necessário. Quando a p53 sofre uma mutação, ocorre perda de sua função e todo o sistema de regulação é prejudicado, permitindo o avanço do ciclo celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2017).

A **imortalidade replicativa** é o potencial ilimitado que a célula tumoral passa a adquirir quando ignora o ponto de verificação de telômeros curtos e continua se proliferando. Estes telômeros, localizados nas extremidades dos cromossomos, são responsáveis por limitar o número de gerações de uma célula, à medida que vai reduzindo seu comprimento em cada divisão celular. Com sua diminuição, a célula entende que deve parar o seu ciclo ou entrar em apoptose, mediada pela proteína p53. No entanto, com a mutação da p53 esse reconhecimento de danos ao DNA não acontece, contornando a barreira proliferativa (HANAHAHAN; WEINBERG, 2017).

Outra característica importante é a **driblagem do sistema imune** apresentada por muitos tipos de câncer. Apesar das células cancerígenas secretarem antígenos que são reconhecidos por células da resposta imune, muitos outros antígenos são expressos tanto por elas quanto por células de tecidos normais, o que confunde o sistema imunológico e leva ao desenvolvimento da autotolerância. Esses processos culminam na **resistência à morte celular** que, em células não mutadas, acontece de forma programada, comumente chamada de apoptose. A resistência ocorre pela superexpressão e tolerância relacionada a uma bomba de efluxo da glicoproteína P (P-gp), um transportador localizado na membrana plasmática das células, principalmente as tumorais, responsável por realizar o efluxo de quimioterápicos e demais substâncias contra seu gradiente de concentração (KATAYAMA; NOGUCHI; SUGIMOTO, 2014; AMIN, 2013; SUI et al., 2012).

A **desregulação energética** também é considerada importante para o crescimento tumoral, sendo consequência da depleção do DNA mitocondrial e desregulação da cadeia transportadora de elétrons (HSU; TSENG; LEE, 2016). De acordo com Hanahan e Weinberg (2017), essas mudanças permitem o aumento da captação de glicose pela célula neoplásica, utilizando-a como fonte de energia e varia conforme o tipo de tumor e seus diferentes microambientes teciduais. A glutamina e o lactato também são captados, sendo suplementares no fornecimento de energia. A célula tumoral necessita, além destas fontes de energia, de outros nutrientes e oxigênio para sustentar sua proliferação. Para isso, induzem a formação de novos vasos sanguíneos, a então chamada **angiogênese**.

As características descritas acima são adquiridas devido à **instabilidade e mutação do genoma** e ao **processo inflamatório** por meio de células do sistema imunológico. O genoma

pode sofrer mutações a partir de muitos danos que ocorrem na molécula de DNA por exposição a fatores internos ou externos ocasionados por hábitos não saudáveis. Porém, nem todos os tumores se desenvolvem a partir dessa instabilidade, já que em alguns tipos de células tumorais, esta pode ser uma consequência dos *hallmarks* supracitados, e não a causa deles (HANAHAAN; WEINBERG, 2017).

Durante o processo tumoral, muitas células imunes infiltrantes (CII), tais como linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, monócitos, entre outros, começam a se aproximar do microambiente tumoral com a tentativa de cessar o desenvolvimento do tumor. Contudo, o que acontece de fato é a contribuição destas CII na aquisição dos muitos *Hallmarks* do câncer (HANAHAAN; WEINBERG, 2017; WANG et al., 2016). As CII são recrutadas em vários estágios da tumorigênese e ajudam as células a se proliferarem, ativarem a angiogênese e driblarem os sinais anti crescimento. Em outras situações, alguns processos inflamatórios já existentes podem contribuir para o início e progressão do câncer. Para tanto, não há como afirmar que a inflamação ocasiona o câncer ou que o câncer impulsiona um processo inflamatório, sendo ainda considerado um intrigante paradoxo (FIGUEIREDO, 2019).

As características emergentes supracitadas são facilitadas pela presença do microambiente tumoral, um microambiente, antes normal, que fora modificado pelo processo de tumorigênese. Este microambiente é formado por diferentes tipos celulares (fibroblastos, proteínas de matriz extracelular, vasos sanguíneos e linfáticos, células imunes, etc.) que, quando recrutados, interagem entre si e contribuem para o desenvolvimento do tumor. Nesta perspectiva, percebe-se o grande nível de complexidade do câncer e, de certa forma, estes fatores dificultam a escolha do tratamento e a eficácia terapêutica (FIGUEIREDO, 2019; KLEM; JOYCE, 2015; HANAHAAN; COUSSENS, 2012; CAMPOS, 2010).

Portanto, conhecer os *Hallmarks* do câncer e as peculiaridades de cada tumor torna a escolha do melhor tratamento quimioterápico mais inteligível. Atualmente, as opções para o tratamento de tumores incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia e transplante de medula óssea sendo necessário, muitas vezes, combinar mais de uma modalidade de tratamento para obter os efeitos desejáveis (INCA, 2020). O tratamento comumente utilizado é a quimioterapia antitumoral, escolhida para tumores do sistema hematopoiético e tumores sólidos, que utiliza substâncias químicas isoladas ou combinadas para diminuir ou, até mesmo, eliminar o tumor. Esta pode ser combinada também com a cirurgia e/ou radioterapia, a depender de sua finalidade (INCA, 2008).

A quimioterapia pode ser classificada em: curativa, adjuvante, potencializadora, neoadjuvante e paliativa. A curativa objetiva um controle completo do tumor, já a adjuvante é

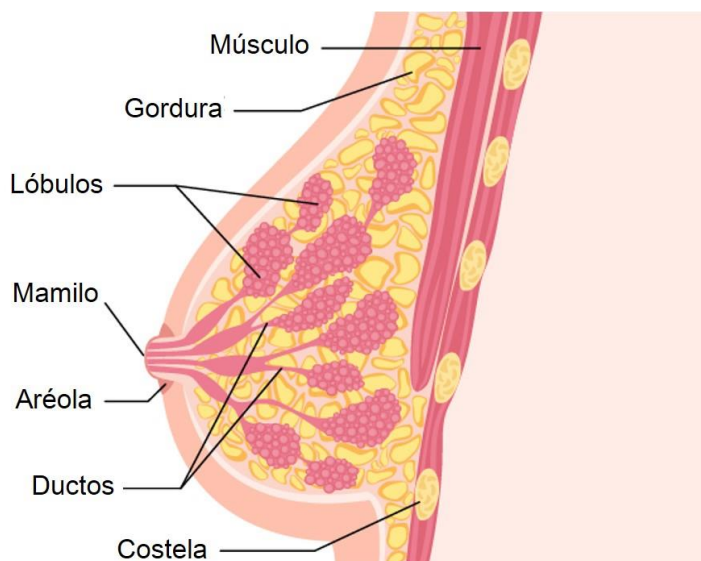
aplicada após uma cirurgia curativa, com o intuito de esterilizar células residuais locais ou circulantes e diminuir a incidência de metástases à distância. A potencializadora é utilizada simultaneamente à radioterapia para potencializar o efeito dos fármacos no local que receberá a radiação, porém, não interfere no efeito sistêmico do tratamento. A terapia neoadjuvante, por sua vez, é indicada quando se deseja reduzir parcialmente o tumor, atuando previamente como uma complementação terapêutica de uma cirurgia ou radioterapia. Por fim, o tratamento paliativo não tem finalidade curativa, é utilizado somente para melhorar a qualidade da sobrevida do paciente (INCA, 2008).

É importante salientar que os quimioterápicos antineoplásicos atuam de maneiras diferentes, podendo ser: (1) agentes alquilantes (os mais utilizados, atuando por meio da ligação ao DNA), (2) antimetabólitos, os quais inibem a biossíntese de moléculas essenciais para a divisão celular, (3) inibidores mitóticos (que exercem sua ação na proteína tubulina e impedem a migração dos cromossomos durante a metáfase) e (4) antibióticos antitumorais, que inibem a síntese de proteínas e DNA (ALMEIDA et al., 2005; INCA 2018). Muitos deles são utilizados na clínica para o tratamento de diversos tipos de tumores, inclusive para o câncer de mama. Temos como exemplo, além da Doxorrubicina e 5-fluorouracil, a ciclofosfamida, capecitabina e Docetaxel (BARZAMAN et al., 2020).

2.1.1 Câncer de mama

O câncer mamário tem seu início na região da mama (Figura 3), uma glândula constituída por células epiteliais e mioepiteliais envolvidas por tecido adiposo e conjuntivo, como também linfonodos intraductais, que se ramificam até as axilas, e estruturas denominadas ductos e lóbulos (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015). Os lóbulos são responsáveis pela produção do leite materno e os ductos possuem células capazes de o transportar até os mamilos sendo, ambos, os locais mais comuns de origem do câncer de mama (VIDEIRA; REIS; BRITO, 2014).

Figura 3 – Representação interna da glândula mamária com seus respectivos componentes.



Fonte: Adaptado de West Cancer Center (2020).

Segundo estimativas para o triênio 2020-2022, são esperados 66.280 novos casos de câncer de mama em todo o Brasil (INCA, 2020), sendo o maior número incidente em mulheres, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma (AKHTAR et al., 2017). Além disso, este tipo de câncer foi responsável por 17.572 óbitos em 2018, equivalente a 16,4% de todas as neoplasias (INCA 2020), o que demonstra seu potencial letal.

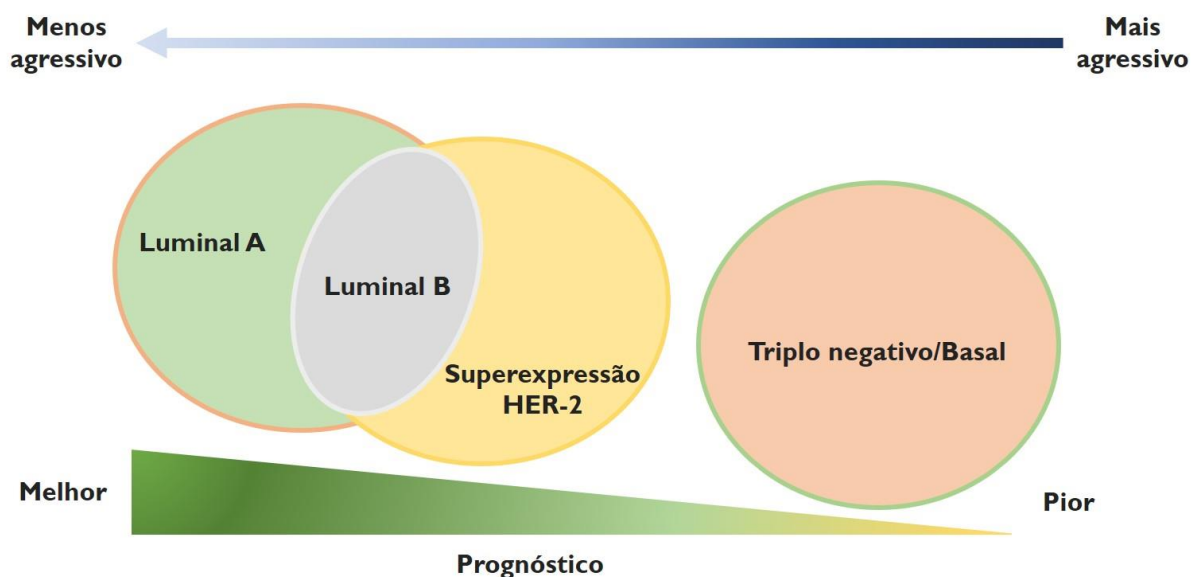
O câncer de mama é uma doença complexa, com prognóstico que varia de acordo com o tamanho do tumor, grau de diferenciação em relação ao nível histológico, comprometimento axilar, invasão linfovascular e expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP), receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER-2) e ki-67 (marcador de proliferação nuclear). Ou seja, trata-se de uma doença heterogênea tanto do ponto de vista morfológico como clínico, mesmo com características patológicas similares, ocasionadas pelos diferentes níveis de expressão gênica. Com isso, foi sugerida uma classificação deste carcinoma em diferentes subtipos moleculares (AL-THOUBAITY, 2020; SERRA et al., 2014; CIRQUEIRA et al., 2011).

Essa classificação é uma forte aliada no prognóstico e na escolha do melhor tratamento, já que cada subtipo responderá à terapia de maneiras diferentes. A subtipagem molecular do câncer de mama é comumente realizada por meio da técnica imunohistoquímica, utilizando alguns biomarcadores clássicos como RE, RP, HER-2 e Ki-67. Também é possível classificar este carcinoma por perfis de expressão gênica utilizando microarranjos de DNA complementares (AL-THOUBAITY, 2020). Baseados nesses biomarcadores, o câncer de

mama é dividido em cinco subtipos: **Luminal A** (RE+ / RP+ / HER2- / Ki-67 <20%), **Luminal B HER 2 positivo** (RE+ / RP+ / HER2+ / Ki-67 >20%), **Luminal B HER-2 negativo** (RE+ / RP+ / HER2- / Ki-67 >20%), **Superexpressão de HER-2** (RE- / RP- / HER2+) e **Triplo negativo/Basal** (RE- / RP- / HER2-), determinados na *St. Gallen International Breast Cancer Conference* em 2011 (FRAGOMENI; SCIAL LIS; JERUSS, 2018; KONDOV et al., 2018).

A diferença entre os subtipos é evidenciada pela expressão diferenciada destes marcadores na superfície da célula tumoral mamária, que podem determinar o nível de agressividade do tumor (Figura 4) (HENG et al., 2016). Os biomarcadores RE e RP são preditivos, relacionados à resposta que o portador do câncer de mama terá a um determinado tratamento. O HER-2 é relativo ao prognóstico e se há riscos maiores ou menores de mortalidade. Já o Ki-67 é um marcador de proliferação nuclear expresso em algumas fases do ciclo celular e seu alto nível se correlaciona com um pior prognóstico (FRAGOMENI; SCIAL LIS; JERUSS, 2018; STOCKMANS et al., 2015).

Figura 4 – Prognóstico e nível de agressividade dos subtipos moleculares do câncer de mama



Fonte: Adaptado de Heng et al., (2016).

O Luminal A é o menos agressivo quando comparado aos demais subtipos, respondendo bem às terapias hormonais. O Luminal B também apresenta resposta ao tratamento hormonal devido à presença de RE e RP, mas o fator prognóstico é prejudicado devido ao maior nível de ki-67, quando comparado com o Luminal A. A característica mais agressiva do Luminal B ainda pode ser verificada especialmente no subtipo com ausência do biomarcador HER-2, o que dificulta, de certa maneira, as estratégias de tratamento para este tumor. Já o subtipo que

apresenta superexpressão de HER-2, apesar de ter ausência de expressão de RE e RP, possibilita como alternativa o uso de terapias tendo o HER-2 como alvo. Geralmente, para este subtipo, é utilizado como tratamento o anticorpo monoclonal Trastuzumabe (Herceptin®). O tumor triplo negativo é o maior vilão dentre todos os subtipos, pois a ausência de todos os biomarcadores supracitados dificulta o diagnóstico e contribui para uma natureza mais agressiva, por não responder bem às terapias hormonais e às que utilizam como alvo o HER-2. Tanto o subtipo HER-2 superexpresso quanto o triplo negativo originam-se nos ductos mamários (FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

Alguns exemplos de células tumorais de mama são as linhagens MCF-7, T-47D e MDA-MB-231 que apresentam diferentes características moleculares e são bastante utilizadas na Química Medicinal para o estudo de candidatos à fármacos antitumorais voltados ao câncer de mama. A MCF-7 se enquadra no subtipo Luminal A, já a T-47D e MDA-MB-231 são dos tipos Luminal B e Triplo negativo, respectivamente (MOTA et al., 2017). Nesta perspectiva, é possível explorar como as suas diferentes características contribuem na resposta aos tratamentos antineoplásicos, bem como outros possíveis alvos biológicos que podem ser encontrados nestas linhagens tumorais.

2.1.2 Alvos biológicos para o tratamento do câncer

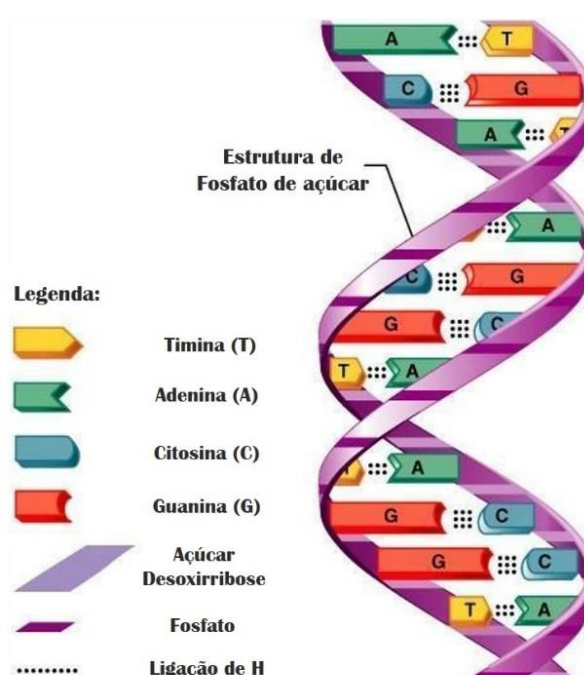
Medicamentos utilizados para o tratamento do câncer têm como mecanismo de ação a ligação a alvos biológicos específicos da célula tumoral. O DNA e a enzima topoisomerase são exemplos de alvos investigados para muitos candidatos à fármacos, inclusive neste estudo, sendo apresentados nas seções a seguir.

2.1.2.1 DNA (terapia alvo)

O DNA (Figura 5) é considerado um alvo terapêutico para muitos fármacos utilizados na clínica, principalmente os antineoplásicos. Tem suma importância por estar presente em todas as células tumorais e por sofrer continuamente o processo de replicação. Este mecanismo é primordial para a sobrevivência celular, já que a ausência do DNA não permite seu desenvolvimento (RESCIFINA et al., 2014; ZHU et al., 2014). É constituído por duas cadeias complementares de fosfato de açúcar e bases nitrogenadas, ligadas entre si por interações de hidrogênio. Essa ligação permite uma conformação em hélice, apresentando sulcos maiores e

menores ao longo de toda a estrutura, e possibilita o reconhecimento molecular por vários ligantes como proteínas e enzimas de replicação (ABDULLAH; ZEEBAREE, 2017; ALI; BHATTACHARYA, 2014). Durante as fases habituais de crescimento celular, ocorrem mecanismos de detecção, resposta e reparos a danos ao DNA, que evitam mutações e mantêm a integridade e estabilidade do genoma. No entanto, mudanças ocasionadas por falhas nestes processos podem contribuir para a aquisição de certas características tumorais (os chamados *Hallmarks* anteriormente citados) (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017).

Figura 5 – Estrutura helicoidal da molécula de DNA e seus componentes



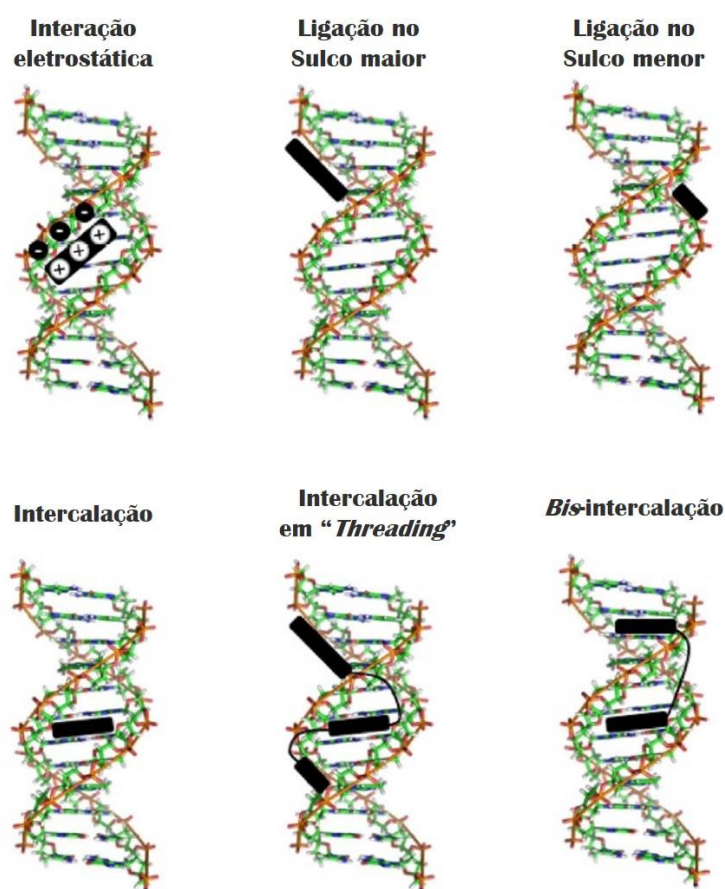
Fonte: Adaptado de Abdullah; Zeebaree (2017).

Para impedir o descontrole replicativo, muitas substâncias ligam-se à molécula de DNA e dificultam o reconhecimento dos vários coadjuvantes que participam do processo de replicação, gerando danos irreversíveis à célula. Existem diversas formas de ligação ao DNA, apresentadas na figura 6, inclusive algumas delas são realizadas por muitos fármacos (ALMEIDA et al., 2017). A interação por atração eletrostática ocorre quando as cargas positivas dos ligantes interagem de forma iônica com os grupos fosfatos do DNA carregados negativamente. Na sequência, os ligantes nos sulcos realizam ligações não covalentes nas cavidades maiores ou menores da dupla hélice e os intercalantes se encaixam entre os pares de bases do DNA. Este último ocorre quando os ligantes possuem em sua estrutura anéis aromáticos condensados, com características rígidas e planares, que realizam interações

hidrofóbicas com os anéis presentes nas bases nitrogenadas (ALMEIDA et al., 2017; GIRI et al., 2017; NARVA et al., 2016).

Dependendo da estrutura dos ligantes, a interação DNA-ligante pode envolver mais de um modo, explicitado na Figura 6, encaixando-se de acordo com sua conformação. A presença de espaçadores nas moléculas concede essa possibilidade, tendo como exemplos a *bis*-intercalação (quando a molécula tem duas regiões intercalativas) e a intercalação em “*Threading*”, ou seja, substâncias com estruturas capazes de realizar concomitantemente intercalação e ligações nos sucros do DNA (Figura 6) (ALMEIDA e al. 2017). Esses modos de ligação prejudicam a ligação de proteínas, enzimas e outros elementos que realizam a abertura da dupla hélice, assim como a duplicação do DNA. Desse modo, a célula tumoral, exposta aos ligantes de DNA, não conseguirá se desenvolver, ou seja, o processo de carcinogênese será inibido (RESCIFINA et al., 2014; ZHU et al., 2014).

Figura 6 – Representação dos diferentes modos de ligação ao DNA



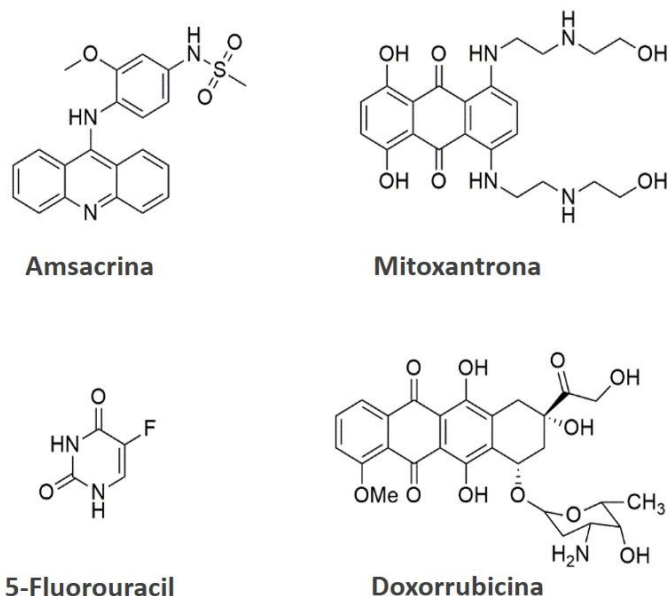
Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2017).

As interações DNA-ligante podem ser estudadas por diversas técnicas, entre elas métodos espectroscópicos e viscosidade relativa (RIBEIRO et al., 2019). As análises espectroscópicas que podem ser aplicadas são absorção UV-Vis, fluorescência e DC. São técnicas analíticas bastante utilizadas, pois, fornecem informações valiosas sobre estrutura, conformação e os modos de interações entre ligantes e o DNA, auxiliando na melhor compreensão da complexidade das mais diversas macromoléculas biológicas (ALMEIDA et al., 2017; KARAMI et al., 2017; SHANKARAIHAH et al., 2016; LAFAYETTE et al., 2013). O uso de sondas fluorescentes como o laranja de Acridina (LA) também pode ser aplicado nestes estudos, o que permite avaliar a capacidade dos ligantes em competir com as sondas pelos sítios de ligação do DNA, a fim de obter informações mais preditivas acerca do modo de interação das substâncias (SAWAR et al., 2017).

Além das técnicas espectroscópicas, técnicas hidrodinâmicas como a viscosidade relativa permitem confirmar, de fato, o modo de ligação ao DNA pelo aumento ou diminuição de sua viscosidade após o contato com os ligantes. Se ocorrer o aumento da viscosidade do DNA, significa que o ligante ocasionou a extensão da dupla fita, devido ao desarranjo estrutural causado pela intercalação. Caso não haja o aumento da viscosidade, ou ocorram alterações quase imperceptíveis, comprova-se a ocorrência de ligações nos sulcos do DNA ou atrações eletrostáticas (MIRZAEI-KALAR, 2018; GANESHPANDIAN et al., 2014; PARVEEN et al., 2016).

Muitos medicamentos antineoplásicos atuam ligando-se ao DNA, entre eles a Doxorubicina (quimioterápico voltado para o câncer de mama), a amsacrina (*mAMSA* - utilizada como controle positivo neste trabalho), Mitoxantrona e 5-Fluorouracil (Figura 7) (LEI; WANG; WU, 2012; JANGIR et al., 2012; JANGIR et al., 2011; SHAHABADI; HEIDARI, 2012). Em contrapartida, estes fármacos também ocasionam diversos efeitos adversos quando utilizados como, por exemplo, perda de apetite, baixa imunidade, fadiga, perda de cabelos, entre outros (NICOLUSSI et al., 2016; ROESE; FONTANA; PEREIRA, et al., 2018). Outro fator preocupante é a resistência da célula tumoral a esses fármacos já que, além de não responder bem à terapia, a recidiva do tumor pode acontecer no local do tumor primário ou em outras regiões do corpo (ABDELMOEZ et al., 2017).

Figura 7 – Estrutura química de alguns quimioterápicos antineoplásicos.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

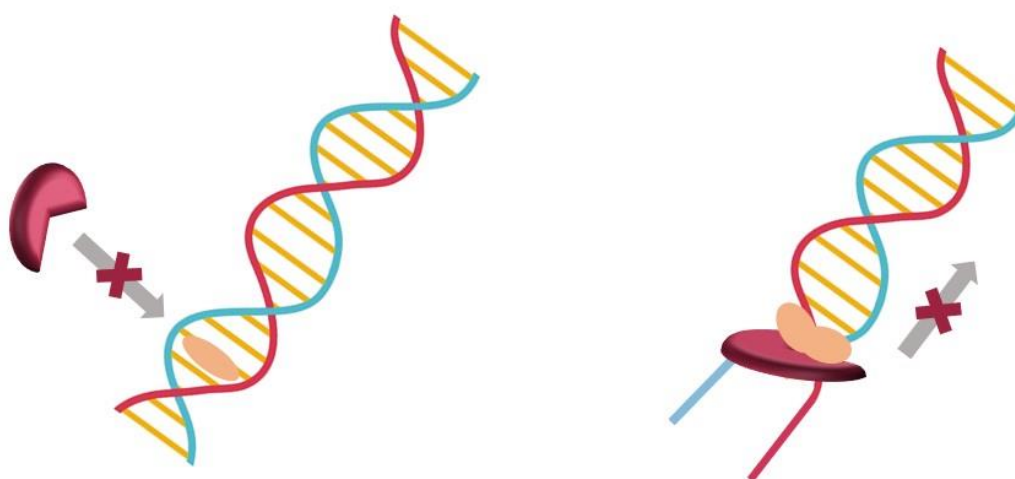
Desta forma, sendo o DNA um importante alvo biológico, este pode ser utilizado em amplos estudos com candidatos à fármacos anticâncer. Esta vertente possibilita a análise de mecanismo de ação e as possíveis formas de interação, considerando o DNA como protagonista para futuras terapias alvo.

2.1.2.2 Topoisomerase como alvo para terapia antitumoral

A enzima topoisomerase (topo) localiza-se no núcleo celular e possui papel importantíssimo durante a replicação, transcrição e reparos do DNA. Ela catalisa a clivagem e religação da biomolécula, permitindo seu contínuo processo de proliferação, por isso é considerada um dos alvos bastante estudados para a terapia do câncer, já que a sua inibição ocasiona na parada do ciclo celular e consequente resposta terapêutica antitumoral pelos quimioterápicos. A topo é classificada em dois tipos, diferindo-se por sua função em: topo I, que cliva uma fita simples de DNA, e topo II, responsável por cortes transitórios da dupla fita (MOTEGI et al., 2019; GOUVEIA et al., 2018; HU et al., 2018). O genoma humano expressa dois tipos de topo II: topo II α e topo II β , codificadas por dois genes diferentes e com funções aparentemente distintas. A topo II α é superexpressa em células tumorais, já que se proliferam rapidamente, sendo reconhecido como o tipo promissor nos estudos com candidatos à fármacos (ALMEIDA et al., 2017; POMMIER et al., 2016).

Considerando-a como alvo biológico, a topo pode ter sua ação inibida de duas formas: catalítica ou tipo “veneno” (Figura 8). Os inibidores catalíticos impedem a formação do complexo enzima-DNA ou atuam impedindo a clivagem e, consequente relaxamento do DNA. Já o tipo “veneno” age após a ligação da topo ao DNA, estabilizando um complexo ternário intermediário DNA-inibidor-topo, prejudicando a religação da dupla fita. Esses fatores são essenciais para estagnação do ciclo celular e consequente apoptose (ALMEIDA et al., 2017). Na maioria dos casos, a topoisomerase é sensível aos medicamentos direcionados ao DNA, por isso, quando o inibidor atua no DNA, ele também interrompe as funções vitais da topo, podendo ser considerado um inibidor interfacial por sua ação simultânea (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 8 – Ilustração dos mecanismos de inibição do tipo catalítico (à esquerda) e do tipo “veneno” (à direita) da enzima topoisomerase.



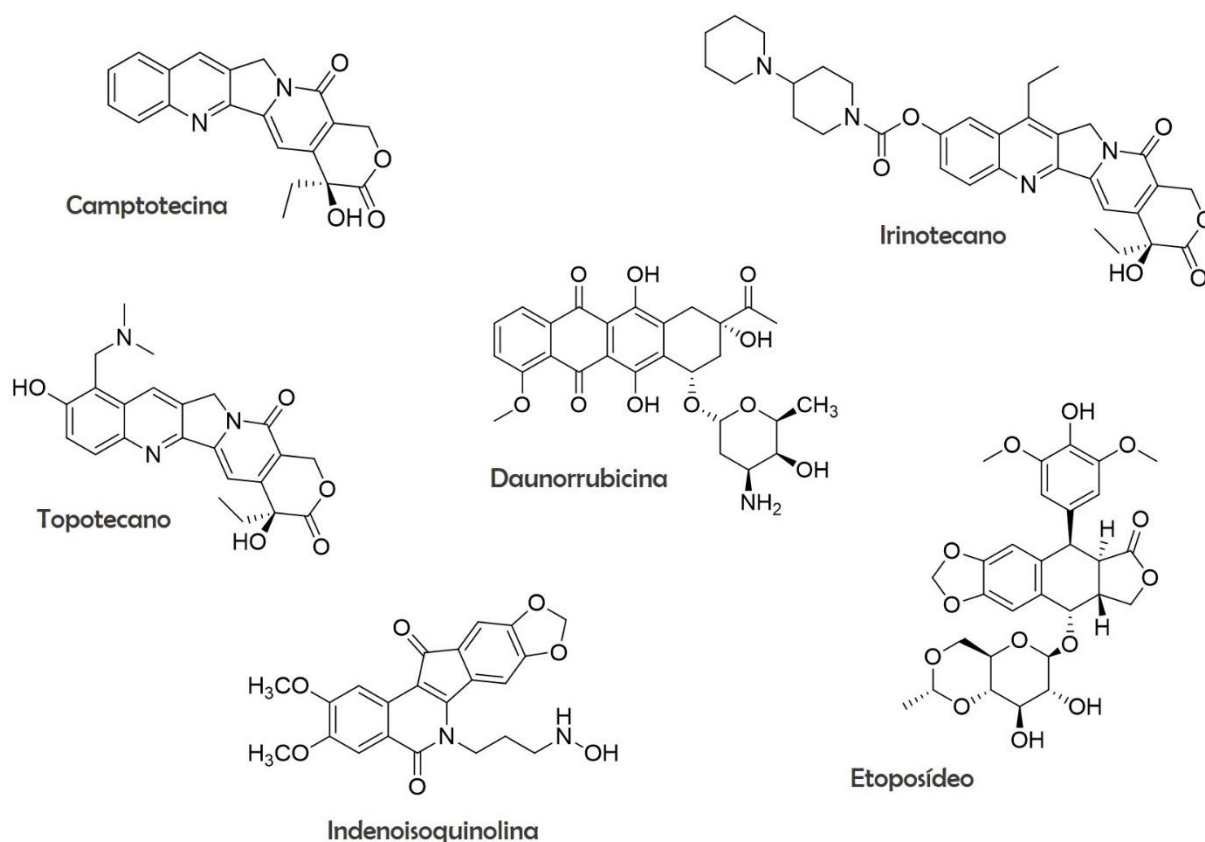
Imagens meramente ilustrativas

Fonte: próprio autor.

Alguns fármacos são conhecidos por inibir a atividade da enzima topo. Podemos citar, como exemplos de inibidores topo I, a Camptotecina e seus derivados: Irinotecano, Topotecano e Indenoisoquinolina (Figura 9) (VUTEY et al., 2016). Os inibidores estabelecidos de topo II são a Doxorrubicina, Mitoxantrona, *m*AMSA (Figura 7), Etoposídeo e Daunorrubicina (Figura 9), quimioterápicos amplamente utilizados na clínica para o tratamento do câncer. Ambos inibidores topo I e II descritos são considerados do tipo “veneno” (PALLUOTTO et al., 2016) e muitos deles possuem como mecanismo de ação a interação com a molécula de DNA, conforme descrito na seção anterior.

Infelizmente, tratamentos a longo prazo com os inibidores de topo ocasionam resistência e surgimento de neoplasias secundárias. Para superar esta dificuldade, a estratégia é projetar moléculas que tenham a capacidade de modular, simultaneamente, dois ou mais alvos biológicos (HU et al., 2018). Sendo assim, substâncias que consigam inibir a topo e atuar conjuntamente na molécula de DNA são consideradas promissoras, possibilitando maior eficácia terapêutica e menores efeitos indesejáveis.

Figura 9 – Estrutura química de alguns inibidores tipo "veneno" das enzimas topo I e II.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

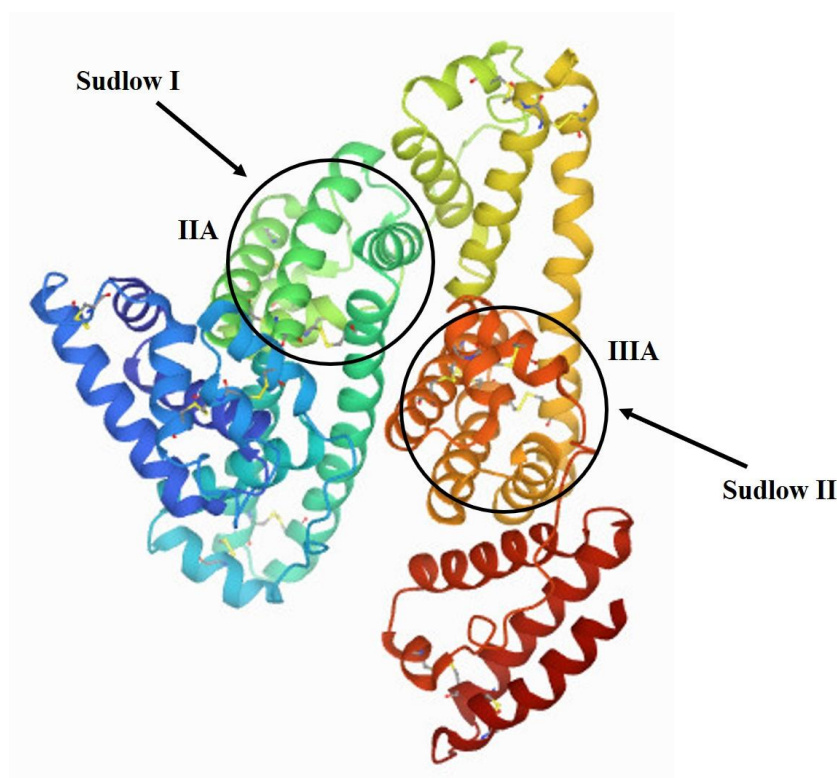
3.2 ALBUMINA SÉRICA HUMANA (HSA)

No sistema fisiológico humano, existem diversas substâncias que exercem importantes funções, como os aminoácidos, hormônios, vitaminas, proteínas e enzimas. Dentre as proteínas, podemos citar a albumina sérica humana (HSA) como uma das mais abundantes no plasma sanguíneo (BAGHERI; FATEMI et al., 2018; RÀFOLS et al., 2018). Uma de suas principais funções é o transporte de substâncias endógenas e exógenas, primordiais para um perfeito funcionamento biológico, além de auxiliar na absorção, metabolismo e excreção afetando, por

exemplo, o perfil farmacocinético de fármacos (MONDAL et al., 2017). Outras funcionalidades ainda são descritas para esta proteína como, por exemplo, funções antioxidantes, manutenção da pressão osmótica e participação do processo de agregação plaquetária e permeabilidade vascular (HOOGENBOEZEM; DUVAL, 2018; MOUJAESS et al., 2017; RÀFOLS et al., 2018; TAVERNA et al., 2013).

A HSA é uma macromolécula solúvel em água, constituída por três domínios homólogos (I, II e III), subdivididos em subdomínios denominados IA, IIA, IIIA, IB, IIB e IIIB. A ligação de compostos, inclusive medicamentos, se dá principalmente nos subdomínios IIA e IIIA, chamados Sudlow I e Sudlow II, respectivamente (Figura 10). Neste último, ligam-se carboxilatos aromáticos, como o Ibuprofeno, enquanto no Sudlow I ligam-se ânions heterocíclicos volumosos como, por exemplo, a Varfarina. Sua estrutura predominantemente helicoidal apresenta peso molecular de cerca de 66 kDa (585 resíduos de aminoácidos) (CHUGH et al., 2019; RÀFOLS et al., 2018; FASANO et al., 2005).

Figura 10 – Estrutura da HSA com seus respectivos sítios de ligação.



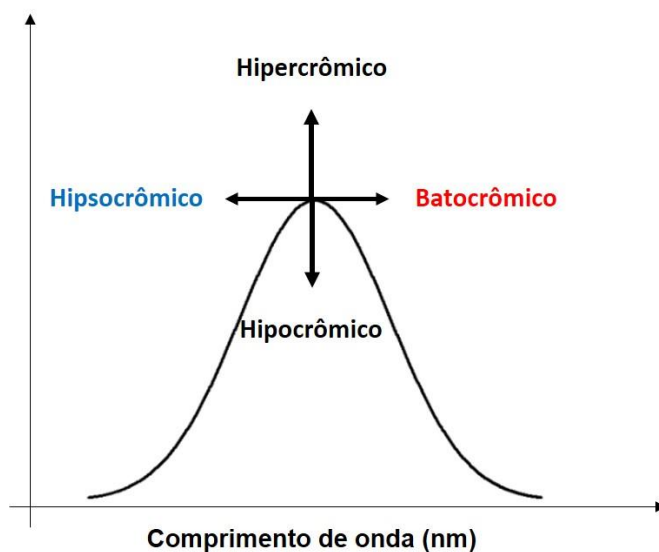
Fonte: PDB (cód. 1AO6 – Adaptado de Sugio et al. (1999)).

As cavidades Sudlow I e Sudlow II tem natureza hidrofóbica, por isso, muitos quimioterápicos lipofílicos ligam-se mais facilmente nesses sítios, sendo essencial analisar a

maneira com que eles interagem com esses domínios para estimar suas concentrações séricas livre. Esse fator se torna mais relevante devido à alta acumulação de HSA nas células tumorais, o que facilita a chegada dos medicamentos aos seus respectivos alvos (GUHATHAKURTA et al., 2017; LAKSHMI T. et al., 2017; LI et al., 2014). Este transporte mais eficiente pode estar relacionado ao aumento da solubilidade de fármacos, que favorece sua passagem em compartimentos mais hidrofílicos e influencia positivamente na estabilidade e toxicidade durante a quimioterapia, além melhorar a biodisponibilidade desses fármacos já que o tempo de meia vida da HSA é entre 14 e 20 dias (VARANKO; SAHA; CHILKOTI, 2020; BOSE, 2016; HEBIA et al., 2014; HU et al., 2005; SEDIGHIPOOR et al., 2017).

Para analisar, experimentalmente, a maneira como determinadas substâncias ligam-se à HSA, podemos utilizar análises espectroscópicas como absorção UV-Visível, fluorescência e dicroísmo circular devido à alta sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade destas técnicas. Elas, além de fornecerem informações sobre parâmetros físico químicos de fármacos, podem auxiliar na compreensão da complexidade de biomoléculas e na identificação de suas possíveis alterações estruturais e moleculares após contato com seus ligantes (JIANG et al., 2020; MU et al., 2019; KARAMI et al., 2017). A proteína HSA exibe pico máximo de absorção de luz em aproximadamente 280 nm, referente à transição $\pi - \pi^*$ dos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), Tirosina (Tir) e Fenilalanina (Fen) e emissão fluorescente na faixa de 320 a 400 nm dos mesmos resíduos quando excitada a 280 nm, sendo a maior parte atribuída ao triptofano (POURESHGHI et al., 2017; YASREBI et al., 2019). Ao utilizar essas análises, mudanças nos espectros da HSA após contato com os ligantes podem ser observadas como indicativo das interações entre eles (ESWARAN et al., 2016). As mudanças mais comuns são o aumento ou diminuição do pico máximo de absorção e fluorescência, denominados hipercromismo e hipocromismo, respectivamente. Também é possível ocorrer desvios destes picos para a região do azul, denominado efeito hipsocrômico, e para a região do vermelho (efeito batocrômico), conforme figura 11 (MISHRA et al., 2014).

Figura 11 – Efeitos espectrais que podem ser observados após interação entre HSA e ligantes.



Fonte: próprio autor.

O estudo de candidatos à fármacos antineoplásicos com a HSA é de suma importância, pois é sabido que em células tumorais há um aumento na produção destas proteínas devido à grande necessidade nutricional que possuem, utilizando a albumina como fonte de nutrição e energia (ALQAHTANI et al., 2019; MONDAL et al., 2017). Por isso, a ligação de substâncias a esta proteína contribui positivamente na maior eficácia terapêutica, especialmente aquelas direcionadas ao câncer.

3.3 QUÍMICA MEDICINAL: IMPORTANTE CIÊNCIA NA BUSCA DE NOVAS TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

A busca por novas alternativas terapêuticas vem ganhando destaque ao longo dos séculos em todo o mundo, justificada pelo surgimento de novas enfermidades e, muitas vezes, pelo fracasso terapêutico dos medicamentos disponíveis. Para o câncer não é diferente. Os quimioterápicos antineoplásicos utilizados na clínica possuem históricos de resistência, recidiva e efeitos adversos severos, como anteriormente citados. Essas falhas retratam a necessidade de mais medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer; e aplicar a Química Medicinal neste cenário se faz necessário, a fim de superar as dificuldades e contribuir para o avanço da ciência no âmbito da descoberta de novos fármacos.

A Química Medicinal é a força motriz central na proposição de diversos quimioterápicos, seja por meio do planejamento de novas substâncias, seja na identificação ou

modificações moleculares de produtos já existentes (PLOWRIGHT et al., 2017; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Neste trabalho, foram utilizados compostos oriundos de uma simplificação molecular a partir do anel acridina (BARREIRO, 2002), formando o núcleo quinolina. Os derivados quinolina tiossemicarbazonas (**JF**) possuem a quinolina, que é considerada um núcleo simplificado (dois anéis) em relação ao núcleo acridina (três anéis), este presente em muitos medicamentos anticâncer como a *m*AMSA, por exemplo (Figura 7).

Os compostos **JF** foram escolhidos pela semelhança estrutural com os derivados acridina tiossemicarbazonas, sintetizados por Almeida e colaboradores (2015), os quais apresentaram atividades antiproliferativas frente à diferentes linhagens de células tumorais, inibição da enzima topo e ligação ao DNA e BSA (SILVA-FILHO et al., 2019; ALMEIDA et al., 2015). Por isso, a simplificação molecular do núcleo acridina nos derivados quinolina tiossemicarbazonas resultou na obtenção de novos derivados com potencial efeito antiproliferativo e de ligação às biomoléculas (RIBEIRO et al., 2019). A seguir, serão apresentadas as contribuições das porções quinolina e tiossemicarbazonas em estudos com moléculas candidatas a fármacos antineoplásicos.

3.3.1 Quinolina e Tiossemicarbazonas

O núcleo quinolina, isolado em 1834, caracteriza-se pela presença de dois anéis aromáticos condensados, com um nitrogênio na posição 1 (Figura 12). É conhecido por estar presente em diversos compostos naturais e em derivados sintéticos úteis ao tratamento de diferentes enfermidades, além de amplas propriedades terapêuticas. Podemos citar as seguintes atividades: analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e antitumoral (BARBOSA-LIMA et al., 2017; MALAYERI et al., 2017; PINZ et al., 2017; MARELLA et al., 2013).

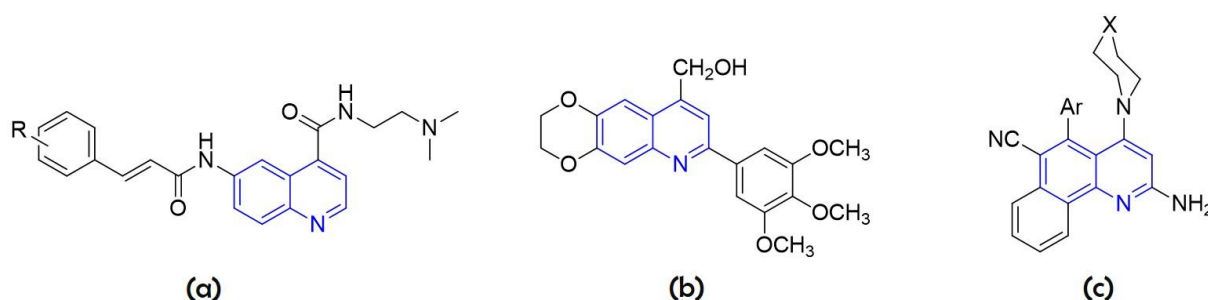
Figura 12 – Estrutura molecular do núcleo quinolina.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Este núcleo possui resultados promissores em testes com linhagens antitumorais, descritas em vários estudos. Dentre eles, os derivados **(a)**, **(b)** e **(c)** (Figura 13) apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células tumorais de mama, próstata, cólon, pulmão e pele, conforme visto nos trabalhos de Malayeri et al. (2017), Kuo et al. (2016) e Yadav et al. (2016), respectivamente.

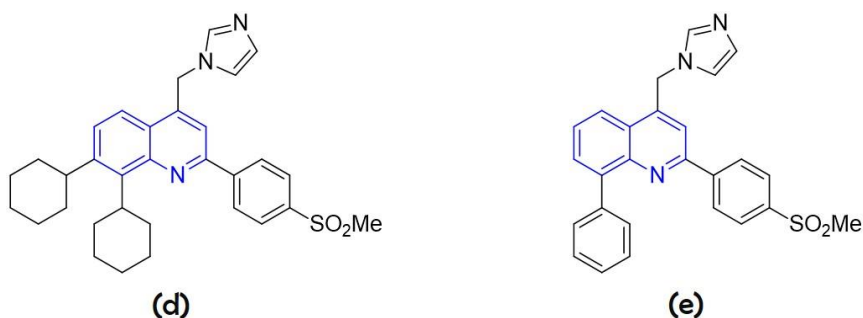
Figura 13 – Moléculas com potenciais citotóxicos antitumorais: cinamamidas **(a)**, aril dihidrodioxinos **(b)** e benzoquinolínicos **(c)**.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Em outros estudos, os derivados **(d)** e **(e)** (Figura 14), ocasionaram inibição significativa da proliferação de células tumorais mamárias MCF-7 e T-47D, sendo justificada por sua passagem através das membranas celulares, facilitada por suas propriedades lipofílicas (GHODSI et al., 2016). O melhor composto contra a linhagem MFC-7 foi o **(d)**, com $IC_{50} < 5 \mu M$, e para a T-47D o derivado **(e)** apresentou menor valor de $IC_{50} (< 25 \mu M)$.

Figura 14 – Derivados quinolínicos com melhores atividades citotóxicas contra células tumorais de mama: MCF-7 **(d)** e T-47D **(e)**.

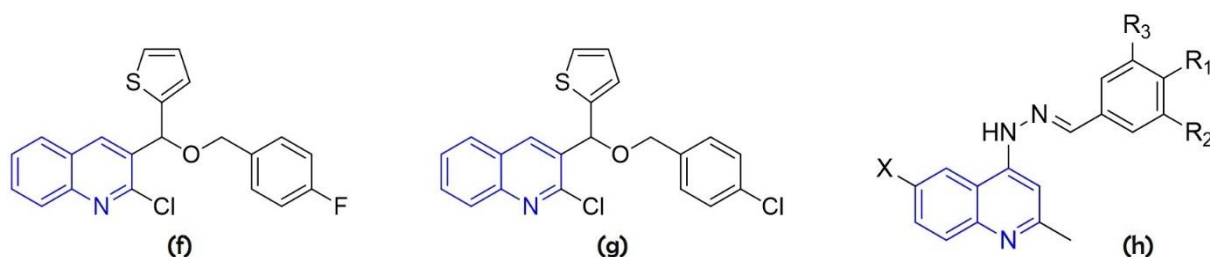


Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Trabalhos mais recentes como os de Othman et al. (2019) e Katariya, Shah e Reddy (2020), também relatam o potencial antiproliferativo de derivados quinolínicos. Othman et al. descreveram que dois compostos de sua série, os derivados **(f)** e **(g)** (Figura 15), tiveram maior

atividade contra a linhagem MCF-7, com valores de IC_{50} de 38,41 μ M e 28,36 μ M, respectivamente. Adicionalmente, foi observada a parada do ciclo celular na fase G2/M, indução da apoptose e inibição da enzima topo II. Nos estudos de Katariya et al., o derivado (**h**) (Figura 15) apresentou atividade e seletividade frente a várias linhagens testadas, quando comparado a outros derivados da série e dois medicamentos anticâncer clinicamente utilizados (bendamustina e clorambucil), indicando caráter promissor como agente anticâncer.

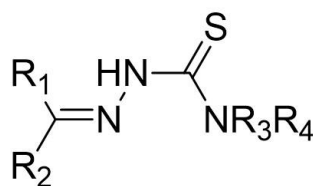
Figura 15 – Promissoras moléculas para atividade anticâncer que apresentam o núcleo quinolina.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

A porção tiossemicarbazona (Figura 16), conhecida como base de schiff, também se destaca por suas propriedades antitumorais, antimicrobianas, antiparasitárias, entre outras (SILVA et al., 2020; ARAÚJO NETO et al., 2017; ALMEIDA et al., 2015). Por isso, este perfil promissor é explorado por nosso grupo de pesquisa, com a realização de diversos trabalhos com as tiossemicarbazonas na busca de novos protótipos antineoplásicos.

Figura 16 – Estrutura química da porção tiossemicarbazona.

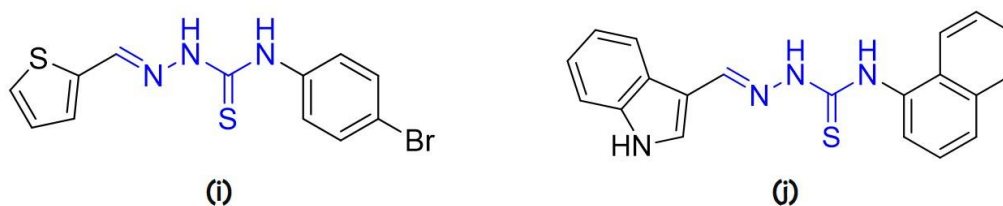


Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

O estudo de Oliveira et al. (2015) demonstrou atividades citostáticas *in vitro* dos derivados tiofeno tiossemicarbazonas em linhagens tumorais de rim, mama, ovário, cólon próstata, melanoma, pulmão e leucemia, com perfil antiproliferativo favorecido pela presença de anéis aromáticos e substituintes halogênicos. Um destes compostos (**i**) (Figura 17) apresentou inibição do desenvolvimento de tumores sólidos de Ehrlich e baixa toxicidade após administração oral. O potencial antiproliferativo, bem como ação de ligação ao DNA, também

fora estudado com compostos contendo as tiossemicarbazonas, conforme observado no trabalho de Oliveira e colaboradores (2017) (Figura 17). Menores valores de IC_{50} e forte ligação ao DNA constataram a importância desta porção para a resposta biológica do derivado (j), que inibiu também a enzima topoisomerase $II\alpha$.

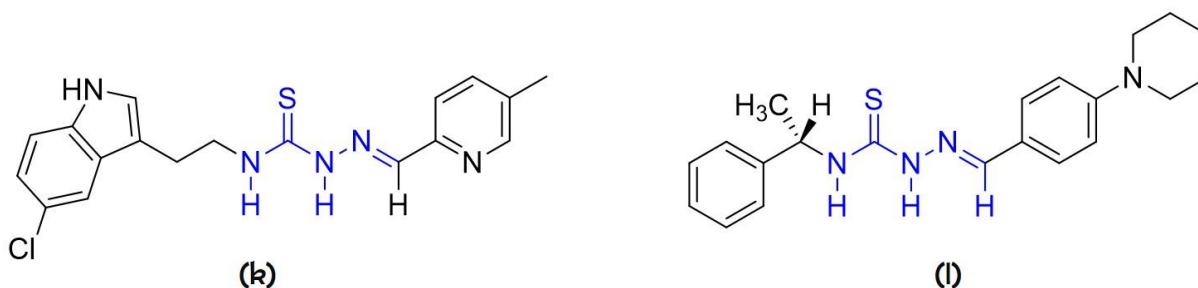
Figura 17 – Derivados tiossemicarbazonas com potenciais atividades antiproliferativas e ligação ao DNA.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Outros trabalhos também relataram a capacidade de ligação ao DNA e potenciais citotóxicos, como os descritos por Markovic e colaboradores (2013), onde derivados antraquinonas tiossemicarbazonas exibiram atividade antiproliferativa intercalando-se entre os pares de bases do DNA, e Ali et al. (2014) que também relataram atividade citotóxica frente a linhagem celular tumoral HCT-116. Recentemente, foram obtidos resultados para atividade anticâncer de moléculas da classe tiossemicarbazonas. Compostos (k) e (l) (Figura 18) impediram a proliferação celular tumoral, induziram a parada do ciclo celular e apoptose e interferiram no processo de migração celular *in vitro*, constatando a importância de mais estudos sobre essas moléculas (HE et al., 2019; BOZGEYIK et al., 2020).

Figura 18 – Compostos da classe tiossemicarbazona com atividades antiproliferativas *in vitro*.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

As porções quinolina e tiossemicarbazonas também demonstram resultados satisfatórios quando analisada sua capacidade de ligação à proteína albumina. Estudos de Vennila e Elango (2019) indicam efetiva interação de derivados quinolina com a albumina por meio de técnicas

multi espectroscópicas. Outros resultados também são descritos para este núcleo e revelam sua importância para o processo de interação (SHAHABADI; MAGHSUDI; SHOHRE, 2012; RAJA; BHUVANESH; NATARAJAN, 2012).

Semelhantemente, os trabalhos de Yu et al. (2013), Chaves e colaboradores (2020) e Ribeiro et al. (2019) indicam a contribuição da porção tiossemicarbazona para a interação com a albumina sérica, analisada por técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência e modelagem molecular. Mudanças espectrais e/ou efetiva interação por docking molecular apontam a formação de complexo ligante-albumina.

Pelo exposto, é possível observar o potencial terapêutico de derivados quinolina tiossemicarbazonas, o que encoraja os mais diversos estudos de moléculas que contenham essas estruturas, já que nos oferece uma perspectiva positiva para o tratamento do câncer.

4 METODOLOGIA

4.1. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS QUINOLINA TIOSSEMICABAZONAS

Neste trabalho, foram estudados doze derivados contendo o núcleo quinolina, com síntese e caracterização estrutural previamente descrita por Ribeiro et al. (2019). Os derivados contêm uma porção tiossemicarbazona com diferentes substituintes na porção final conforme demonstrado na Figura 19 e então codificados como **JF's 85-96**.

Figura 19 – Derivados 4-quinolina-tiossemicarbazonas (**JF**) utilizados neste e nos demais estudos.



Compostos	R
JF-85	<i>p</i> -flúor-fenil
JF-86	2-fenetil
JF-87	3-piridil
JF-88	<i>p</i> -cloro-fenil
JF-89	1-nafitil
JF-90	<i>p</i> -nitro-fenil
JF-91	<i>p</i> -tolil
JF-92	<i>p</i> -etil-fenil
JF-93	<i>p</i> -bromo-fenil
JF-94	<i>p</i> -metoxi-fenil
JF-95	alil
JF-96	fenil

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2019).

4.2 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA

A viscosidade é uma técnica hidrodinâmica que permite elucidar a maneira como determinadas moléculas se ligam à dupla hélice do DNA. Para tanto, neste estudo foi utilizada a solução de esperma de salmão (ssDNA), obtido da Sigma Aldrich, na concentração de 100 μ M e os compostos **JF**, diluídos previamente em DMSO (dimetilsulfóxido). O padrão de intercalação amsacrina (*m*AMSA) também foi utilizado e as concentrações finais dos derivados **JF** e *m*AMSA com o ssDNA foram 0, 12, 24, 36, 48 e 60 μ M, diluídos em tampão Tris-HCl. Os **JFs** são oriundos de uma síntese prévia que objetivou verificar, inicialmente, a capacidade de ligação ao DNA por técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e dicroísmo circular e ligação à BSA (proteína albumina sérica bovina).

O viscosímetro Stabinger Vicometer – Anton Paar (SVM 3000/G2) foi utilizado para as leituras da viscosidade do DNA, na presença e ausência dos compostos testes, na temperatura de 25°C. Os dados da viscosidade relativa foram plotados no programa SigmaPlot 10.0, usando a fórmula $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus R (relação entre as concentrações do complexo ssDNA/ligante/concentração do ssDNA livre, onde η é a viscosidade do DNA na presença dos ligantes e η_0 é a viscosidade do DNA na ausência destes (COHEN; EISENBERG, 1969).

4.3 ESTUDOS DE ABSORÇÃO UV-VIS E FLUORESCÊNCIA COM HSA

A Albumina Sérica Humana (HSA) foi uma doação da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) para aplicação nos estudos de interação com os derivados **JF** por meio da absorção UV-vis e fluorescência. Os compostos **JF** (Figura 19) foram diluídos em DMSO para obtenção de uma solução a 1 mM e a solução final de trabalho diluída em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4). As concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μ M dos derivados **JF** foram expostos à 20 μ M de HSA nos estudos de absorção e à 10 μ M de HSA nos estudos de fluorescência. Estas soluções foram agitadas e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, submetidas à análise nos aparelhos Espectrofotômetro UV-vis Ultraspec 3000 PRO (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) e Espectrofluorímetro JASCO FP-6300 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão).

Na absorção, a leitura foi realizada na faixa de 200 a 600 nm, em cubeta de quartzo retangular com um comprimento de percurso de 1 cm. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida através da equação de McGee e Von Hippel (1974):

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

onde, E_a , E_b e E_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da $[\mathbf{JF}]/(E_a - E_f)$ versus $[\mathbf{JF}]$ foram utilizados para obtenção dos K_b s a partir da razão entre a inclinação e o intercepto.

Na fluorescência, os espectros de emissão foram obtidos entre 300 e 400 nm, utilizando 283 nm de comprimento de excitação da HSA e bandas de excitação e emissão de 2,5 e 5 nm, respectivamente. As medições também foram realizadas em Cubeta de Quartzo retangular e a equação para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), foi a formulada por Lakowicz (2006):

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

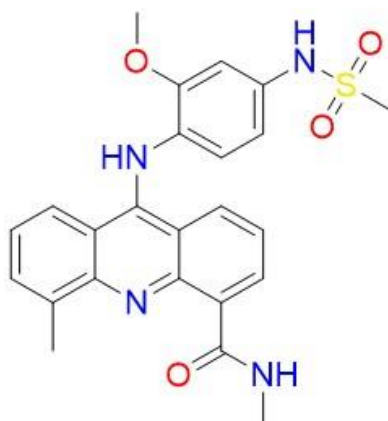
onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência da HSA no estado estacionário na ausência e na presença dos compostos **JF**, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração de inibidor. Todos os gráficos foram construídos com o software SigmaPlot 10.0.

As alterações nos espectros de absorção e fluorescência da HSA na presença dos compostos, como também os valores das constantes de ligação, foram analisados para identificação de informações relativas ao modo de interação.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade foi realizado pela técnica de MTT, um método rápido, sensível e de baixo custo capaz de fornecer dados sobre o estado metabólico da célula por meio da análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de substratos de enzimas microssomais e mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). As células de câncer de mama do tipo epitelial (MCF-7 e T-47D) foram mantidas em meio RPMI-1640 (suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina e estreptomicina). Foram plaqueadas 1×10^4 células/poço para MCF-7 e 2×10^4 células/poço para T-47D e mantidas por 24 horas. Em seguida, os compostos **JF** (Figura 19) e a *m*AMSA, foram incubados com as respectivas células nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M por 48 horas (com base no protocolo NCI60) em câmara umidificada com 5% de CO₂ à 37°C. Para verificar o possível efeito tóxico ao sistema humano, a análise de viabilidade celular com macrófagos RAW 264.7 foi realizada utilizando os compostos **JF**, *m*AMSA e Asulacrina (Figura 20), um fármaco antitumoral utilizado para o tratamento de câncer mamário e pulmonar, nas concentrações de 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. Neste ensaio foram mantidas as mesmas condições de temperatura e CO₂.

Figura 20 – Estrutura química da Asulacrina



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Os derivados que se destacaram nos ensaios com MCF-7 e T-47D (JF-85, 86, 87, 89, 90, 92) e o **JF-96** foram avaliados também com a linhagem triplo negativa MDA-MB-231 nas concentrações de 6,25 a 100 μ M. O **JF-96** foi utilizado para verificar a influência da sua não substituição neste estudo e a *m*AMSA como controle positivo. Neste ensaio, foram plaqueadas 1×10^4 células/poço de MDA-MB-231 e o experimento seguiu as mesmas condições dos ensaios supracitados.

Após 48h, a solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 5 mg/mL foi aplicada em cada poço e, em seguida, as placas foram incubadas novamente por 3 horas. O DMSO foi utilizado para dissolver os cristais de formazan formados e facilitar a leitura da absorbância à 575 nm com o leitor de placas Varioskan. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores de IC₅₀ (Inibição de células em 50%) e desvio padrão para as células MCF-7 e T-47D e CC₅₀ (concentração citotóxica em 50%) para a RAW 264.7 foram obtidos por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 7. Por fim, o índice de seletividade de cada composto para as linhagens tumorais foi calculado a partir da razão entre CC₅₀ e IC₅₀ (CC₅₀/IC₅₀). Para a MDA-MB-231 foi calculado o percentual de viabilidade em cada concentração utilizada.

4.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE IIA HUMANA

Neste ensaio, foram utilizados 100 ng de DNA do Plasmídeo pUC19 e 2 unidades de topoisomerase II α humana recombinante, ambos obtidos da Sigma Aldrich, em tampão de relaxamento (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP e 0,5 mM ditioneitol) (ALMEIDA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016). Os derivados **JF** e *m*AMSA

(figura 19) foram utilizados na concentração de 10 μM e incubados por 45 min, a 37°C. Em seguida, foi utilizada a eletroforese em gel de agarose (0,8%) para promover a migração e posterior visualização das bandas, utilizando o brometo de etídio a fim de facilitar a visualização sob luz UV. O software de processamento de imagem (Adobe Photoshop CS4 11.0x2007, San Jose, CA, EUA) permitiu a análise qualitativa das bandas do DNA superenovelado e relaxado.

4.5.1 Estudo comparativo entre os derivados JFs e LTs na inibição da topoisomerase

A finalidade deste ensaio foi analisar, de forma comparativa, a capacidade de inibição da enzima topo utilizando dois dos derivados mais promissores no estudo anterior (**JF-88** e **JF-93**, ambos contendo substituintes Cl e Br, respectivamente) e os derivados **LT-27** e **LT-36** (ALMEIDA et al., 2015), análogos aos derivados **JF-88** e **JF-93**, respectivamente; porém, apresentando o núcleo acridina ao invés do núcleo quinolina, além da *m*AMSA como padrão positivo. Foi aplicada a mesma metodologia do ensaio de inibição da enzima topoisomerase (tópico 4.5), com a concentração dos compostos em 50 μM .

4.6 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA

Neste ensaio, o intuito foi analisar a capacidade dos derivados em competir pelo sítio de ligação no DNA e HSA e deslocar os marcadores Laranja de Acridina (para o DNA) e Varfarina e Ibuprofeno (para a HSA) de seu locais de ligação. Comprovadamente, o LA é uma sonda fluorescente que se liga ao DNA por intercalação (SAWAR et al., 2017) e a Varfarina e o Ibuprofeno ligam-se à HSA nos sítios I e II de Sudlow, respectivamente (CHUGH et al., 2019; FASANO et al., 2005). Foram escolhidos os compostos **JF-85** e **JF-92** para análise com o ctDNA (DNA de timo bovino) e **JF-86** e **JF-93** para análise com HSA, baseado nos resultados obtidos em estudos anteriores, considerando o caráter mais promissor destes derivados.

A técnica de fluorescência foi aplicada com ambas macromoléculas, utilizando as concentrações de 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM dos compostos **JF** com 30 μM do DNA e 3 μM da HSA e marcadores. Os espectros de emissão para o complexo LA-DNA foram obtidos entre 500 e 600 nm, com comprimento de excitação de 480 nm e bandas de excitação e emissão de 5 e 2,5 nm, respectivamente. A faixa entre 300 e 400 nm foi aplicada no ensaio com o complexo entre as sondas e a HSA, utilizando 280 nm de comprimento de excitação e bandas

de excitação e emissão de 5 nm. As medições também foram realizadas em Cubeta de Quartzo retangular e a equação para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi a formulada por Lakowicz (2006), conforme o tópico 4.2: Todos os gráficos foram construídos com o software SigmaPlot 10.0.

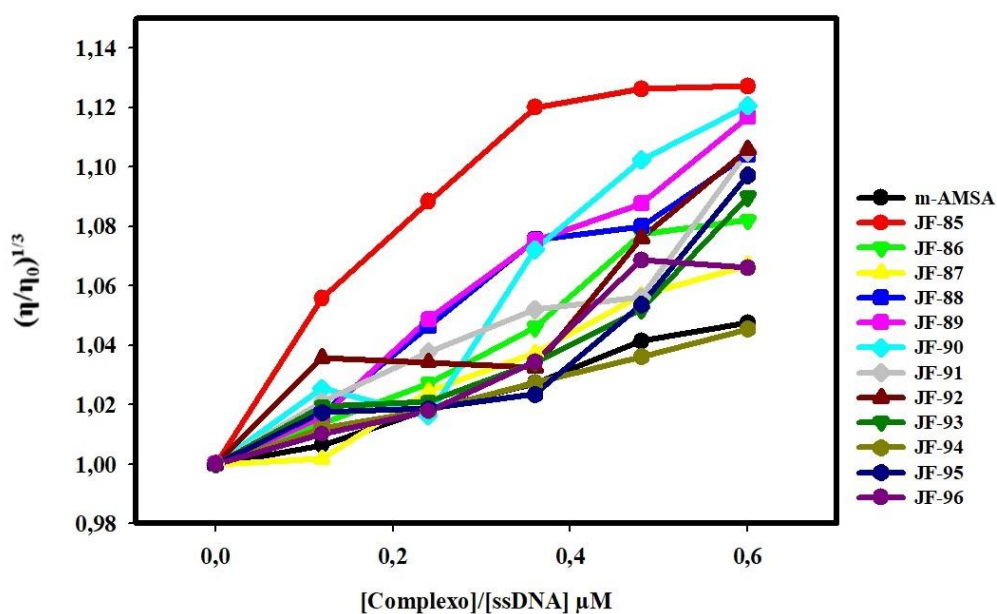
As alterações nos espectros de fluorescência com ambas as macromoléculas, na presença da LA, dos marcadores e dos compostos **JF**, como também os valores de K_{sv} , foram analisados para obtenção de informações relativas ao modo de interação com o DNA e sobre o sítio de ligação preferencial na HSA.

5 RESULTADOS

5.1 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA NA PRESENÇA DOS DERIVADOS **JF**

Os estudos de viscosidade foram realizados com os doze derivados da série **JF 85-96** com o intuito de elucidar o modo de interação dos derivados **JF** com o DNA, previamente reportado. Na figura 21 a seguir, observamos o gráfico da viscosidade relativa do ssDNA na presença dos ligantes **JF** e *m*AMSA, utilizada como padrão intercalador. Assim como a *m*AMSA, a maioria dos compostos **JF** ocasionou o aumento da viscosidade relativa do ssDNA., com destaque para o **JF-85** (*p*-Flúor).

Figura 21 – Viscosidade relativa do ssDNA na presença dos ligantes **JF** e *m*AMSA.



Fonte: próprio autor.

5.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA

No ensaio experimental de absorção UV-Vis, a HSA mostrou absorção na região de 279 nm devido aos seus resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. Após ser submetida à interação com os derivados **JF**, a absorção ocorreu entre 260 nm e 300 nm e algumas mudanças espectrais foram detectadas, conforme descrito na tabela 1. A ligação da HSA com os derivados **JF** ocasionou efeito hipercrômico, caracterizado pelo aumento da

absorção eletrônica, com percentuais entre 11 e 39,53%. O composto que promoveu maior hipercromismo foi o **JF-86** (fenetil) (39,53%). A única exceção foi dada ao derivado **JF-96** (não substituído), que ocasionou o efeito hipocrômico (redução da absorção) após ligação com a HSA, com percentual de 7,28% (Figura 22). Com relação aos desvios do pico máximo de absorção, foi constatado desvio de 1 nm (efeito hipsocrômico) para os derivados **JF-85** (*p*-Flúor) e **JF-86** (fenetil). As constantes de ligação (K_b) apresentaram valores entre 10^4 e 10^5 (Tabela 1), sendo diretamente proporcionais a relação da magnitude e a afinidade de ligação. A ordem crescente do K_b entre HSA derivados **JF** foi a seguinte: 86<87<91<94<92<93<85<96<88<95<90<89.

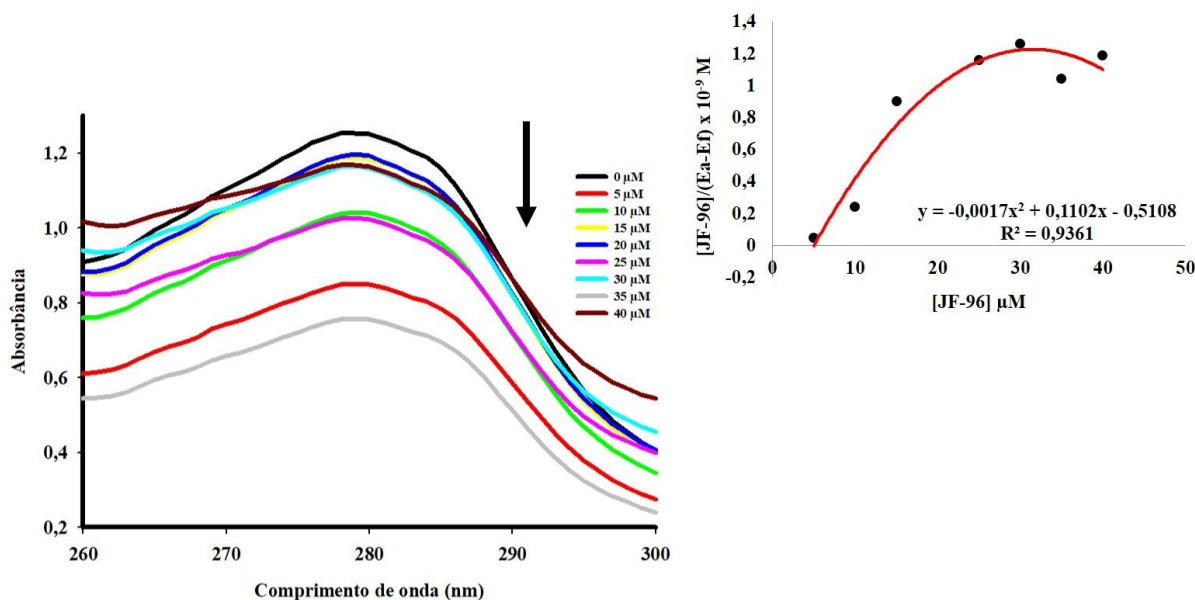
Tabela 1 – Dados espectroscópicos de absorção UV-Vis e emissão de fluorescência da HSA na ausência e presença dos derivados **JF**.

Composto	ABSORÇÃO UV-VIS						FLUORESCÊNCIA						
	$\lambda^{\max}$ livre (nm)	$\lambda^{\max}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipercr. (%) ^a	Hipocr. (%) ^b	Kb M ⁻¹	$\lambda^{\max}$ livre (nm)	$\lambda^{\max}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ^{Exc} (nm)	Bandas (nm) Exc_Emi	Hipocr. (%) ^b	Ksv M ⁻¹
JF-85	279	278	1	22,94	—	7,82 x 10 ⁴	337	330	7	283	2,5_5	40,83	4,44 x 10 ⁴
JF-86	279	278	1	39,53	—	2,98 x 10 ⁴	337	330	7	283	2,5_5	41,33	7,33 x 10 ⁴
JF-87	279	279	0	24,74	—	5,33 x 10 ⁴	337	329	8	283	2,5_5	44,82	7,49 x 10 ⁴
JF-88	279	279	0	18	—	8,74 x 10 ⁴	337	333	4	283	2,5_5	36,81	3,36 x 10 ⁴
JF-89	279	279	0	25,42	—	2,17 x 10 ⁵	337	331	6	283	2,5_5	33,14	3,70 x 10 ⁴
JF-90	279	279	0	18,11	—	1,91 x 10 ⁵	337	332	5	283	2,5_5	40	3,89 x 10 ⁴
JF-91	279	279	0	16,80	—	6,47 x 10 ⁴	337	330	7	283	2,5_5	25,49	3,79 x 10 ⁴
JF-92	279	279	0	11	—	6,95 x 10 ⁴	337	330	7	283	2,5_5	24,49	3,24 x 10 ⁴
JF-93	279	279	0	23,59	—	7,65 x 10 ⁴	337	331	6	283	2,5_5	16,29	2,09 x 10 ⁴
JF-94	279	279	0	16,36	—	6,82 x 10 ⁴	337	330	7	283	2,5_5	23,47	2,79 x 10 ⁴
JF-95	279	279	0	25,42	—	1,57 x 10 ⁵	337	327	10	283	2,5_5	54,77	1,19 x 10 ³
JF-96	279	279	0	—	7,28	8,03 x 10 ⁴	337	328	9	283	2,5_5	47,58	7,58 x 10 ⁴

^aHipercromismo resultante da formação de complexo entre a HSA e 40 μM dos derivados **JF** em comparação com a HSA livre.^bHipocrromismo resultante da formação de complexo entre a HSA e 40 μM dos derivados **JF** em comparação com a HSA livre.

Figura 22 – Espectro de absorção da HSA na presença de quantidades crescentes do **JF-96**.

[**JF-96**] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM . A seta ($\downarrow$) é correspondente ao efeito hipocrômico na HSA. Inserção: correspondente ao gráfico de [**JF-96**]/($E_a - E_f$) em função da concentração do **JF-96**, conforme determinado a partir dos dados espectrais.

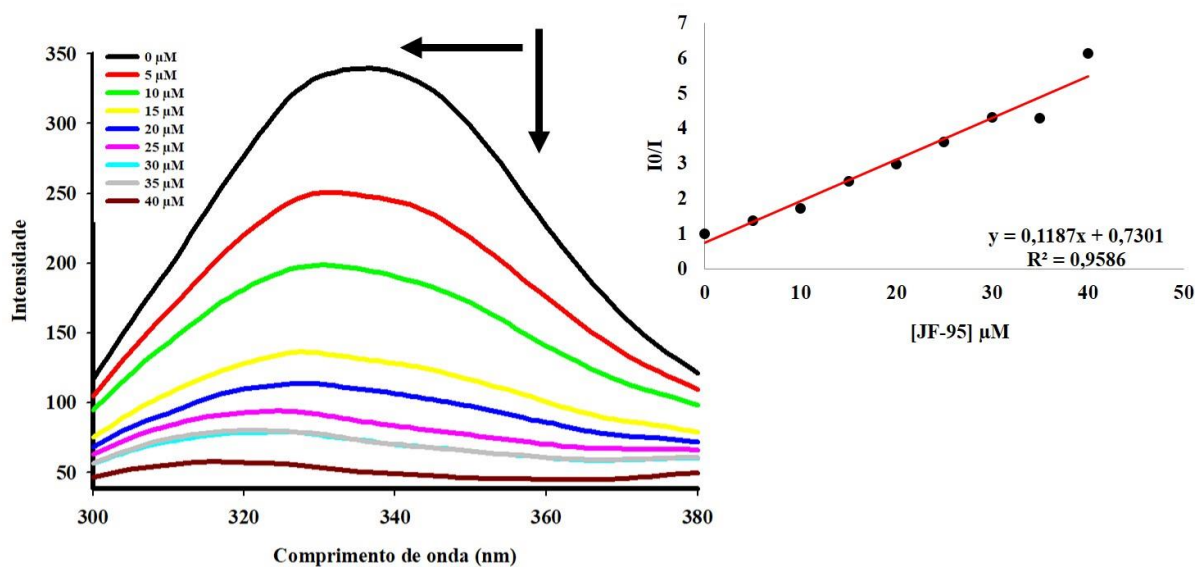


Fonte: próprio autor.

Nos estudos de fluorescência, a HSA apresentou emissão na região entre 300 e 380 nm, com pico máximo em 337 nm. Todos os derivados promoveram a diminuição da emissão da HSA, com variados desvios do pico máximo para a região do azul (efeito hipsocrômico) (Tabela 1). Os percentuais de hipocromismo foram entre 16,29 e 54,77%, com o maior percentual para o **JF-95** (Figura 23), apresentando também maior desvio do pico máximo de emissão ($\Delta\lambda=10$ nm). Todos os valores da constante de supressão fluorescente (K_{sv}) da HSA pelos derivados **JF** foram na magnitude de 10^4 , na seguinte ordem crescente: $95 < 93 < 94 < 92 < 88 < 89 < 91 < 90 < 85 < 86 < 87 < 96$. Uma exceção é vista para o derivado **JF-95**, com o menor valor de K_{sv} ($1,19 \times 10^3$).

Figura 23 – Espectro de emissão da HSA na presença de quantidades crescentes do **JF-95**.

[**JF-95**] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μM . As setas ($\downarrow$) e ($\leftarrow$) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e hipsocrômico na HSA, respectivamente. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência da HSA livre (I_0)/intensidade fluorescente da HSA ligada ao derivado JF-95 (I).



5.4 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA EM MACRÓFAGOS E CÉLULAS TUMORAIS

Para avaliar se determinadas substâncias químicas são tóxicas ao sistema humano estudos de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 foram realizados neste trabalho com os derivados **JF**. Os dados de CC_{50} , como demais valores, podem ser visualizados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Valores de CC₅₀ e IC₅₀ dos derivados **JF**, *m*AMSA e Asulacrina em macrófagos e linhagens tumorais.

Composto	RAW 264.7	MCF-7	IS	T-47D	IS
JF-85	45,87	1,10 ± 0,2	41,7	1,07 ± 0,1	42,87
JF-86	32,97	1,09 ± 0,2	30,25	1,12 ± 0,2	29,44
JF-87	91,61	0,97 ± 0,1	94,44	1,10 ± 0,0	83,28
JF-88	63,47	1,07 ± 0,0	59,32	1,27 ± 0,2	49,98
JF-89	22,55	0,88 ± 0,3	25,62	1,21 ± 0,2	18,64
JF-90	82,49	0,81 ± 0,3	101,84	1,33 ± 0,4	62,02
JF-91	50,52	0,98 ± 0,2	51,55	1,32 ± 0,3	38,27
JF-92	35,72	0,82 ± 0,4	43,56	1,28 ± 0,3	27,91
JF-93	53,54	0,99 ± 0,1	54,08	1,48 ± 0,0	36,18
JF-94	101,4	0,99 ± 0,1	102,42	1,36 ± 0,2	74,56
JF-95	105,23	0,97 ± 0,3	108,48	1,23 ± 0,0	85,55
JF-96	118,00	1,07 ± 0,2	110,28	1,38 ± 0,1	85,51
<i>m</i>AMSA	95,5	0,91 ± 0,2	104,94	0,94 ± 0,2	101,60
Asulacrina	31,17	-	-	-	-

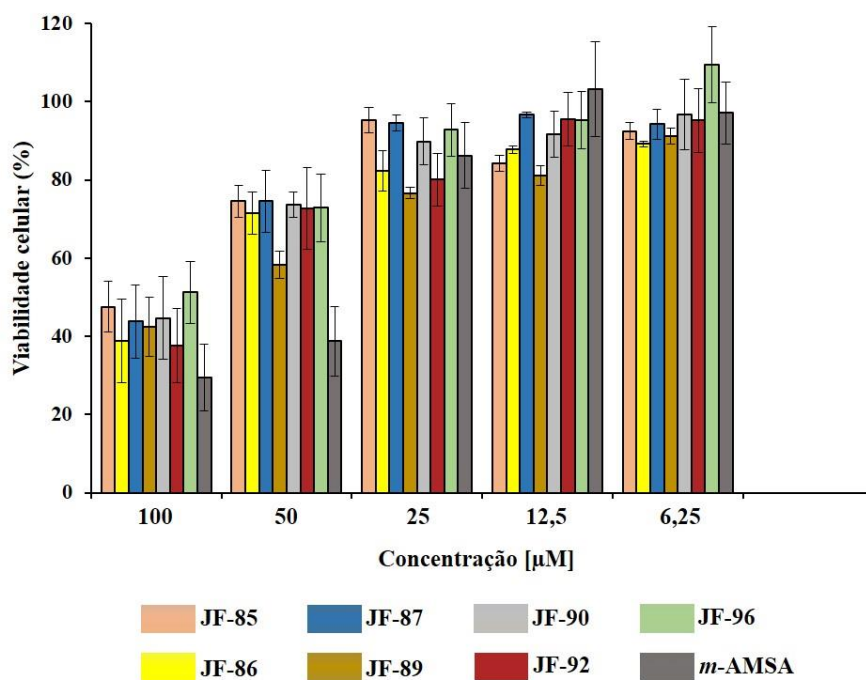
CC₅₀ = Macrófagos RAW 264.7; IC₅₀ = células tumorais MCF-7 e T-47D.

Fonte: próprio autor.

Nos estudos citotóxicos com linhagens tumorais mamárias (MCF-7 e T-47D) foram obtidos os valores de IC₅₀ e verificada seletividade dos derivados **JF** para as duas linhagens tumorais utilizadas, conforme Índice de Seletividade (IS) (Tabela 2). A linhagem MCF-7 foi a mais sensível, com valores de IC₅₀ entre 0,81 e 1,10 µM. Já para a linhagem T-47D os valores encontrados de IC₅₀ apresentaram-se entre 1,07 e 1,48 µM.

Para seguir com a análise antiproliferativa, a linhagem MDA-MB-231 também foi utilizada, com os compostos mais promissores nas duas linhagens anteriores. O alcance de redução da viabilidade celular para ≤50% na presença dos compostos **JF** selecionados só ocorreu na maior concentração utilizada (100 µM), enquanto a *m*AMSA ocasionou na viabilidade ≤50% a partir de 50 µM (Figura 24). Os percentuais de viabilidade em 100 µM foram 47,54%, 38,87%, 43,77%, 42,44%, 44,62%, 37,58%, 51,23% e 29,49% para os compostos **JF-85, 86, 87, 89, 90, 92, 96** e *m*AMSA, respectivamente.

Figura 24 – Viabilidade celular dos derivados **JF** e *m*AMSA frente à linhagem MDA-MB-231.

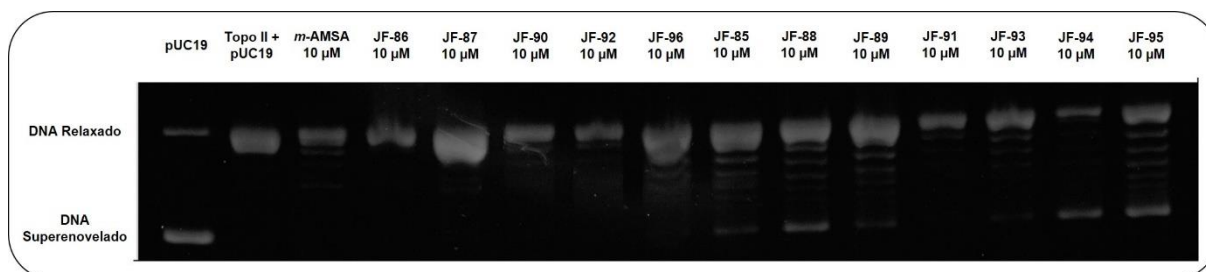


Fonte: próprio autor.

5.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA

Na figura 25 é possível observar a inibição da Topoisomerase II α pelos derivados **JF** e *m*AMSA devido à presença da banda do DNA superenovelado. Dentre os derivados, alguns inibiram a atividade da enzima topo II α em 10 μ M: **JF-85**, **JF-88**, **JF-89**, **JF-93**, **JF-94**, **JF-95** e **JF-96**.

Figura 25 – Efeito dos derivados **JF** e da *m*AMSA na inibição da Topoisomerase II α Humana.

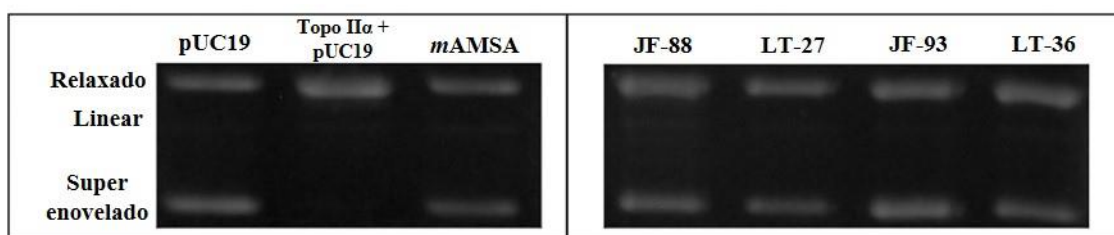


Fonte: próprio autor.

A figura 26 a seguir apresenta o resultado do ensaio comparativo dos derivados **JF-88** (*p*-Cloro) e **JF-93** (*p*-Bromo), escolhidos a partir do ensaio anterior, com os compostos **LT-27**

(*p*-Cloro) e **LT-36** (*p*-Bromo) frente à enzima topo. É constatada a presença das bandas do DNA relaxado, superenovelado e linear, os quais migram em taxas diferentes no gel. A migração mais rápida do DNA superenovelado é justificada pela sua natureza mais compacta em relação ao DNA relaxado e linear (Figura 25). Observa-se, a partir desta figura, a inibição da topo por parte de todos os compostos, inclusive o padrão *m*AMSA, devido à formação da banda do DNA superenovelado.

Figura 26 – Efeito dos derivados **JF** e da *m*AMSA na inibição da Topoisomerase II α Humana em comparação com os derivados **LT**.



Fonte: próprio autor.

5.6 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA

O pico máximo de emissão do complexo DNA-LA foi em 526 nm e, na presença dos derivados, houve apenas um desvio ($\Delta\lambda$) de 1 nm com o **JF-85** (*p*-Flúor). Na presença dos compostos **JF-85** e **JF-92** (*p*-etil), a curva de emissão foi decrescendo à medida em que se aumentou a concentração de ambos os compostos (Figuras 27 e 28). Podemos constatar essa redução fluorescente, de forma quantitativa, por meio do percentual de hipocromismo (59,22% para **JF-85** e 100% para o **JF-92**) e a constante K_{sv} , de acordo com a tabela 3.

Figura 27 – Espectro de emissão do ctDNA-LA na presença de quantidades crescentes do **JF-85**.

[**JF-85**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM . As setas ($\downarrow$) e ($\leftarrow$) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e hipsocrômico no ctDNA-LA, respectivamente. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência do ctDNA-LA (I_0)/intensidade fluorescente do ctDNA-LA ligada ao derivado **JF-85** (I). Linha pontilhada: complexo ctDNA-LA; linha tracejada: LA.

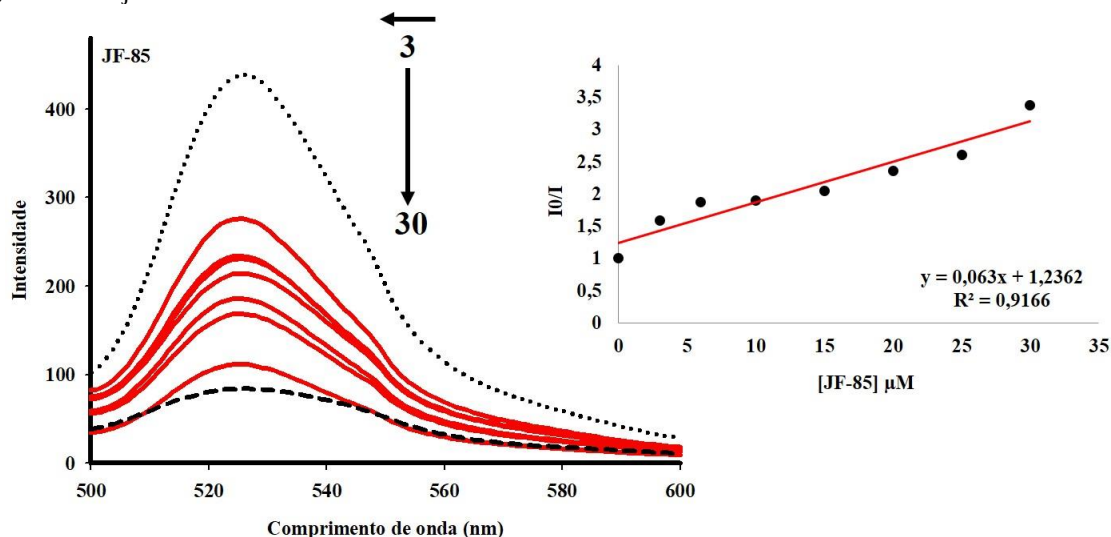


Figura 28 – Espectro de emissão do ctDNA-LA na presença de quantidades crescentes do **JF-92**

[**JF-92**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM . A seta ($\downarrow$) é correspondente ao efeito hipocrômico no ctDNA-LA. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência do ctDNA-LA (I_0)/intensidade fluorescente do ctDNA-LA ligada ao derivado **JF-92** (I). Linha pontilhada: complexo ctDNA-LA; linha tracejada: LA.

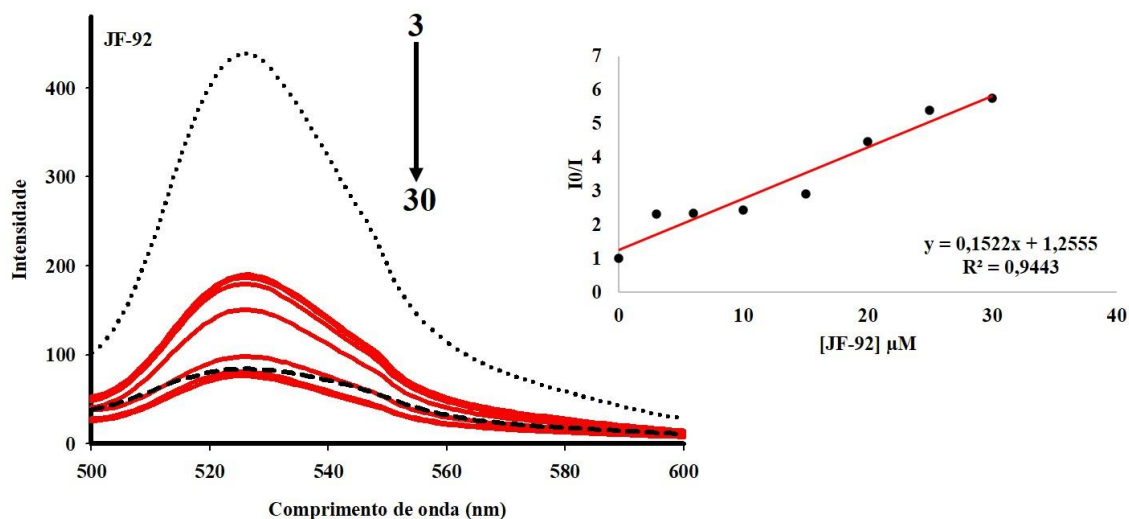


Tabela 3 – Dados espectroscópicos de emissão fluorescente do DNA com o marcador Laranja de Acridina (LA), na ausência e presença dos derivados **JF-85** e **92**.

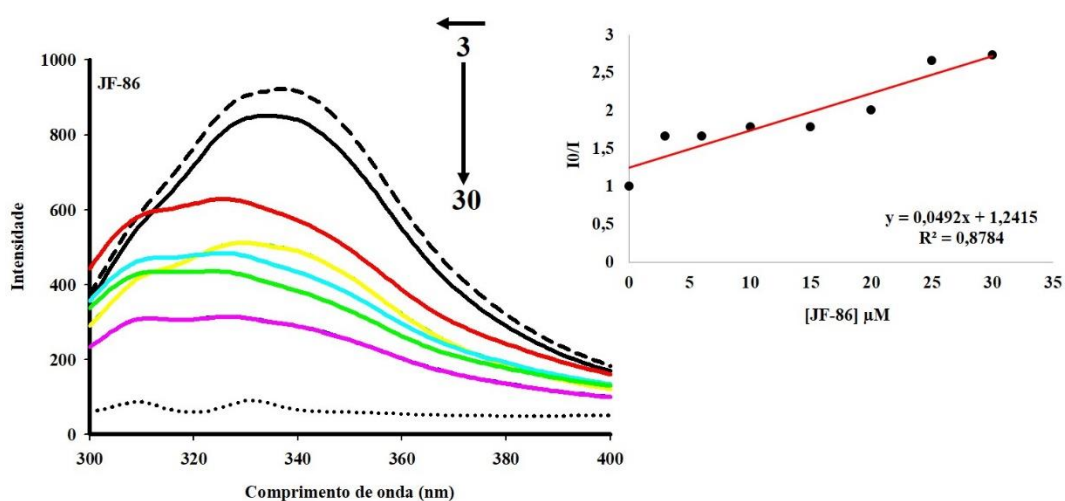
Composto	DNA-LA				
	$\lambda^{\max}$ livre (nm)	$\lambda^{\max}$ ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocr. (%) ^a	K _{sv} M ⁻¹
JF-85	526	525	1	59,22	6,30 x 10 ⁴
JF-92	526	526	0	100	15,22 x 10 ⁴

^aHipocromismo resultante da formação de complexo entre o DNA- LA e 3 μ M dos derivados **JF** em comparação com o DNA-LA sem ligantes.

Observando os resultados obtidos com a HSA na espectroscopia de fluorescência (descritos no tópico 5.2), foi verificado o mesmo comportamento de redução fluorescente da HSA + Ibuprofeno e da HSA + Varfarina à medida em que ocorreu o aumento da concentração dos derivados **JF-86** (fenetil) e **JF-93** (*p*-Br) (Figuras 29 e 30). Com o Ibuprofeno, o comprimento de onda do pico máximo da HSA é em 335 nm, sendo este sofrido um desvio ($\Delta\lambda$) de 5 nm na presença dos compostos **JF**. Os valores de hipocromismo e K_{sv} para ambos os derivados denunciam a perturbação estrutural da HSA e consequente competição com o sítio de ligação do Ibuprofeno (Tabela 4).

Figura 29 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Ibuprofeno (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do **JF-86**.

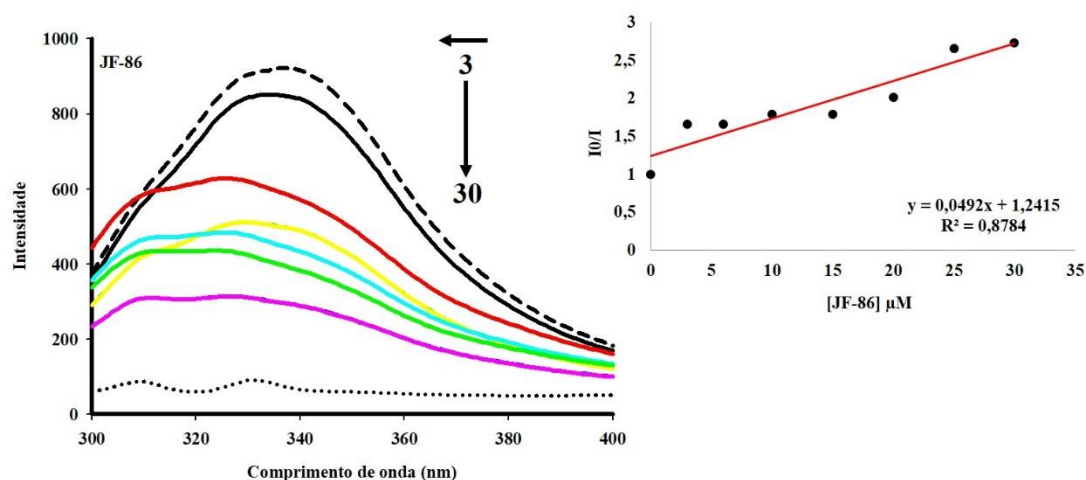
[**JF-86**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M. As setas ($\downarrow$) e ($\leftarrow$) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e hipsocrômico na HSA + Ibuprofeno, respectivamente. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência da HSA + Ibuprofeno (I₀)/intensidade fluorescente da HSA + Ibuprofeno ligada ao derivado **JF-86** (I).



Fonte: próprio autor.

Figura 30 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Ibuprofeno (linha preta sólida) na presença de quantidades crescentes do **JF-93**.

[**JF-93**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM . As setas ($\downarrow$) e ($\leftarrow$) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e hipsocrômico na HSA + Ibuprofeno, respectivamente. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência da HSA + Ibuprofeno (I₀)/intensidade fluorescente da HSA + Ibuprofeno ligada ao derivado **JF-93** (I).



Fonte: próprio autor.

Tabela 4 – Dados espectroscópicos de emissão fluorescente da HSA com os marcadores Ibuprofeno e Varfarina na ausência e presença dos derivados **JF-86** e **93**.

Composto	HSA + IBUPROFENO					HSA + VARFARINA				
	λ_{max} livre (nm)	λ_{max} ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocr. (%) ^a	K _{sv} M ⁻¹	λ_{max} livre (nm)	λ_{max} ligado (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hipocr. (%) ^b	K _{sv} M ⁻¹
JF-86	335	330	5	37,04	$4,92 \times 10^4$	351	366	15	23,39	3×10^4
JF-93	335	330	5	47,20	$3,12 \times 10^4$	351	351	0	11,90	$7,13 \times 10^4$

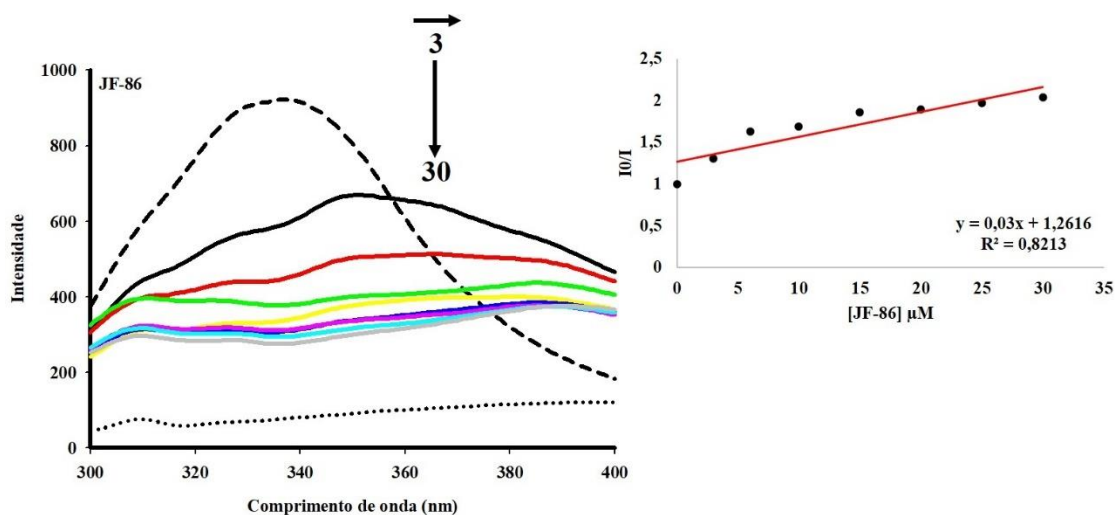
^aHipocromismo resultante da formação de complexo entre o HSA + Ibuprofeno e 3 μM dos derivados **JF** em comparação com o HSA + Ibuprofeno sem ligantes.

^bHipocromismo resultante da formação de complexo entre o HSA + Varfarina e 3 μM dos derivados **JF** em comparação com o HSA + Varfarina sem ligantes.

Com a HSA + Varfarina, ambos os derivados ocasionaram também na diminuição da curva de fluorescência, com efeito hipocrômico de 23,39% e 11,90% para o **JF-86** e **JF-93**, respectivamente (Figuras 31 e 32). Houve variação do pico máximo de emissão da HSA pelo composto **JF-86**, com desvio ($\Delta\lambda$) de 15 nm e os valores de K_{sv} de ambos os compostos foram de 3×10^4 e $7,13 \times 10^4$ para o **JF-86** e **JF-93**, respectivamente (Tabela 3).

Figura 31 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Varfarina (linhas coloridas) na presença de quantidades crescentes do **JF-86**.

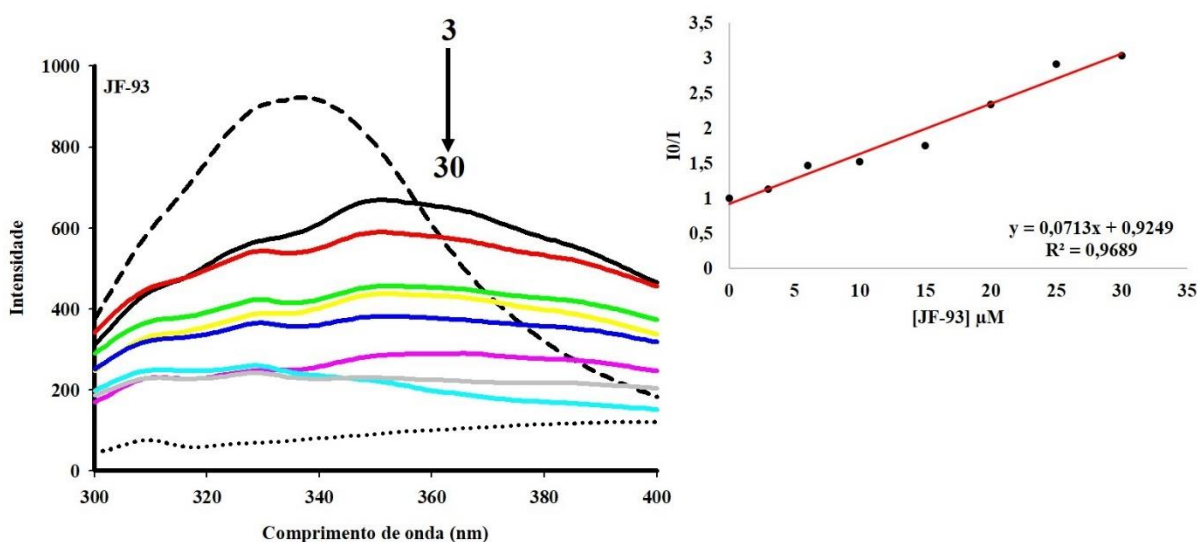
[**JF-86**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM . As setas ($\downarrow$) e ($\rightarrow$) são correspondentes aos efeitos hipocrômico e batocrômico na HSA + Varfarina, respectivamente. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência da HSA + Varfarina (I_0)/intensidade fluorescente da HSA + Varfarina ligada ao derivado **JF-86** (I).



Fonte: próprio autor.

Figura 32 – Espectro de emissão da HSA livre (linha preta tracejada) e HSA + Varfarina (linhas coloridas) na presença de quantidades crescentes do **JF-93**.

[**JF-93**] = 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25 e 30 μM . A seta ($\downarrow$) é correspondente ao efeito hipocrômico na HSA + Varfarina. Inserção: correspondente à intensidade de fluorescência da HSA + Varfarina (I_0)/intensidade fluorescente da HSA + Varfarina ligada ao derivado **JF-93** (I).



Fonte: próprio autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 VISCOSIDADE RELATIVA DO DNA

Neste trabalho, doze derivados quinolina tiossemicarbazonas (**JF**) foram estudados em relação ao modo de ligação ao DNA por meio da viscosidade que permite observar mudanças da viscosidade relativa (η) do DNA (aumento, estagnação ou diminuição) após a formação do complexo ligante-DNA (SHANKARAIAH, et al., 2016; ALI et al., 2018; KUMARAVEL et al., 2019). Quando há o aumento da viscosidade do DNA, na presença dos ligantes, podemos afirmar que houve uma maior extensão de sua fita dupla por conta do desarranjo estrutural após uma ligação entre os pares de bases (modo intercalativo). Caso ocorra uma pequena alteração ou, até mesmo, nenhuma mudança da viscosidade significa que os ligantes interagiram através de ligações nos sulcos do DNA ou por atrações eletrostáticas (MIRZAEI-KALAR, 2018; GANESHPANDIAN et al., 2014; PARVEEN et al., 2016).

Neste estudo, a *m*AMSA foi utilizada como padrão intercalador já que é comprovada sua ligação ao DNA através da intercalação entre os pares de base, além de exercer ação antitumoral inibindo a enzima topoisomerase (JANGIR et al., 2012; KETRON et al., 2012). De acordo com a figura 21, fica evidenciada uma ação intercalativa tanto da *m*AMSA quanto dos derivados **JF** no ssDNA devido ao aumento da viscosidade relativa da biomolécula após contato com os compostos (HUSAIN et al., 2017; SANI et al., 2018).

Os resultados supracitados esclarecem a contribuição do núcleo quinolina na ação intercalativa pois, apesar de apresentar um anel aromático a menos, quando comparado ao núcleo acridina na *m*AMSA, o modo de ligação não foi alterado. Pelo contrário, verifica-se maior capacidade de intercalação dos derivados **JF**, justificado provavelmente pelo menor impedimento estérico da porção lateral (maior espaçador) em comparação ao padrão acridínico *m*AMSA. Em contrapartida, para o composto **JF-94** (*p*-OCH₃), a viscosidade foi bastante semelhante à *m*AMSA, certamente devido à presença da porção metoxi no grupo lateral em ambas as moléculas (RIBEIRO et al., 2019). O **JF-85** foi o composto que apresentou maior viscosidade, ou seja, maior efeito intercalativo, o que pode ser justificado pelo seu maior efeito eletrônico, favorecendo uma característica mais intercalativa à molécula de DNA.

6.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA

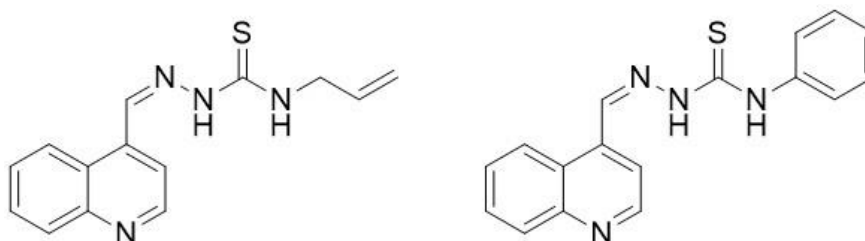
Em estudos espectroscópicos de absorção e fluorescência, os resíduos de aminoácidos da HSA (Tryptofano, Tirosina e Fenilalanina) são os responsáveis por absorver a luz e emití-la, facilitando o estudo de sua interação com diversos ligantes. A albumina absorve luz em torno de 280 nm e apresenta emissão na região entre 300 a 380 nm quando excitada a 280 nm (POURESHGHI et al., 2017; YASREBI et al., 2019; MAHAKI et al., 2019). No entanto, podem ocorrer perturbações em sua estrutura após a ligação de substâncias, podendo alterar o pico máximo de absorção e emissão, aumentando ou diminuindo sua intensidade (MISHRA et al., 2014).

Conforme tabela 1, o efeito hipercrômico observado é relativo a uma perturbação na estrutura secundária da HSA e, conseqüentemente, maior exposição dos resíduos de triptofano após a interação dos derivados **JF**. O desvio para a região do azul, que ocorreu com o **JF-85** e **86**, pode ser devido ao maior efeito eletrônico do Flúor no **JF-85** e à maior liberdade conformacional do anel fenil presente no **JF-86**.

De acordo com as constantes de ligação (K_b) obtidas, constata-se que a lipofilicidade e hidrofílicidade não são determinantes neste processo de interação, já que os compostos com maiores valores de K_b , **JF-89** (Naftil) ($2,17 \times 10^5$) e **JF-90** ($p\text{-NO}_2$) ($1,91 \times 10^5$), com diferentes propriedades eletrônicas e lipofílicas (RIBEIRO et al., 2019), possuem afinidades de ligação semelhantes. Mesmo o **JF-86** (fenetil) apresentando o maior percentual de hipercromismo com relação aos demais compostos, o valor de K_b foi o menor. Isto se deu, provavelmente, devido à maior liberdade do anel fenil, que pode conferir variações conformacionais em sua estrutura, ocasionando no desarranjo da estrutura secundária da HSA e maior exposição dos resíduos de triptofano, fenômeno que influencia na diminuição da capacidade de interação. Esta variação não ocorreu com o **JF-92** ($p\text{-etil}$ – isômero do **JF-86**) já que o anel fenil está diretamente ligado à porção tioamida da molécula.

Nos estudos de fluorescência, a diminuição da emissão da HSA ocorre pela menor exposição dos resíduos de aminoácidos, principalmente o triptofano. O menor valor de K_{sv} , ocasionado pelo **JF-95** (Figura 33), pode ser devido à ausência do anel aromático na região de substituição na tiossemicarbazona. Este fenômeno é corroborado pelo resultado obtido com o **JF-96** (Figura 33), onde é possível constatar que a presença do anel aromático não substituído influenciou no maior valor de K_{sv} ($7,58 \times 10^4$), fato que também evidencia a importância da ausência de substituição na posição *para* neste estudo.

Figura 33 – Estrutura química dos derivados **JF-95** e **JF-96**



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Esses resultados corroboram com os estudos com a BSA (RIBEIRO et al., 2019), os quais demonstraram que todos os derivados **JF** apresentaram interações com a albumina bovina a partir dos efeitos hipercrômicos e hipocrômicos nas técnicas de absorção e fluorescência, complementando-se com os valores de K_b e K_{sv} também obtidos nestes ensaios.

Reafirma-se, ainda, o que outros estudos *in vitro* já apresentaram em relação à capacidade de ligação da albumina às moléculas que contêm porções quinolina e tiossemicarbazonas em suas estruturas, demonstrando o caráter promissor destes derivados nos estudos com a HSA (CHAVES et al., 2020; VENNILA; ELANGO, 2019; YU et al., 2013)

6.3 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA

Em relação aos resultados antiproliferativos, foi possível determinar o potencial citotóxico e de antiproliferação dos derivados **JF** tanto em macrófagos quanto em células transformadas de mama. Comparando os derivados à Asulacrina (Figura 20), todos apresentaram valores de CC_{50} maiores para os macrófagos, com exceção do **JF-89**, provavelmente devido à presença da porção Naftil que favorece uma ligação ao DNA de forma intercalativa, aumentando, consequentemente, seu efeito tóxico (SILVA FILHO et al., 2019).

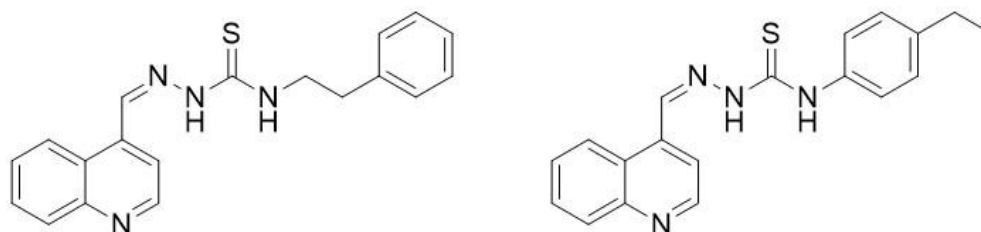
Para a MCF-7, os compostos que causaram maior efeito antiproliferativo foram o **JF-89** (naftil), **JF-90** (*p*-NO₂) e **JF-92** (*p*-etil) com IC_{50} de 0,88, 0,81 e 0,82 μ M, respectivamente, sendo estes valores menores em comparação ao padrão *m*AMSA (0,91 μ M). Estes achados demonstram que a substituição do anel benzílico não é necessariamente favorável à citotoxicidade contra esta linhagem tumoral, já que encontramos poucas variações nos perfis de inibição da proliferação celular mediante às substituições encontradas nos derivados **JF**. Os resultados de IC_{50} obtidos corroboram com os encontrados nos estudos de interação com ctDNA (RIBEIRO et al., 2019), os quais apontaram que o composto **JF-92** (*p*-etil) foi o que apresentou

maior afinidade de ligação ao DNA, demonstrando o segundo menor valor de IC₅₀ para MCF-7. Sugere-se, então, um possível mecanismo de ação por meio da interação por intercalção ao DNA nesta linhagem tumoral.

Nos estudos com a linhagem T-47D, os compostos que exibiram menores valores de IC₅₀ foram **JF-85** (*p*-Fluor), **JF-86** (feniletil) e **JF-87** (piridil) (1,07, 1,12 e 1,10 μ M, respectivamente) (Tabela 2), o que demonstra a contribuição de átomos menos volumosos (**JF-85**) ou sem substituição (**JF-86** e **87**) para a ação antitumoral. Outro ponto relevante a ser observado nesta linhagem (T-47D) é a deficiência da proteína tumoral p53, característica que pode diminuir sua sensibilidade à indução de morte celular já que a p53 possui envolvimento direto no processo de reparo e sobrevivência do DNA e, quando ativada, desencadeia a morte celular programada. Neste sentido, os compostos podem atuar restaurando a atividade da p53 nesta linhagem, facilitando o processo de morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2017; JAHANAFROOZ; MOTAMEH; BAKHSHANDEH, 2016).

Na análise da viabilidade da MDA-MB-231 frente aos derivados **JF**, o maior percentual de inibição proveniente do composto **JF-96** (51,23%) indica que a substituição do anel fenil favorece a atividade antiproliferativa nessa linhagem. Com exceção da *m*AMSA, os menores valores de viabilidade da MDA-MB-231 foram para o **JF-86** (38,87%) e **JF-92** (37,58%) , justificada pela grande semelhança a nível estrutural que possuem. A diferença entre eles é a existência de ligação direta da porção tioamida no anel aromático (presente no **JF-92**) e o inverso acontecendo com o **JF-86** (Figura 35). Foi constatado que a estrutura do **JF-86** não favoreceu a atividade de ligação ao DNA mas, a sua atividade antiproliferativa contra a linhagem MDA-MB-231 foi promissora, sugerindo um mecanismo de ação que não envolve, especificamente, a ligação ao DNA.

Figura 34 – Estrutura química dos derivados **JF-86** e **JF-92**.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

6.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA

A enzima topoisomerase (topo) é considerada importante no processo de proliferação celular, atuando na replicação do DNA e na sua transcrição. Quando se trata de fármacos antitumorais, sua atuação na inibição da Topo II se destaca pois desencadeia a clivagem irreversível da dupla hélice e consequente apoptose nas células tumorais. Este sistema pode ocorrer quando substâncias químicas competem pelo sítio de ligação da topoisomerase no DNA, impedindo-a de exercer sua função. Portanto, em ensaios de eletroforese, a banda do DNA superenovelado é visualizada quando a topo é inibida (GOUVEIA et al., 2018; JANOVEC et al., 2011; HU et al., 2018; ALMEIDA et al., 2017).

Conforme a figura 25, a inibição da topo por alguns derivados foi maior em relação ao padrão *m*AMSA, constatando a simplificação do anel acridina ao anel quinolina não atrapalhou o processo de inibição desta enzima para estes derivados. Outro fator que contribuiu na maior inibição foi a presença de substituintes halogênio nestes compostos (**JF-85**: *p*-Flúor, **JF-88**: *p*-Cloro e **JF-93**: *p*-Bromo) que conferem caráter eletrônico e lipofílico positivos ($+\sigma$ $+\pi$) (conforme Diagrama de Craig). Estes resultados corroboram com os obtidos por Gouveia e colaboradores (2018), em que os derivados espiro-acridínicos **AMTAC-06** e **AMTAC-07**, com cadeias laterais contendo átomos de Cloro e Flúor, respectivamente, na posição *para* do anel fenil, demonstraram maior inibição da topo II α da série produzida.

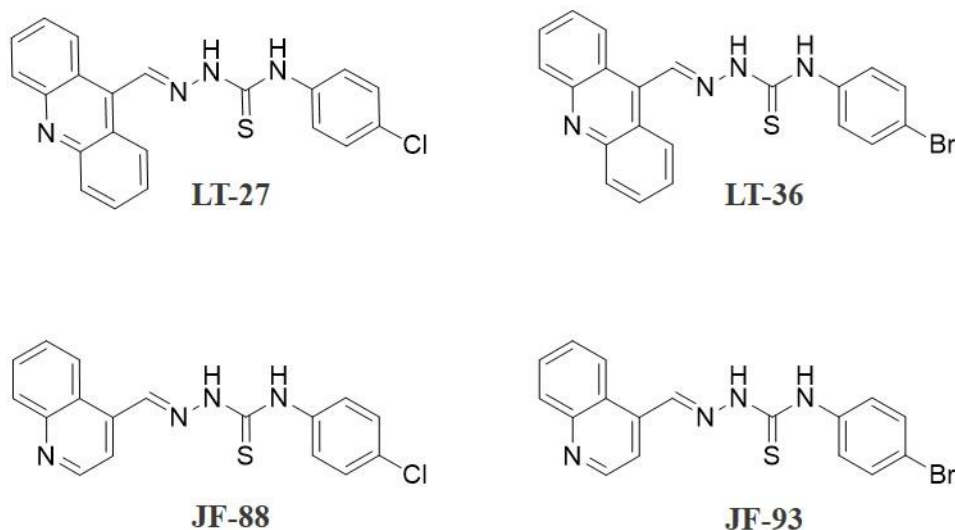
A presença de substituintes hidrofóbicos ($+\pi$) nos compostos **JF-89**, **JF-95** e **JF-96**, também favoreceu a atividade inibitória. Porém, não é necessariamente a única característica que contribui na atividade antitopo pois o grupo metóxi, presente no derivado **JF-94**, exerce efeito eletrônico positivo e também auxilia no processo de inibição. Esta contribuição foi observada nos trabalhos de Almeida e colaboradores (2016) onde o **AMTAC-02**, substituído na posição *para*, apresentou maior ação antiproliferativa para as linhagens de glioma, melanoma, adenocarcinoma mamário, rim, pulmão, próstata, cólon e queratinócitos humanos, associada à inibição da topoisomerase.

O que mais pode ser constatado é que as substituições na posição *para* do anel benzílico melhora a atividade antitopo, já que os derivados **JF-86** e **JF-87** não se mostraram promissores neste estudo. Apesar do grupo Nitro no **JF-90** exercer caráter eletrônico positivo, o potencial inibitório desta molécula foi reduzido, supostamente devido à menor hidrofobicidade quando comparada aos demais compostos. No caso dos compostos **JF-91** e **JF-92**, que apresentaram pouca ou nenhuma inibição da atividade topo, a maior ação antitumoral pode ser justificada por outros mecanismos que ainda precisam ser estudados em futuras investigações.

Para ampliar a investigação sobre o tamanho do anel acridina ou quinolina sobre o potencial inibidor da topo, foi realizado o teste com derivados acridina-tiossemicarbazona sintetizados por Almeida et al. (2015) e que possuíam a mesma porção lateral que os análogos **JF** selecionados para este estudo comparativo. A partir dos resultados (Figura 26), foi possível observar que os compostos **JF** (Figura 35) apresentaram capacidade de inibição semelhante aos seus análogos **LT** (Figura 35), evidenciando mais uma vez que a simplificação molecular do anel acridina ao anel quinolina não interfere no processo de inibição da topo.

De acordo com os achados, o composto **JF-88** (*p*-Cloro) apresentou a formação de variadas bandas ao longo do gel, indicando uma inibição parcial em comparação com o **JF-93** (*p*-Bromo), que contém um átomo mais volumoso e mais lipofílico em sua estrutura e que pode ter contribuído para a inibição desta enzima na concentração utilizada. Vale ressaltar que a presença de três anéis aromáticos, os quais formam o anel acridina, confere uma característica mais tóxica não só à célula tumoral, mas também à célula não transformada, quando comparado com o anel quinolina. Neste sentido, os derivados **JF** tornam-se mais promissores do ponto de vista da ação antitumoral já que, possivelmente, resultarão em menores complicações fisiológicas.

Figura 35 – Estrutura química dos derivados **LT-27** e **36** e **JF-88** e **93**.



Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

A presença da banda do DNA linear indica a formação de complexo de clivagem na presença da topoisomerase, fenômeno que ocorre naturalmente durante a reação com esta enzima (NITISS et al., 2012). Após a adição dos compostos testes, ficou evidente a

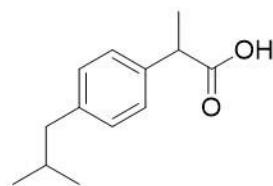
estabilização deste complexo de clivagem, podendo ser justificada pela inibição da topo por meio do mecanismo do tipo “veneno”, o qual evita a religação das fitas do DNA. Esse mecanismo é relatado para diversos medicamentos anticâncer, inclusive para a *mAMSA*, Doxorubicina e Etoposídeo (OLIVEIRA et al., 2017; PALLUOTTO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2015; NITISS et al., 2012).

6.5 ENSAIO DE DESLOCAMENTO COMPETITIVO COM ctDNA E HSA

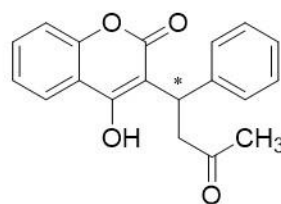
No ensaio de fluorescência com o ctDNA, foi observada a ausência de emissão fluorescente tanto do ctDNA como da LA isolados, corroborando com os dados presentes na literatura (HUSAIN et al., 2017). Entretanto, a curva de fluorescência da solução de ctDNA-LA foi visualizada, o que demonstra a ligação da LA ao ctDNA por intercalação (SAWAR et al., 2017). O decréscimo deste pico máximo, após a presença dos derivados **JF** comprova a capacidade de competição pelo sítio de ligação da LA, ou seja, entre os pares de bases do ctDNA (QAIS; AHMAD, 2018). Esse resultado corrobora com os obtidos no estudo de viscosidade relativa (subtópico 6.1), onde todos os compostos **JF** aumentaram a viscosidade do DNA, indicando o mecanismo de ligação intercalativo. O derivado **JF-92** teve destaque neste estudo, assim como em estudos anteriores com o DNA, com o valor de K_{sv} de $15,22 \times 10^4$, evidenciando o caráter mais promissor deste composto para ligação ao DNA.

Com a HSA, apesar da competição de ambos os derivados **JF-86** e **JF-93** (Figura 36) pelo sítio II de Sudlow (local de ligação do Ibuprofeno – Figura 36) ser constatada por meio dos dados espectroscópicos obtidos, existiu uma preferência do **JF-86** em se ligar ao sítio do Ibuprofeno devido ao seu maior valor de K_{sv} ($4,92 \times 10^4$) em comparação com os dados de K_{sv} do **JF-93** ($3,12 \times 10^4$) (Tabela 3). Essa preferência pode ser justificada pelos menores perfis eletrônicos do **JF-86** e Ibuprofeno quando comparados com os demais derivados e pela presença de cadeias alquilas em ambos os compostos, conferindo maior liberdade rotacional e, desta forma, semelhança no modo de ligação entre essas duas moléculas.

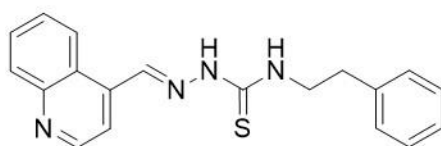
Figura 36 – Estrutura química do Ibuprofeno, Varfarina e dos derivados **JF-86** e **93**.



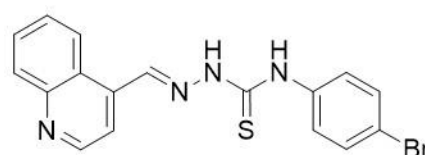
Ibuprofeno



Varfarina



JF-86



JF-93

Fonte: próprio autor – Plataforma ChemDraw Ultra 12.0.

Em contrapartida, o derivado que apresentou maior preferência pelo sítio I de Sudlow, local de ligação da Varfarina foi o **JF-93**, com valor de K_{sv} de $7,13 \times 10^4$ em relação à 3×10^4 do **JF-86**. A estrutura da Varfarina (Figura 36) apresenta substituintes volumosos e o **JF-93** apresenta em sua estrutura o átomo de Bromo, que possui maior volume quando comparado aos demais substituintes dos derivados **JF**, além de características mais eletrônicas e lipofílicas. Essa semelhança pode ter contribuído para a preferência de interação do **JF-93** ao Sudlow I, competindo com Varfarina.

O desvio ($\Delta\lambda$) de 15 nm da fluorescência da HSA, ocasionado pelo **JF-86** na presença Varfarina, pode ser procedente de seu menor perfil eletrônico e maior grau de liberdade estrutural em relação ao **JF-93**, ao ponto de não ser capaz de competir fortemente com a Varfarina pelo seu sítio de ligação, promovendo uma maior perturbação da estrutura da HSA. Este resultado corrobora com os obtidos neste trabalho com a HSA isoladamente.

7 CONCLUSÃO

Para todos os compostos **JF** foi confirmado o modo de ligação ao DNA por intercalação por meio da técnica de viscosidade e do ensaio de deslocamento competitivo realizado com os compostos **JF-85** e **JF-92**, corroborando com os resultados obtidos em estudos anteriores com o DNA. Além disso, todos os derivados demonstraram se ligar à HSA, apresentando diferentes afinidades de interação de acordo com as propriedades físico químicas de cada substituição, não existindo um padrão molecular nesse processo de interação. Evidencia-se também a preferência de ligação aos sítios I e II de Sudlow da HSA pelos compostos **JF-93** e **JF-86**, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos com a BSA, reafirmando essa possibilidade de ligação, a qual pode favorecer a biodisponibilidade destes compostos no meio biológico.

Nos estudos antiproliferativos, os derivados apresentaram efeitos promissores, com destaque para alguns dos compostos, sendo os resultados mais interessantes para as linhagens dos subtipos luminal A e B (MCF-7 e T-47D, respectivamente). O **JF-92** apresentou menor valor de IC_{50} para a linhagem MCF-7 (0,82 μ M), menor viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231 (37,58%) e inibição parcial da Topo II α , podendo considerá-lo como um inibidor interfacial. O **JF-86** teve destaque nos ensaios com T-47D (IC_{50} : 1,12 μ M) e MDA-MB-231 (viabilidade: 38,87%), sendo necessários outros estudos para propor o mecanismo de atuação nestas linhagens celulares, já que sua ação não se dá, prioritariamente, ligando-se ao DNA e nem por meio da inibição da enzima topoisomerase.

Nos ensaios antitopo, percebe-se a influência positiva de características eletrônicas e lipofílicas dos derivados **JF** no processo de inibição desta enzima. Além do mais, a simplificação molecular do anel acridina ao anel quinolina não prejudicou a inibição da enzima topo II α , o efeito antiproliferativo e a capacidade de ligação ao DNA, BSA e HSA pelos derivados **JF**, demonstrando que esta estratégia foi considerada eficiente na proposição de novas moléculas com características antineoplásicas mais promissoras, além da possibilidade de redução de efeitos indesejáveis no tratamento do câncer, especialmente o câncer de mama.

7.1 PERSPECTIVAS

- Realizar o ensaio de deslocamento competitivo com a HSA utilizando os demais derivados **JF** para verificar os locais de ligações preferenciais destes compostos na albumina;
- Aplicar estudo *in silico* com o intuito de explorar outros possíveis alvos biológicos do câncer com estes derivados;
- Estudar o efeito sinérgico *in vitro* dos compostos **JF-86** e **JF-92** com a Doxorrubicina nas células tumorais MCF-7 e T-47D;
- Analisar em qual etapa do ciclo celular os derivados atuam e investigar o tipo de morte celular por citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

- ABAD, E.; GRAIFER, D.; LYAKHOVICH, A. DNA damage response and resistance of cancer stem cells. **Cancer Letters**, v. 474, p. 106–117, 2020.
- ABDELMOEZ, A. et al. Screening and identification of molecular targets for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 387, p. 3–9, 2017.
- ABDULLAH, W. M.; ZEEBAREE, S. R. M. New Data hiding method based on DNA and Vigenere Autokey. **Academic Journal of Nawroz University**, v. 6, n. 3, p. 83–88, 2017.
- AKHTAR, J. et al. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 143–189, 2017.
- AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 49, p. 44–48, 2020.
- ALI, M. S. et al. Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: a multi spectroscopic and molecular modelling study. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, p. 9083–9093, 2018.
- ALI, A. Q. et al. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: *In vitro* anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 125, p. 440–448, 2014.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 4506–4521, 2014.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538–1556, 2017.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 13023–13042, 2015.
- ALNAJJAR, A. S.; SWEASY, J. B. A new perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. **DNA Repair**, v. 76, p. 60–69, 2019.
- ALQAHTANI, A. D. et al. Strategies for the production of long-acting therapeutics and efficient drug delivery for cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, 108750, 2019.
- AMIN, L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, v. 7, p. 27–34, 2013.

- ARAÚJO NETO, L. N. et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 172–181, 2017.
- BAGHERI, M.; FATEMI, M. H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. **Journal of Luminescence**, v. 202, p. 345–353, 2018.
- BARBOSA-LIMA, G. et al. 2,8-bis(trifluoromethyl)quinoline analogs show improved anti-Zika vírus activity, compared to mefloquine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 334–340, 2017.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1172–1180, 2002.
- BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>, 2020.
- BIST, G. et al. Dihydroxylated 2,6-diphenyl-4-chlorophenylpyridines: Topoisomerase I and II α dual inhibitors with DNA non-intercalative catalytic activity, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 69-84, 2017.
- BOSE, A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. **Journal of Luminescence**, v. 169, p. 220–226, 2016.
- BOZGEYIK, E. et al. Novel thiosemicarbazone derivative 17B interferes with the cell cycle progression and induce apoptosis through modulating downstream signaling pathways. **Gene Reports**, v. 18, 100578, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100578>, 2020.
- CAMPOS, L. T. Fibroblastos e Câncer. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 118–124, 2010.
- CHAVES, O. A. et al. Elucidation of the interaction between human serum albumin (HSA) and 3,4-methylenedioxyde-6-iodo-benzaldehyde-thiosemicarbazone, a potential drug for Leishmania amazonensis: Multiple spectroscopic and dynamics simulation approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 310, 113117, 2020.
- CHUGH, H. et al. Interaction of noscapine with human serum albumin (HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 372, p. 168–176, 2019.
- CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.
- COHEN, G.; EISESBERG, H. Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes. **Biopolymers**, v. 8, p. 45–55, 1969.
- DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F. P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de Prognóstico. **Revista HUPE**, v. 14, p. 59–65, 2015.

- DUIJF, P. H. G. et al. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 7, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.04.004>, 2019.
- ESWARAN, R. et al. Synthesis, crystal structure, DNA and protein binding studies of novel binuclear Pd(II) complex of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde-4(N,N)-dimethylthiosemicarbazone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 1–8, 2016.
- FASANO, S. et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 57, p. 787-796, 2005.
- FIGUEIREDO, C. R. L. V. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 3, DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190029>, 2019.
- FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.
- GANESHPANDIAN, M. et al. Mixed ligand copper(II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 202–212, 2014.
- GIRI, G. C. et al. New cyclic tetranuclear copper (II) complexes containing quadrilateral cores: Synthesis, structure, spectroscopy and their interactions with DNA in aqueous solution. **Journal of Molecular Structure**, v. 1142, p. 175–184, 2017.
- GHODSI, R. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-(Imidazolylmethyl)-2-(4-methylsulfonyl phenyl)-Quinoline Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors and *in vitro* Anti-breast Cancer Agents. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 169–177, 2016.
- GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5911–5921, 2018.
- GUHATHAKURTA, B. et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of human serum albumin with copper(II) complexes. **Spectrochimica Acta A Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 740–748, 2017.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Biological hallmarks of cancer. **Holland-Frei Cancer Medicine**, 9. ed., DOI: 10.1002/9781119000822.hfcm002, 2017.
- HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.022, 2012.

HE, Z. et al. Novel thiosemicarbazone derivatives containing indole fragment as potent and selective anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 184, 111764, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111764>, 2019.

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

HENG, B. et al. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 6506–6520, 2016.

HOOGENBOEZEM, E. N.; DUVALL, C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 130, p. 73–189, 2018.

HSU, C-C; TSENG, L-M.; LEE, H-C. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. **Experimental biology and medicine (Maywood)**, v. 241, n. 12, p. 1281–1295, 2016.

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

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

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

INCA. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 3. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2008.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2020. Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **O que causa o câncer?** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cause-cancer>. Acesso em: 15 mar. 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento>. Acesso em: 15 mar. 2020.

JAHANAFROOZ, Z.; MOTAMEH, N.; BAKHSHANDEH, B. Comparative Evaluation of Silibinin Effects on Cell Cycling and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 and T47D Cell Lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 2661–2665, 2016.

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

- JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 114, p. 38–43, 2012.
- JANOVEC, L. et al. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidinone)imino) acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1790–1801, 2011.
- JIANG, S. et al. Binuclear Schiff base copper(II) complexes: Syntheses, crystal structures, HSA interaction and anticancer properties. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, 119186, 2020.
- KATARIYA, K. D.; SHAH, S. R.; REDDY D. Anticancer, antimicrobial activities of quinoline based hydrazone analogues: Synthesis, characterization and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, 103406, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103406>, 2020.
- KATAYAMA, K.; NOGUCHI, K.; SUGIMOTO, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. **New Journal of Science**, p. 1–11, 2014.
- KARAMI, K. et al. Synthesis and characterization of two new trans palladium (II) complexes containing benzylamine ligand: DNA/BSA interactions, molecular docking and *in vitro* cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.02.027>, 2017.
- KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug DNA Interactions, **Biochemistry**, v. 51, p. 1730–1739, 2012.
- KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 4, 2015.
- KONDOV, B. et al. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 961–967, 2018.
- KUMARAVEL, G. et al. Exploring the DNA interactions, FGF growth receptor interaction and biological screening of metal(II) complexes of NNN donor ligand derived from 2 (aminomethyl)benzimidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1303–1317, 2019.
- KUO, H-H. et al. Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, 2016.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3. ed. **Springer**: New York, NY, USA, 2006.
- LABIB, M. B. et al. Azole-hydrazone derivatives: Design, synthesis, *in vitro* biological evaluation, dual EGFR/HER2 inhibitory activity, cell cycle analysis and molecular docking study as anticancer agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 67–80, 2018.

- LAKSHMI T., P. et al. Molecular interaction of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) with human serum albumin (HSA): The spectroscopic, calorimetric and computational investigation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 183, p. 90–102, 2017.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 15035–15050, 2013.
- LEI, H.; WANG, X.; WU, C. Early-stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations, **Journal Molecular Graphics Modell**, v. 38, p. 279–289, 2012.
- LI, M. J. et al. Synthesis, characterization, DNA binding, cleavage activity and cytotoxicity of copper(II) complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 2789–2798, 2014.
- MAHAKI, H. et al. Cytotoxicity and antioxidant activity of Kamolonol acetate from *Ferula pseudalliacea*, and studying its interactions with calf thymus DNA (ct-DNA) and human serum albumin (HSA) by spectroscopic and molecular docking techniques. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 203–213, 2019.
- MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. **DNA Repair**, v. 54, p. 22–29, 2017.
- MALAYERI, S. O. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 7-(aryl)-2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-g]quinoline derivatives as potential Hsp90 inhibitors and anticancer agents. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.050>, 2017.
- MARKOVIC, V. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with tautomerizable methylene group, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 228–238, 2013.
- MARELLA, A. et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2013.
- MCGHEE, J. D.; VON HIPPEL, P. H. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, p. 469–489, 1974.
- MIRZAEI-KALAR, Z. *In vitro* binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 31111–31117, 2018.
- MISHRA, M. et al. Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N'-(phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 452–464, 2014.
- MONDAL, M. et al. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. **Journal of Luminescence**, v. 192, p. 990–998, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, A. L. et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4708–4712, 2017.

MOTEGI, A. et al. Aberrations in DNA repair pathways in cancer and therapeutic significances. **Seminars in Cancer Biology**, v. 58, p. 29–46, 2019.

MOUJAESS, E. et al. The Therapeutic use of human albumin in cancer patients' management. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, p. 203-209, 2017.

MU, H. et al. Stereoselective interactions of lactic acid enantiomers with HSA: Spectroscopy and docking application. **Food Chemistry**, v. 270, p.429–435, 2019.

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

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

NITISS, J. L. et al. Topoisomerase Assays. **Current Protocols in Pharmacology**. CHAPTER 3 Unit 3.3. DOI: 10.1002/0471141755.ph0303s57, 2012.

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

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

OTHMAN, D. I. A. et al. Design, Synthesis and Anticancer Evaluation of New Substituted Thiophene Quinoline Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, 115026, DOI: 10.1016/j.bmc.2019.07.042, 2019.

PALLUOTTO, F. et al. Quinolino[3,4-b]quinoxalines and pyridazino[4,3-c]quinoline derivatives: Synthesis, inhibition of topoisomerase IIa, G-quadruplex binding and cytotoxic properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 704–717, 2016.

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

PDB. RCSB Protein Data Bank. **1AO6 – Crystal Structure of Human Serum Albumin**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1AO6>. Acesso em: 24 nov. 2020.

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

PLOWRIGHT, A. T. et al. Joining Forces: The Chemical Biology-Medicinal Chemistry Continuum. **Cell Chemical Biology**, v. 24, p. 1058–1065, 2017.

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

POÓR, M. et al. Molecular displacement of warfarin from human serum albumin by flavonoid aglycones. **Journal of Luminescence**, v. 142, p. 122–127, 2013.

POURESHGHI, F. et al. Interaction of an antiepileptic drug, lamotrigine with human sérum albumin (HSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 166, p. 187–192, 2017.

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

RÀFOLS, C. et al. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Fluorescence Spectrometry (FS) and Frontal Analysis Capillary Electrophoresis (FA/CE). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 150, p. 452–459, 2018.

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

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

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

ROESE, F. M.; FONTANA, E. M.; PEREIRA, K. C. B. Análise da adesão à terapia antineoplásica oral de pacientes atendidos na farmácia de quimioterapia de um hospital público de Mato Grosso do Sul. **Revista ENIAC Pesquisa**, v. 7, n. 1, 2018.

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

- SANI, F. D. et al. Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: Spectroscopic and molecular modeling investigations, **Journal of Luminescence**, v. 203, p. 599–608, 2018.
- SAWAR, T. et al. 2017. Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA: A multi-spectroscopic, thermodynamics and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 319-328, 2017.
- SEDIGHIPOOR, M. et al. Synthesis and electronic structure of novel Schiff bases Ni/Cu (II) complexes: Evaluation of DNA/serum protein binding by spectroscopic studies. **Polyhedron**, v. 129, p. 1–8, 2017.
- SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 575–580 2014.
- SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta A**, v. 97, p. 406–410, 2012.
- SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M.; SHOHRE, S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1836–1841, 2012.
- SHANKARAI AH, N. et al. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo-b-carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p. 42–50, 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 5–29, 2015.
- SILVA, P. R. et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of *in vitro* leishmanicidal activity and ultrastructural studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, 108899, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108899>, 2020.
- SILVA FILHO, F. A. et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 582–589, 2019.
- STOCKMANS, G. et al. Triple-negative breast cancer. **Current Opinion in Obstetrics Gynecology**, v. 20, p. 614–620, 2015.
- SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, n. 6, p. 439-46, 1999.
- SUI, H. et al. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. **The Journal of International Medical Research**, v. 40, p. 426–435, 2012.
- TAVERNA, M. et al. Specific antioxidant properties of human serum albumin. **Annals of Intensive Care**, v. 3, p. 4, 2013.

VENNILA, K N.; ELANGO, K. P. Understanding the binding of quinoline amines with human serum albumin by spectroscopic and induced fit docking methods. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, p. 2753–2765, 2019.

VARANKO, A.; SAHA, S.; CHILKOTI, A. Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, DOI: 10.1016/j.addr.2020.08.008, 2020.

VIDEIRA, M.; REIS, R. L.; BRITO, M. A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1846, p. 312–325, 2014.

VIDHYAPRIYA, P. et al. Molecular interaction of manganese-based carbon monoxide releasing molecule (MnCORM) with human serum albumin (HSA). **Bioorganic Chemistry**, v. 92, 103078, 2019.

VUTEY, V. et al. Human topoisomerase IB is a target of a thiosemicarbazone copper(II) complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 606, p. 34–40, 2016.

WANG, W.-Q. et al. Infiltrating immune cells and gene mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. **British Journal of Surgery Society**, v. 103, n. 9, p. 1189–1199, 2016.

WEST CANCER CENTER. **Breast Cancer**. Disponível em: <https://westcancercenter.org/cancer-type/breast-cancer/>. Acesso em: 15 mar. 2020.

YADAV, D. K. et al. New arylated benzo[h]quinolines induce anticancer activity by oxidative stress-mediated DNA damage. **Scientific Reports**, 6:38128, 2016, DOI: 10.1038/srep38128. Acesso em: 24 mar. 2020.

YASREBI, S. A. et al. Synthesis and HSA-Interaction of a New Mixed Ligand Cu-Isothiosemicarbazonato Complex with Adenine Nucleobase. **Polyhedron**, v. 179, 114357, 2020.

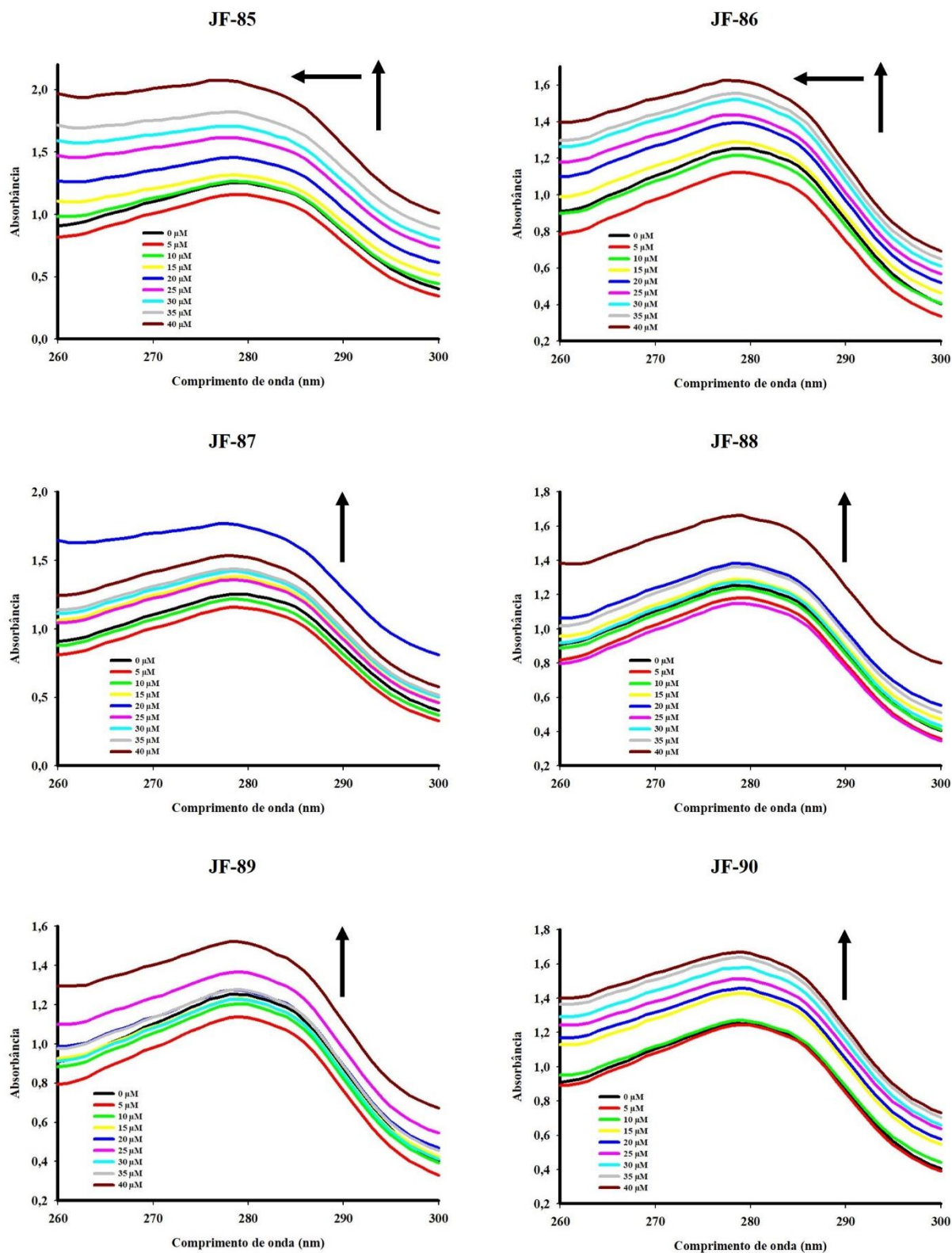
YEGGONI, D. et al. Binding and Molecular Dynamics Studies of 7-Hydroxycoumarin Derivatives with Human Serum Albumin and Its Pharmacological Importance. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p. 1117–1131, 2014.

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

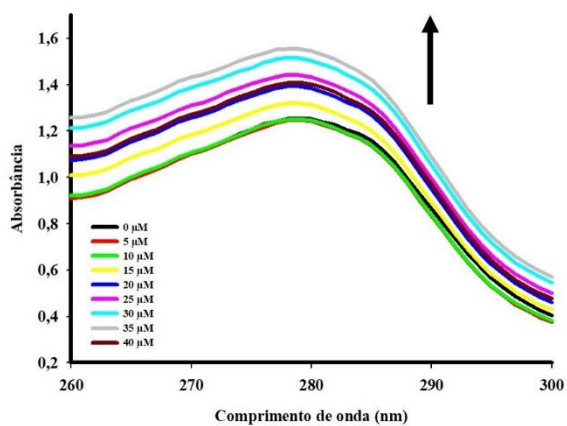
ZHU, J. et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 124, p. 78–83, 2014.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS E EMISSÃO DA HSA COM OS DERIVADOS JF

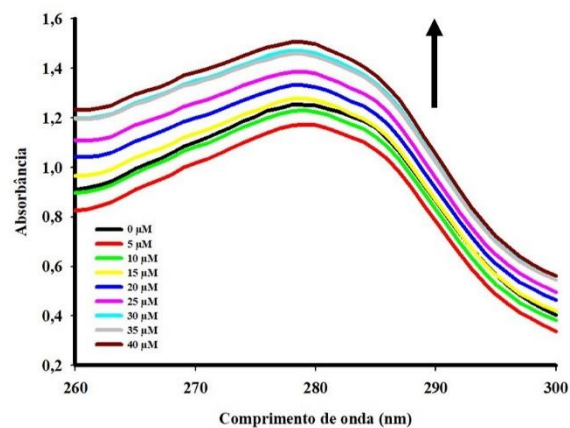
ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-Vis – HSA + DERIVADOS JF



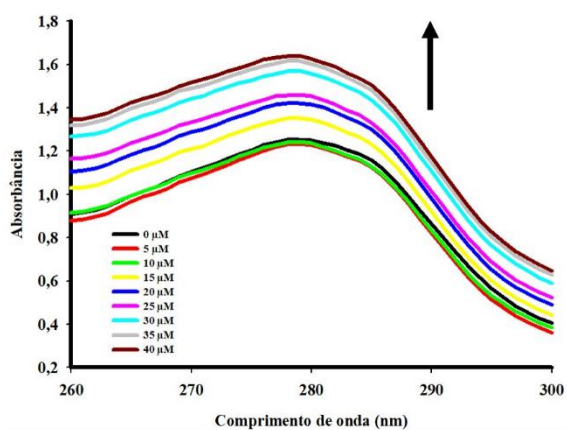
JF-91



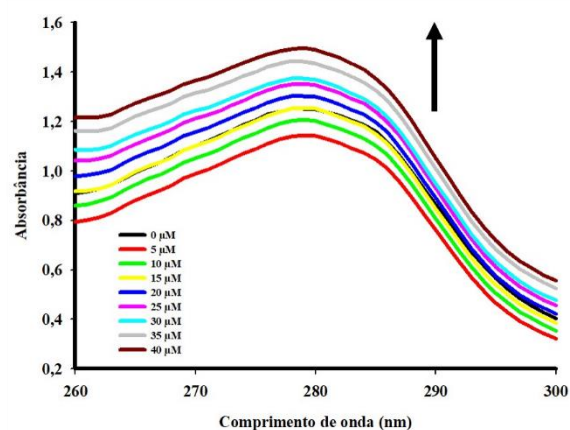
JF-92



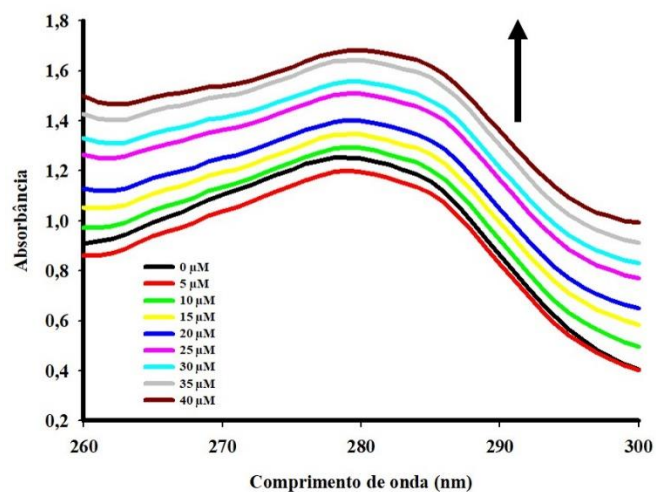
JF-93



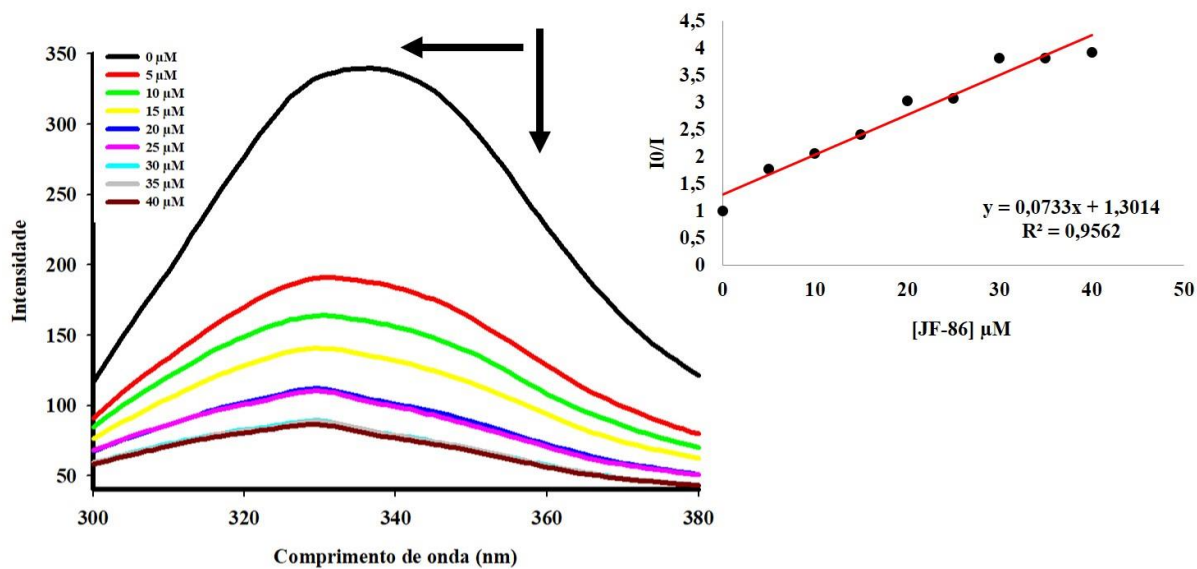
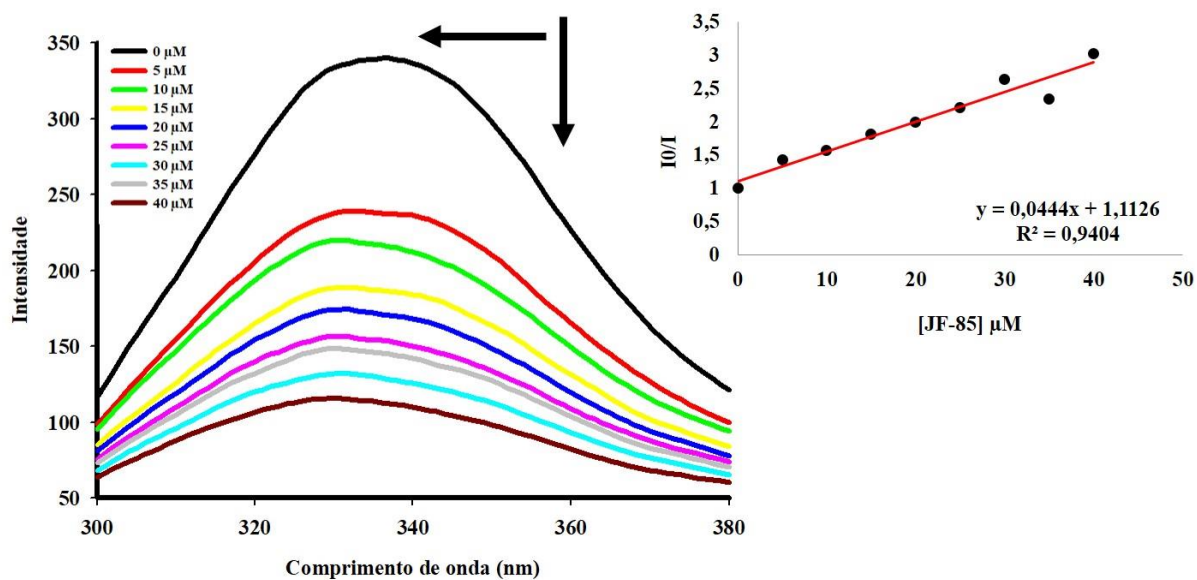
JF-94

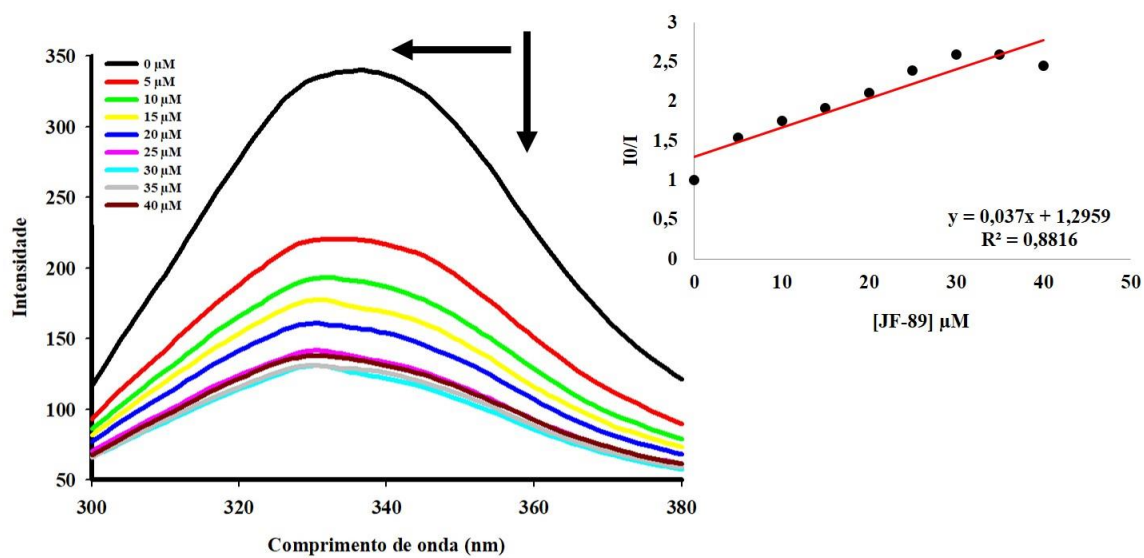
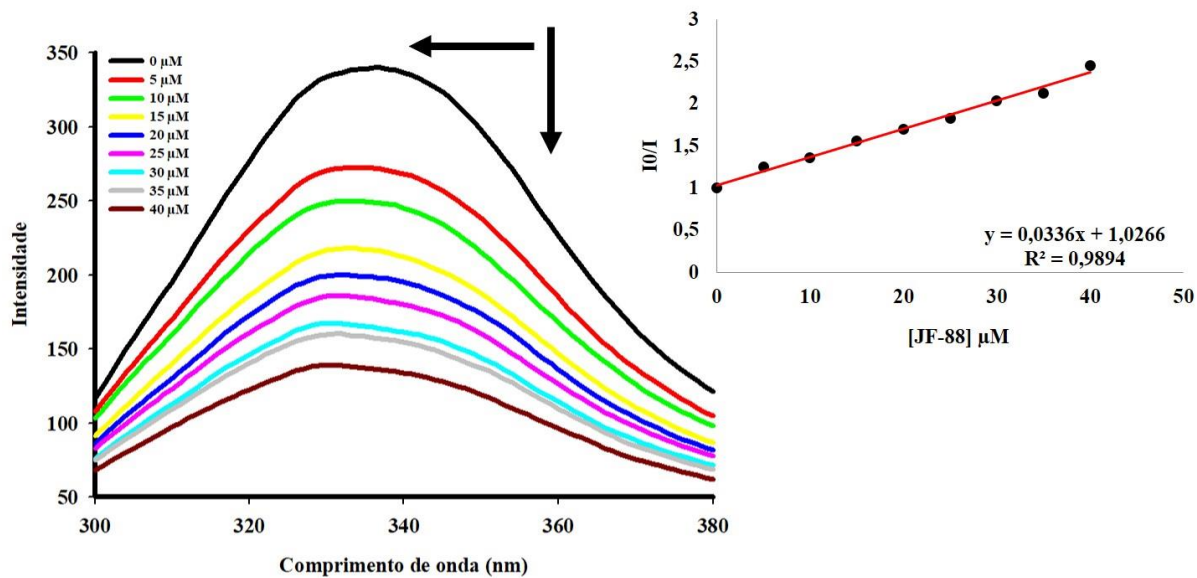
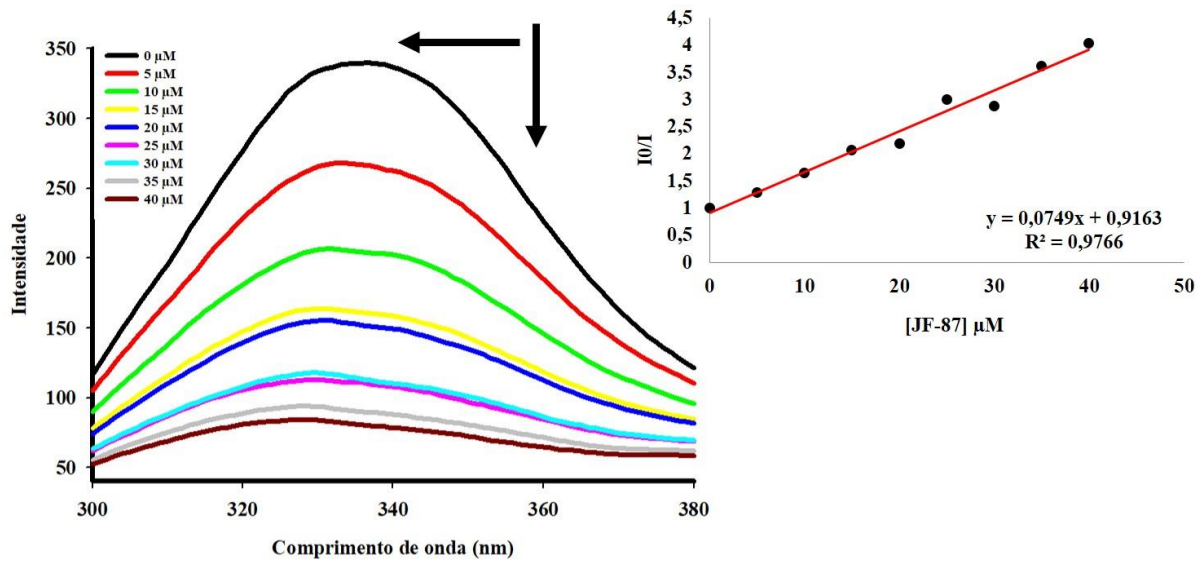


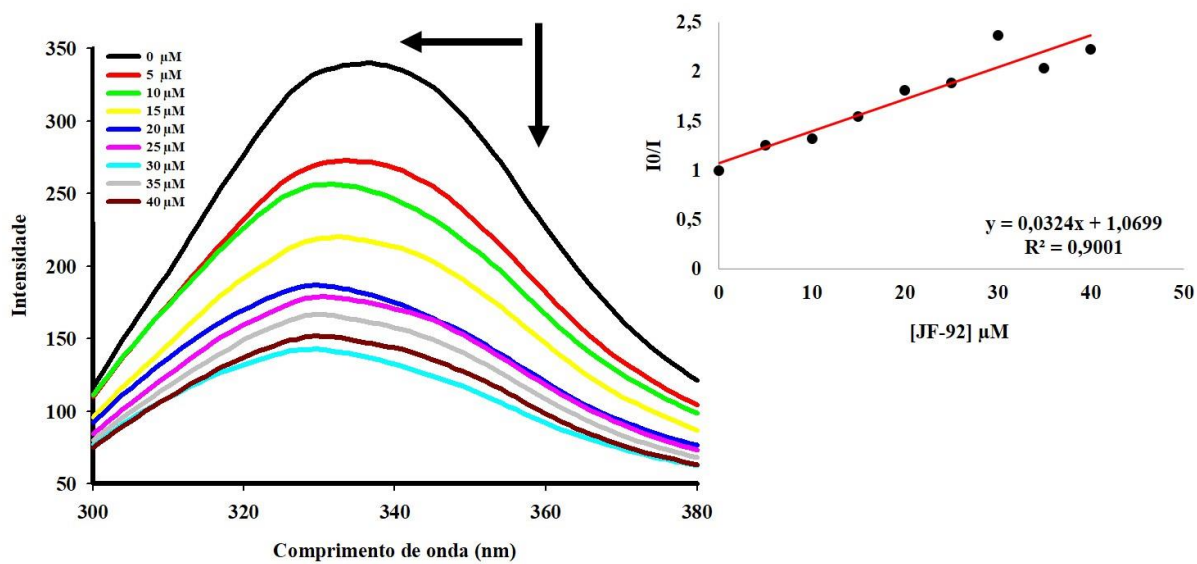
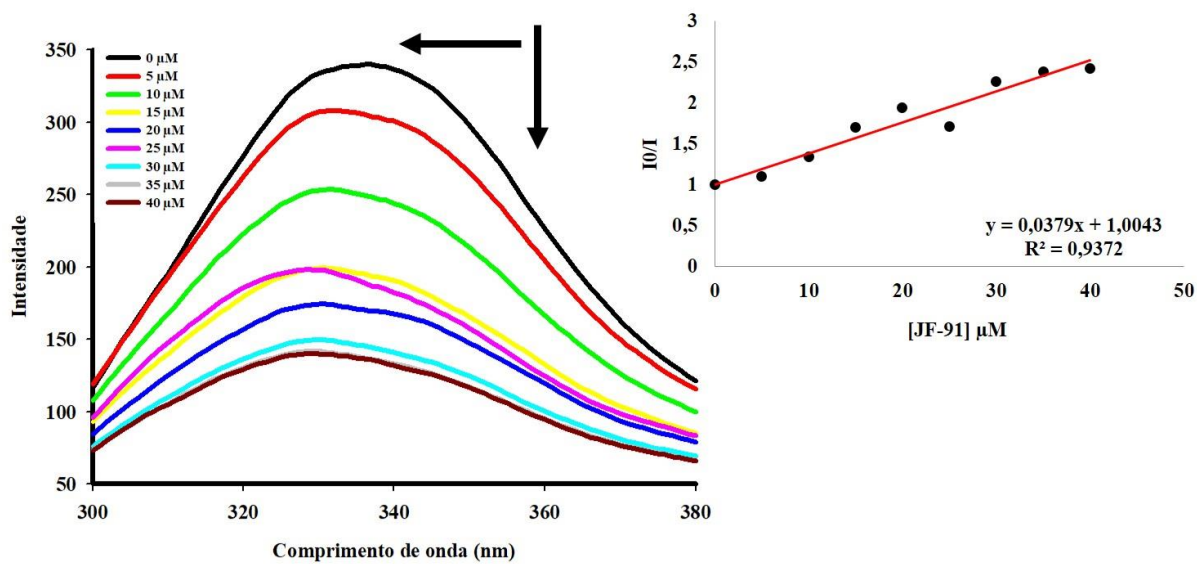
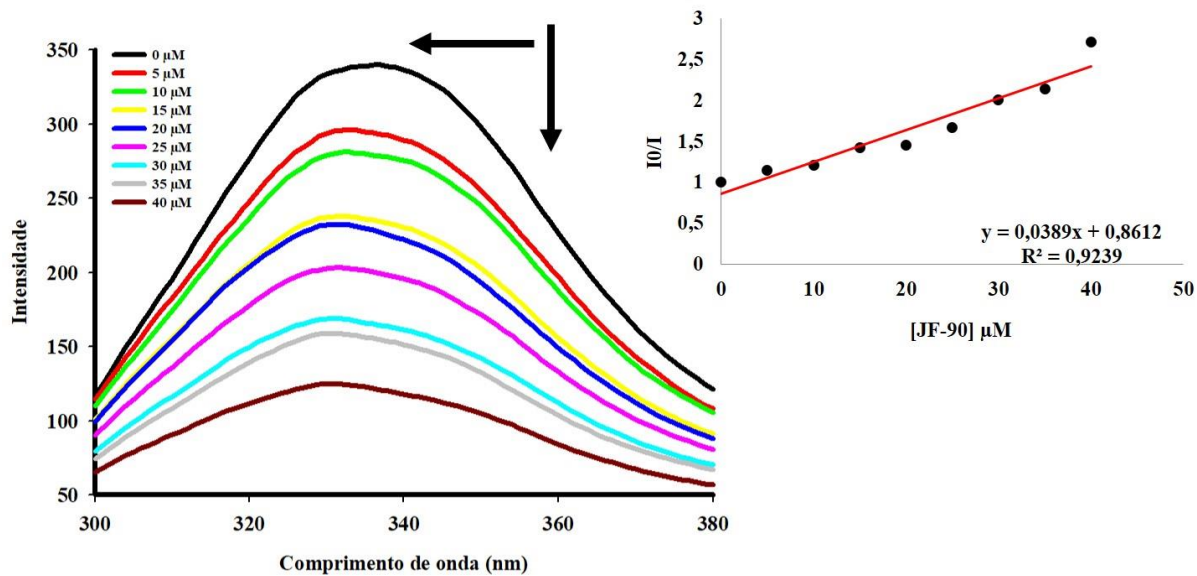
JF-95

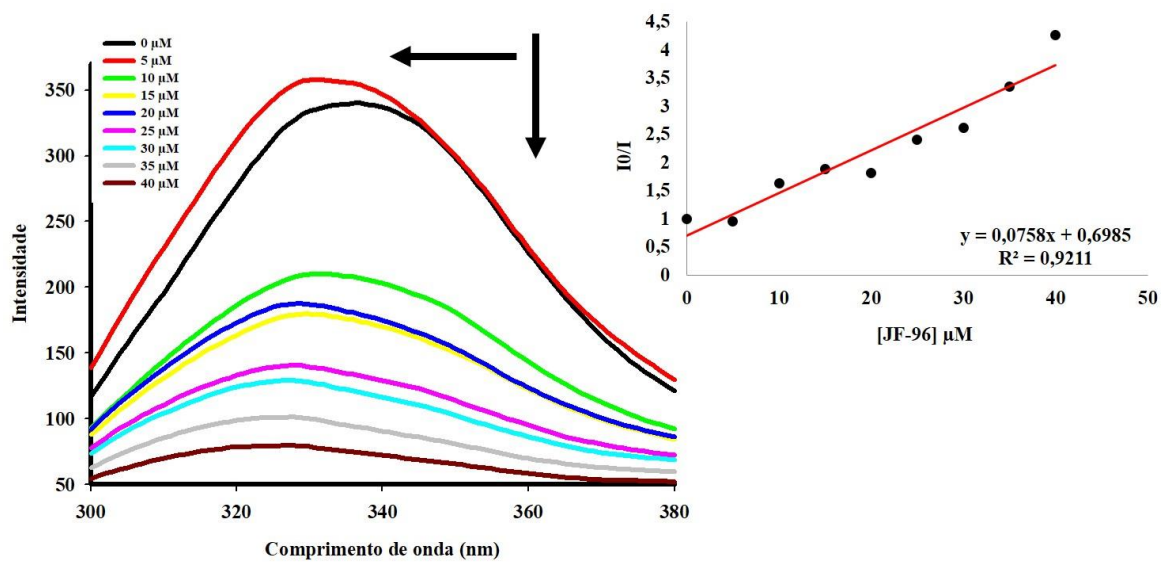
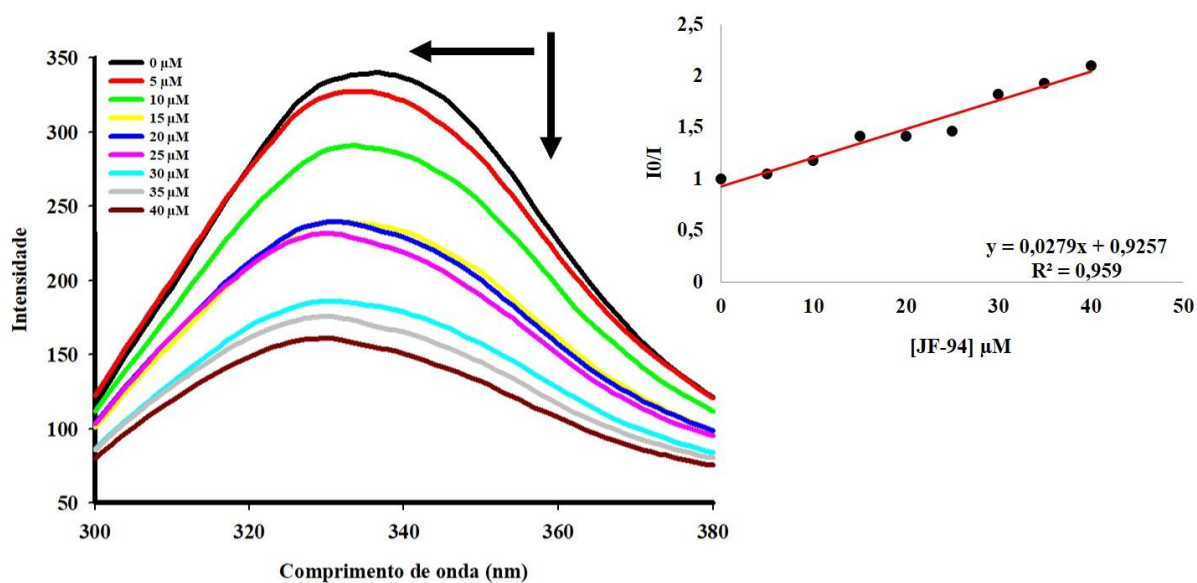
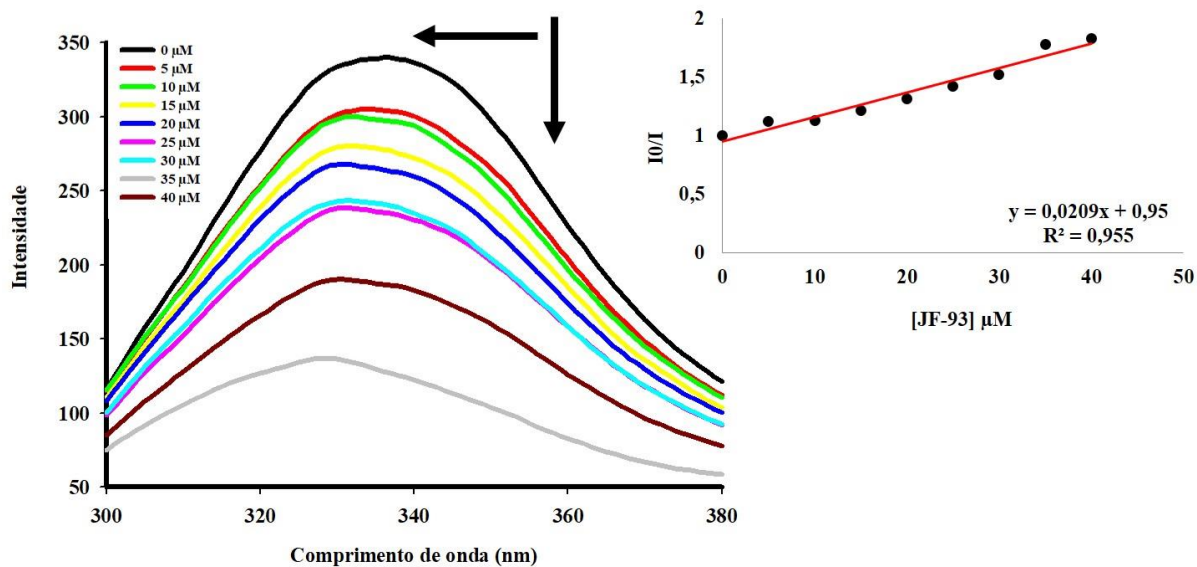


ESPECTROS DE EMISSÃO FLUORESCENTE – HSA + DERIVADOS JF









APÊNDICE B – ARTIGO

Artigo publicado na European Journal of Medicinal Chemistry:

Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition

Amélia Galdino Ribeiro¹, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{2,3*}, Jamerson Ferreira de Oliveira¹, Tulio Ricardo Couto de Lima Souza⁴, Keriolaine Lima dos Santos¹, Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque⁵, Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira^{2,6}, Luiz Bezerra de Carvalho Junior², Ricardo Olímpio de Moura⁷, Aline Caroline da Silva⁸, Valéria Rêgo Alves Pereira⁸, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro⁸, Maria do Carmo Alves de Lima¹

¹Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil;

²Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil;

³Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Garanhuns-PE, 55290-000, Brazil;

⁴Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada-PE, 56909-535, Brazil.

⁵Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil;

⁶Centro acadêmico de Vitória (CAV) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão-PE, 55608-680, Brazil;

⁷Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba – Bodocongo, Campina Grande-PB, 58429-500, Brazil;

⁸Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife-PE, 50670-420, Brazil;



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

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

Research paper

Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition

Amélia Galdino Ribeiro^a, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{b,c,*},
Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Tulio Ricardo Couto de Lima Souza^d,
Keriolaine Lima dos Santos^a, Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque^e,
Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira^{b,f}, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^b,
Ricardo Olímpio de Moura^g, Aline Caroline da Silva^h, Valéria Rêgo Alves Pereira^h,
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^h, Maria do Carmo Alves de Lima^a

^a Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil

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

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

^d Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, 56909-535, Brazil

^e Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil

^f Centro Acadêmico de Vitória (CAV) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, 55608-680, Brazil

^g Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba – Bodocongo, Campina Grande, PB, 58429-500, Brazil

^h Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, PE, 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2019

Received in revised form

7 July 2019

Accepted 5 August 2019

Available online 6 August 2019

Keywords:

DNA binding
Topoisomerase
Breast cancer
BSA interaction

ABSTRACT

Twelve 2-(quinolin-4-ylmethylene) hydrazinecarbothioamide derivatives were synthesized and their biological properties were investigated, among which, the ability to interact with DNA and BSA through UV–Vis absorption, fluorescence, Circular Dichroism, molecular docking and relative viscosity, antiproliferative activity against MCF-7 and T-47D mammary tumor cells and RAW-264.7 macrophages and inhibitory capacity of the enzyme topoisomerase II α . In the binding study with DNA and BSA, all the compounds displayed affinity for interaction with both biomolecules, especially JF-92 (*p*-ethyl-substituted), with binding constant of 1.62×10^6 and 1.43×10^5 , respectively, and DNA binding mode by intercalation. The IC₅₀ values were obtained between 0.81 and 1.48 μ M and topoisomerase inhibition results in 10 μ M. Thus, we conclude that the reduction of the acridine to quinoline ring did not disrupt the antitumor action and that substitution patterns are important for biomolecule interaction affinity as they demonstrate the potential of these compounds for anticancer therapy.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is considered one of the main causes of death in the world and millions of new cases are estimated for 2019 [1]. Reports of resistance to cancer treatment medication have grown over the

years. This has promoted the planning of new antitumoral drugs capable of slowing tumor progress or terminating it and relieving patients of further undesirable effects [2,3].

Thiosemicarbazone derivatives are molecules that present a wide range of biological activities such as antibacterial, anti-protozoal, antiviral and antitumoral. Antitumoral action is described in the works by Oliveira et al. and Ali et al. who have demonstrated cytotoxic activity for different altered cell lines [4,5]. Investigations on the mechanism for the same class of molecules described by Oliveira et al. indicate that compounds interact with the DNA double helix and inhibit topoisomerase enzyme, which is

* Corresponding author. Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Garanhuns, PE, 55290-000, Brazil.

E-mail address: sinara.monica@upe.br (S.M.V. Almeida).

an essential therapeutic target for antitumoral drugs in clinical use [6].

One of the main therapeutic targets in the antitumoral therapy, DNA is studied through interaction trials in order to assess new compounds, such as acridine derivatives. These compounds play an important role on tumoral regression due to the interruption of the cell cycle after binding to DNA [7,8]. Acridine can undergo molecular simplification studies – one of the most used strategies in medicinal chemistry to reduce aromatic nuclei and/or portions of molecules through a planned method. This contributes to the improvement of the compound structure and to the assessment of therapeutic action after reduction [9–11]. In the present article, this strategy was used to obtain the quinoline nucleus from the acridine ring as it still presents rigid planar structure albeit its two condensed rings. This structural change can favor tumoral activity against different types of tumors. Cytotoxic and antiproliferative effects towards cancer cell lines, for instance, were described by Ghodsi et al. [12], Kuo et al. [13], Yadav et al. [14] and Malayeri et al. [15] to demonstrate the antitumoral potential of derivatives bearing quinoline moieties.

Further understanding on the pharmacological potential of drugs can be achieved by exploring their pharmacokinetic profile in their ability to bind to plasmatic proteins such as bovine serum albumin (BSA) which mimics human albumin [16,17]. Because BSA is capable of binding to different substances to transport them, it is important to understand the interaction between compounds and BSA as it provides information concerning the carriage of these molecules on the plasma that influence solubility, stability and lower toxicity [18–22]. A popular alternative to detect structural and molecular changes in proteins is the study of interactions through absorption and fluorescence spectroscopies because the changes in their spectrum allot better investigations on the mechanisms of interaction that influence therapeutic answer [23].

Therefore, the present article aimed at synthesizing new 4-quinoline- thiosemicarbazone derivatives, analyzing their toxicity potential towards macrophages cell lines and two breast-tumor cell lines (MCF-7, T-47D), as well as DNA and BSA *in vitro* and *in silico* interactions studies. In addition to the inhibition potential for human topoisomerase II α , a well-established molecular target for derivatives that contain the acridine ring, was also assessed.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The synthetic route of **JF**'s compounds is represented in Scheme 1. Thiosemicarbazides derivatives were obtained through a nucleophilic addition between the hydrazine and the substituted isothiocyanate [24,25]. The reaction was processed under magnetic agitation for 2 h at 25 °C using dichloromethane as solvent. In order to obtain thiosemicarbazones derivatives (**JF**'s), the condensation reaction employed reagent 4-quinoline-carboxaldehyde and substituted thiosemicarbazides from the previous stage. This reaction was performed at 25 °C under magnetic agitation for 2 h using ethanol as solvent and catalytic amounts of acetic acid (Scheme 1). The precipitate was filtered and washed with ethanol.

The structural characterization of the synthesized derivatives was achieved through infrared spectroscopy analyses (IR), nuclear magnetic resonance of hydrogen (NMR ^1H) and carbon (NMR ^{13}C) and mass spectroscopy to verify the molecular mass of the resulting compounds.

IR spectrum analyses found the typical absorption bands for the functional groups present in the compounds. NH groups stretching was observed ranging from 3464 to 2969 cm^{-1} . Stretching ranging from 1551 to 1502 cm^{-1} as well as from 1075 to 1095 cm^{-1}

attributed to groups C=N and C–S were also verified, respectively.

Signals referring to all hydrogen present in the **JF**'s compounds were observed in the NMR ^1H spectra, particularly, singlet signals with chemical shifts ranging from δ 8.93 to δ 9.05 (1H, H–C=N), δ 8.93 to δ 10.66 (1H, NH) and δ 11.80 to δ 12.40 (1H, NH hydrazinic). These constitute diagnostic signals that testify the formation of the thiosemicarbazones. Quinoline ring hydrogen clearly showed the presence of duplet signals and double doublet to hydrogen of the same ring, situated from δ 7.71 and δ 9.00.

Structural verification of derivatives was also possible by means of NMR ^{13}C spectrum analysis, in which it was noted the presence of diagnostic signals referring to iminic carbon (HC=N) and thio-carbonyl group (C=S) in the range from δ 137.21 to δ 139.32 and δ 175.92 to δ 178.22, respectively. That is evidence of thiosemicarbazones portions.

The last elucidation on the structure of **JF**'s derivatives was also achieved by means of mass spectrometry in order to find respective molecular masses. Theoretical molecular masses were situated from 271.0973 to 385.0078 g/mol, results that were confirmed experimentally by means of spectrometry MALDI-TOF. Peaks regarding the molecular ion of the derivatives under analysis in mass/charge (m/z) ratio were noted with values between 271.1150 and 385.0130 g/mol thus showing the effective obtention of **JF**'s compounds as planned.

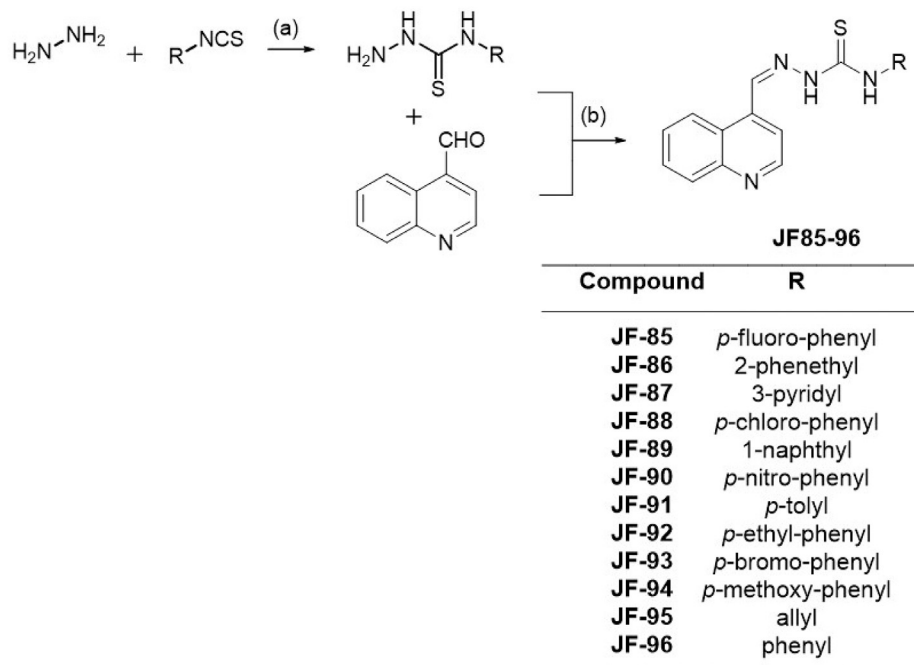
Thiosemicarbazones derivatives reactions allowed the obtention of diastereoisomers *E/Z* due to the double imine bind (C=N). Doublet signals regarding this portion of the NMR ^1H spectra were observed. However, all derivatives synthesized displayed a singlet signal of the imine group HC=N, which allowed the deduction that a single configuration was achieved and *E* isomery was likely due to the preference for that type of thiosemicarbazone [26,27]. This can be verified through NOESY technique as shown in Fig. 01, corroborating with the results obtained by Oliveira et al. [4].

2.2. DNA binding assay

Absorption spectroscopy, fluorescence and Circular Dichroism (CD) were performed to investigate ctDNA interaction. As expected, all free **JF**'s derivatives showed absorption in the range from 300 to 450 nm [28,29]. In the presence of crescent concentrations of ctDNA (0–100 μM), intense absorption was noted for the same region of free compounds. Nonetheless, both hyperchromic and hypochromic effects with bathochromic or hypsochromic shifts were detected, meaning interactions with ctDNA double helix [30,31]. Complete spectroscopic data on absorption and fluorescence are displayed in Table 01.

The highest hyperchromic effect was noted for **JF-94** (*p*-methoxy) at 59.65%, demonstrating that the strong electron-donor effect of the methoxy group is significant to the interaction between molecule and DNA [32]. A different evidence from the interaction compound-DNA is the change of maximum of absorption for the red and blue regions. The greatest bathochromic shift was noted for **JF-92** (*p*-ethyl) ($\Delta\lambda$ = 13 nm), likely due to binding configurations that caused absorption of light in longer wavelengths (Fig. 02) [33]. The greater hypochromic effect was found for **JF-96** and attributed to the stabilization of aromatic ring electrons. This phenomenon occurs because the non-substituted phenyl forms a more stable complex with ctDNA.

Compound-ctDNA complexes binding constants (K_b) were calculated to quantify the binding strength of derivatives [34]. The constants ranged from 10^4 to 10^6 in which the highest values mean greater affinity to DNA. The crescent order of K_b values for **JF**'s derivatives was **86** < **90** < **96** < **95** < **88** < **93** < **94** < **87** < **85** < **89** < **91** < **92**. The various levels of electronic contribution of each substituent radical play a different role in the bonding strength of the



Scheme 1. Synthetic route of the derivatives 4-quinoline-thiosemicarbazones (JFs). Reagents and conditions: (a) Dichloromethane, 25 °C, 2 h; (b) EtOH, AcOH (30 drops), 25 °C, 2 h.

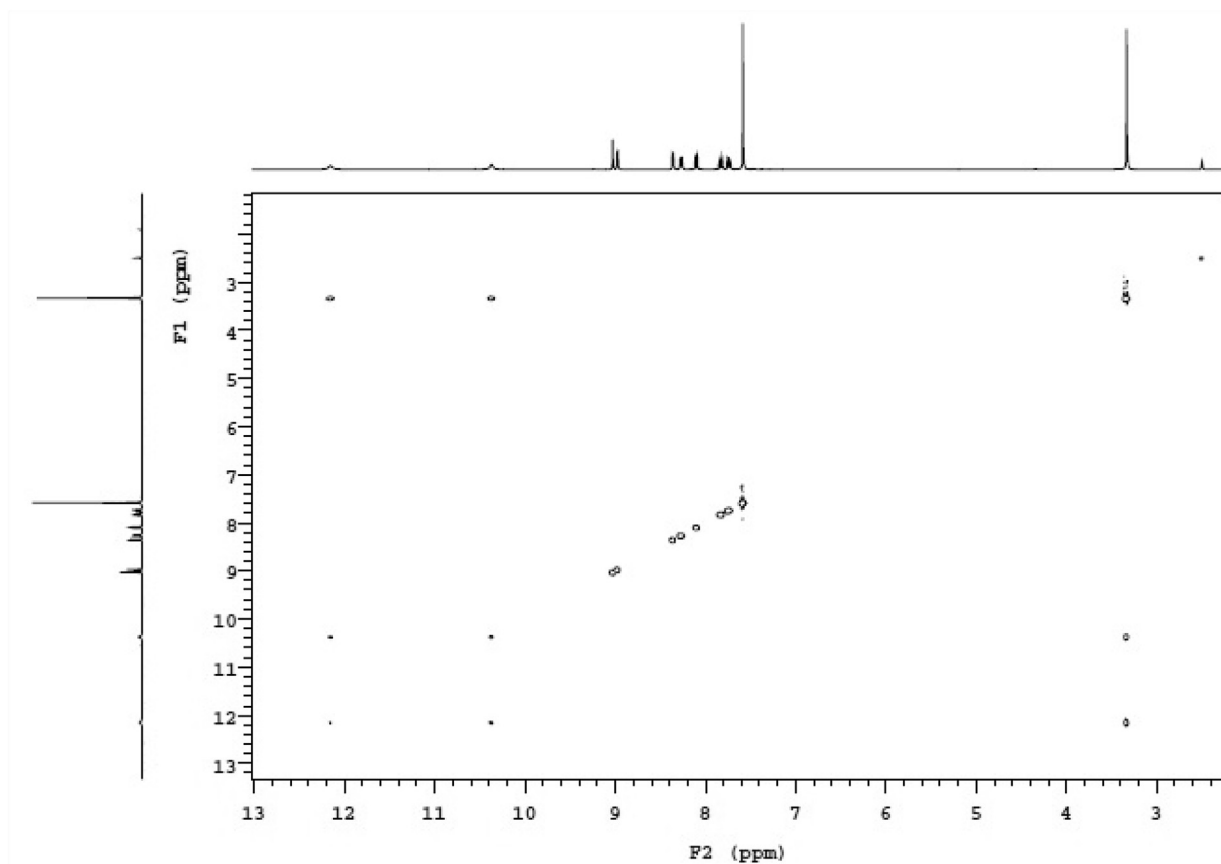
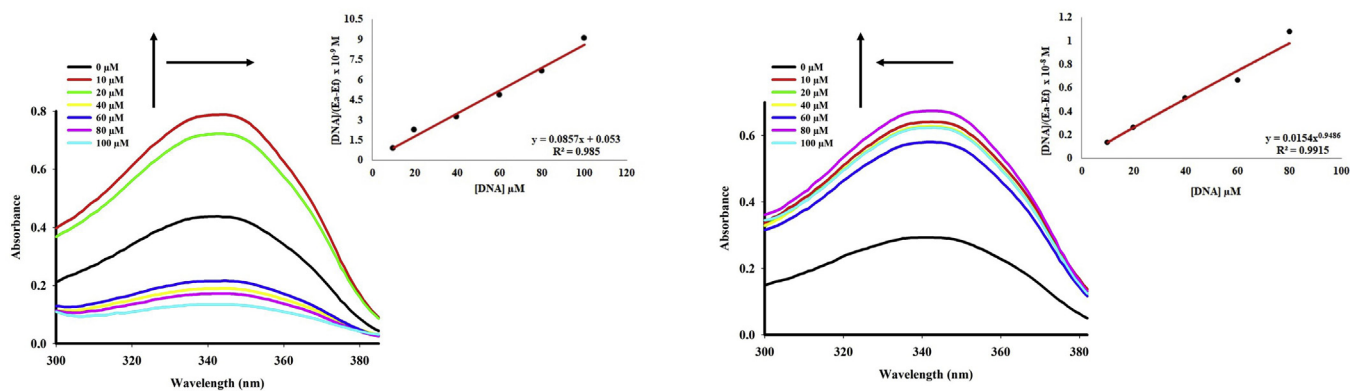


Fig. 01. NOESY Spectrum of derivative JF-93 (*p*-Bromo).

Table 01UV–vis absorption and fluorescence emission data of **JF**'s derivatives in the presence and absence of ctDNA.

Compound	$\lambda_{\max}^{\text{free}}{}^{\text{a}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{bond}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hypercr. (%) ^b	Hypocr. (%) ^c	Kb ^d M ⁻¹	$\lambda_{\max}^{\text{free}}$ (nm) ^e	$\lambda_{\max}^{\text{bond}}$ (nm)	Hypercr. (%)	Hypocr. (%)
	342	342	0	15.92	–	2.37×10^5	406_428	421	–	3.44x
	345	345	0	–	27.37	2.42×10^4	417_438	415_440	–	5.53x
	343	343	0	–	20.27	1.96×10^5	411_434	411_440	0.89x	–
	344	343	1	–	8.51	6.29×10^4	427_448	415	–	1.88x
	349	349	0	13.87	–	2.54×10^5	416_438	415	–	1.67x
	349	348	1	–	12.89	2.51×10^4	419_439	414	–	7.69x
	349	350	1	11.84	–	3.56×10^5	417_439	413	–	2.77x
	352	365	13	51.41	–	1.62×10^6	420_439	413	–	4.65x
	352	347	5	–	10.77	7.44×10^4	410_429	409	–	6.06x
	344	343	1	59.65	–	1.33×10^5	418_438	412	–	11.64x
	340	341	1	2.88	–	3.98×10^4	419_439	426	–	6.64x
	344	344	0	–	52.34	3.50×10^4	417_438	414	–	3.72x

^a Absorption of ctDNA scanned in the range of 200–600 nm.^b Hyperchromicity for complexes formed by **JF**'s derivatives and 100 μM of ctDNA in comparison to free **JF**'s compounds.^c Hypochromicity for complexes formed by **JF**'s derivatives and 100 μM of ctDNA in comparison to free **JF**'s compounds.^d Binding constant (Kb) obtained from complexes formed **JF**-ctDNA.^e Fluorescence of **JF**'s derivatives in the range of 400–600 nm.**Fig. 02.** UV–vis absorption spectrum of derivative **JF-92** (left) and **JF-94** (right) in the absence and presence of ctDNA. [ctDNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μM . Arrows ($\uparrow$), ($\leftarrow$) and ($\rightarrow$) refer to hyperchromic, hypochromic and bathochromic effects, respectively. Insert: corresponding graph of $[\text{DNA}]/([\text{Ea}]-[\text{Ef}])$ in function of concentration ctDNA, as determined from the spectral data.

compound to DNA. The derivative with the highest K_b value was **JF-92** (1.62×10^6), which corroborates results by Janovec et al. [35]. Contrary to **JF-92** (*p*-ethyl), **JF-86** (phenylethyl) presented the lowest value for K_b (2.42×10^4), showing that, in spite of the same electronic and lipophilic properties of **JF-92**, the direct bond of the aromatic ring to the thioamide function did not favor binding DNA affinity. This is probably due to the presence of a spacer linker that may contribute to greater rotation in this substitution, as well as to different conformations that jeopardize the interaction process.

Craig diagram might be applied to these studies because of its intercorrelated analysis of physical-chemical parameters of pharmacological drugs using electronic (σ) and lipophilic descriptors (π) [36]. It was verified that substituents at *para* position with smaller electronic profiles influence positively DNA interactions. The variation in light absorption, observed for all compounds, is not related to the DNA binding strength because the derivatives with greater hypochromic and hyperchromic (**JF-96** (unsubstituted) and **JF-94** (*p*-methoxy), respectively) did not show high K_b values because of neutral electronic and lipophilic effects ($^0\sigma$ $^0\pi$).

Regarding fluorescence studies, all **JF**'s compounds displayed emissions in the range from 400 to 550 nm with two emission peaks (Table 01). Fluorescence emission in the analysis of the complex **JF**-DNA occurred at the same wavelength range. From the fluorescence results, the crescent order of hypochromic effects for the derivatives was $89 < 88 < 91 < 85 < 96 < 92 < 86 < 93 < 95 < 90 < 94$, which shows that weaker lipophilic properties of the substituent groups can cause greater hypochromism. Following the formation of the complex compound-ctDNA, there were hypsochromic and bathochromic shifts in the emission maxima for all compounds. The compound with the highest hypochromic effect was **JF-94** (*p*-methoxy) (Fig. 03).

Concerning twelve of the analyzed compounds, only **JF-87** (3-pyridyl) displayed increase in light intensity after contact with DNA probably because of the reduction of compound conformational flexibility in the DNA-ligand complex [37]. This can be explained by the presence of Nitrogen in the phenyl ring with free pairs of electrons that influence hyperchromism.

DNA binding properties were further investigated through CD, a technique used to assess alterations in the secondary structure of ctDNA in the presence of **JF**'s compounds and capable of informing the modes of interaction between DNA and ligands [38,39]. According to Fig. 04, CD spectrum showed the presence of positive and negative bands at 274 and 245 nm, respectively, of ctDNA (black) which characterizes their right B conformation [38,40].

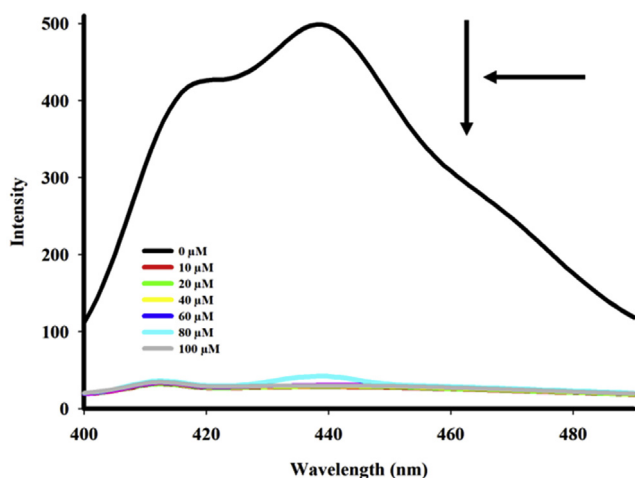


Fig. 03. Fluorescence spectrum of **JF-94** derivative. [ctDNA] = 0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 μ M. Arrows ($\downarrow$) and ($\leftarrow$) refer to hypochromic and hypsochromic effects, respectively.

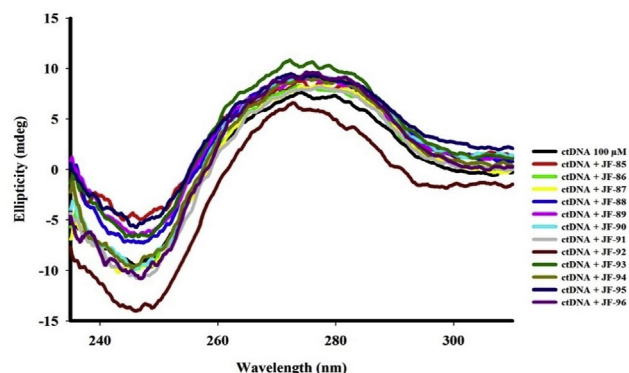


Fig. 04. Circular Dichroism Spectrum of ctDNA in the absence and presence of **JF**'s derivatives. [ctDNA] = 100 μ M [**JF**'s] = 30 μ M.

After incubating all compounds in the same concentration, spectral changes that confirmed ligation with ctDNA were observed [41].

Derivative **JF-92** (*p*-ethyl) caused greater spectral change in ctDNA leading to the decrease in the positive band and the increase in the negative band. At 245 nm, the latter is related to changes in ellipticity while the former is related to the weakening of base stacking and the transition to a more denatured structure. This might lead to interaction by intercalation [39,42]. The absence of bathochromic or hypsochromic shifts indicate non-significant changes in the ctDNA B conformation [43]. Less prominent shifts in the remaining compounds suggest groove binding.

In order to elucidate, in fact, the mechanism of interaction of the **JF**'s derivatives with the DNA, the viscosity studies were performed. This hydrodynamic technique confirms the modes of interaction of ligands to DNA by observing an increase or decrease of the relative viscosity (η) of the ligand-DNA complex [40,44,45]. The increase of DNA viscosity in the presence of the ligands is explained by the greater extension of the double strand of DNA due to the structural disarrangement caused by intercalation. If there is no increase of this viscosity or only slight almost imperceptible changes, the mechanism of interaction can be by DNA groove binding or electrostatic attractions [46–48]. The plot of the relative viscosity of the salmon sperm DNA (ssDNA) in the presence of the compounds **JF**'s and *m*-AMSA are shown in Fig. 05.

The increase in the relative viscosity of the ssDNA in the presence of the **JF**'s compounds and the standard drug *m*-AMSA is noted in Fig. 05. This drug is known to exert antitumor action through its mechanism of interaction by DNA intercalation, in addition to its potential to inhibit the enzyme topoisomerase [49,50]. It was found that **JF**'s derivatives, compared to *m*-AMSA, caused a greater increase in the ssDNA viscosity, an evidence of an intercalation profile

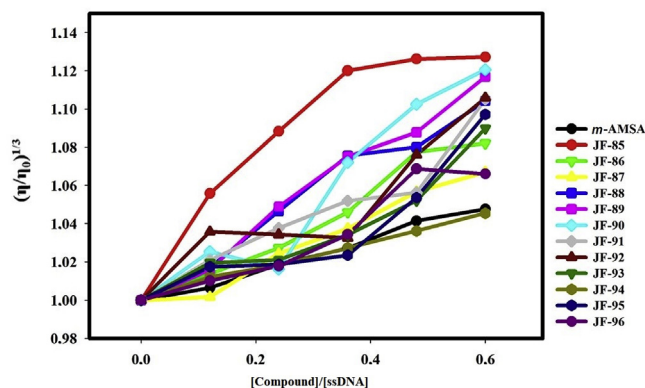


Fig. 05. Relative viscosity of ssDNA with **JF**'s derivatives or *m*-AMSA.

[51,52]. These findings demonstrate that, even with the reduction of the acridine nucleus to the quinoline nucleus, these derivatives attachment to DNA still remains unchanged with greater intercalation capacity than the acridine derivative (*m*-AMSA). An exception is made for derivative **JF-94** (*p*-methoxy), which showed similar viscosity to the standard compound probably due to both bearing a methoxy moiety as substituent at lateral group.

2.3. BSA interaction study

Serum albumin is the most abundant protein in plasma and is involved in the carriage of several substances such as fatty acids, amino acids, steroids, metallic ions and drugs through the blood stream. BSA shows great structural homology to the human blood albumin [53,54]. Therefore, it is used to determine the bond, transport potentials and consequent biological properties of novel compounds [55].

Results from this investigation show that BSA absorption suffered hyperchromism at 278 nm region in the presence of growing concentrations (0–40 μ M) of all **JF**'s compounds (Table 02), indicating interaction between compounds and BSA [53,56,57]. Concerning the derivate compounds, **JF-92** (*p*-ethyl) promoted greater hyperchromic effect (62.01%). It was the only compound that promoted hypsochromic effect ($\Delta\lambda = 1$ nm) (Fig. 06). This shift is likely due to the fact that the protein active site be a hydrophobic environment containing Trp²¹² residue [57,58]. The crescent order of the binding constant for the albumin-bonded derivatives was **94** < **96** < **87** < **85** < **90** < **86** < **88** = **89** < **93** < **91** < **92** < **95**, which shows the lipophilic character of substituent groups as a positive influence for better binding affinity to the protein.

These results were corroborated by BSA fluorescence analysis (when excited at ~280 nm) due to tryptophan aromatic amino acid residue. Fluorescent extinction suggests the formation of a complex between compound and protein, correspondent to alterations in the microenvironment of these residues due to the binding process [56,59]. In the present study, BSA fluorescent suppression was observed in the presence of all **JF**'s derivatives (Table 02), accompanied with hypsochromic shifts. Derivative **JF-92** (*p*-ethyl) led to greater hypochromism and shift ($\Delta\lambda = 4$ nm) (Fig. 07). BSA hyperchromism in the absorption spectroscopy as well as hypochromism of fluorescence emission can be attributed to the probable changes in the protein secondary structure after interaction with **JF**'s derivatives [60,61].

Based on fluorescence emission data, the fluorescence suppression constants (Ksv) were calculated by linear regression of the

graph for intensity of relative emission (I0/I) versus derivative concentration (Q) [62]. The compound with the highest value for this constant was **JF-92** (*p*-ethyl) (16.05×10^4) (Table 02). The crescent order of Ksv for derivatives was: **90** < **87** < **86** < **85** < **88** < **89** < **91** < **94** < **95** < **96** < **93** < **92**. It is possible to visualize that compounds with higher Ksv values also displayed greater hypochromism in the interactions with BSA, except for **JF-96** (unsubstituted). This can be attributed to the electronic profile of the radicals, as greater electronic contribution, through the mesomeric effects and positive inductive, means higher Ksv values, as observed for derivatives **JF-92** and **JF-93** (*p*-Bromo). Substituents with positive lipophilicity ($\pi+$) as seen in Craig Diagram [36], presented higher constants values. This is confirmed by the inferior availability of free electron pairs because the radicals that increase lipophilicity promote better interaction between the derivatives and BSA, as the main sites of ligation/interaction of many chemical substances are on hydrophobic pockets.

2.4. Molecular modeling

2.4.1. Ligands' ADME properties

Understanding the pharmacokinetic properties (ADME) of organic compounds is fundamental to the discovery of new drugs, especially in their early stages, which can determine their bioavailability [63]. The set of these processes is frequently studied by medicinal chemistry. The wider use of *in silico* methods and the prediction of possible toxic effects of new chemical entities enables the identification of drugs with better bioavailability and efficiency, thus reducing failures due to pharmacokinetic [63,64]. Pharmacokinetic properties of **JF**'s derivatives were obtained from platforms SwissADME and pkCSM and displayed in Table 03.

Oral bioavailability of drugs relies on the adequacy of their physical-chemical properties to some classic parameters, such as described by Lipinski et al. [65]. These parameters are molar mass ≤ 500 g/mol; LogP ≤ 5 (MLogP ≤ 4.15); hydrogen ligation acceptors (LH) ≤ 10 ; LH donors ≤ 5 . Other descriptors are established by Veber et al. [66] in which the number of rotational ligations must be ≤ 10 and the area for the topological polar surface (TPSA) ≤ 140 . All compounds were adequate according to these parameters.

Regarding water solubility (LogS) and considering solubility parameters (insoluble < -10 < little soluble < -6 < moderately soluble < -4 < soluble < -2 < very soluble < 0 < highly soluble), it was observed that derivatives presented values between -3.98 and -5.93. Therefore, all were considered moderately soluble in water, except for **JF-89** e *m*-Amsa which exhibited values of -6.12

Table 02

UV-vis absorption and fluorescence emission data of BSA in the presence and absence of **JF**'s derivatives.

Compound	$\lambda_{\max}$ free (nm) ^a	$\lambda_{\max}$ bond (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hypercr. (%) ^b	Kb ^c M ⁻¹	$\lambda_{\max}$ free ^d (nm)	$\lambda_{\max}$ bond (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Hypocr. (%) ^e	Ksv ^f M ⁻¹
JF-85	278	278	0	38.74	8.40×10^4	343	341	2	237.42	5.90×10^4
JF-86	278	278	0	62.54	1.08×10^5	343	341	2	157.14	4.09×10^4
JF-87	278	278	0	52.95	8.03×10^4	343	341	2	493.41	3.99×10^4
JF-88	278	278	0	53.34	1.13×10^5	343	341	2	68.97	6.07×10^4
JF-89	278	278	0	53.34	1.13×10^5	343	341	2	226.14	6.36×10^4
JF-90	278	278	0	43.48	1.03×10^5	343	340	2	132.77	3.82×10^4
JF-91	278	278	0	58.04	1.39×10^5	343	340	3	287.44	8.85×10^4
JF-92	278	277	1	69.01	1.43×10^5	343	339	4	601.57	16.05×10^4
JF-93	278	278	0	56.43	1.17×10^5	343	341	2	508.17	11.20×10^4
JF-94	278	278	0	42.61	5.44×10^4	343	342	1	320.04	9.24×10^4
JF-95	278	278	0	52.42	1.44×10^5	343	341	2	371.21	10.39×10^4
JF-96	278	278	0	52.75	7.29×10^4	343	342	2	33.65	11.19×10^4

^a Absorption of tryptophan residues of BSA scanned in the range of 200–600 nm.

^b Hyperchromicity for complexes formed by BSA and 40 μ M of **JF**'s derivatives in comparison to free BSA.

^c Binding constant (Kb) obtained from complexes formed **JF**-BSA.

^d Fluorescence of tryptophan residues of BSA after excitation in 285 nm and emission between 310 and 400 nm.

^e Hypochromicity for complexes formed by BSA and 40 μ M of **JF**'s derivatives in comparison to free BSA.

^f Stern–Volmer quenching constant (Ksv), obtained from quenching BSA fluorescence by **JF**'s.

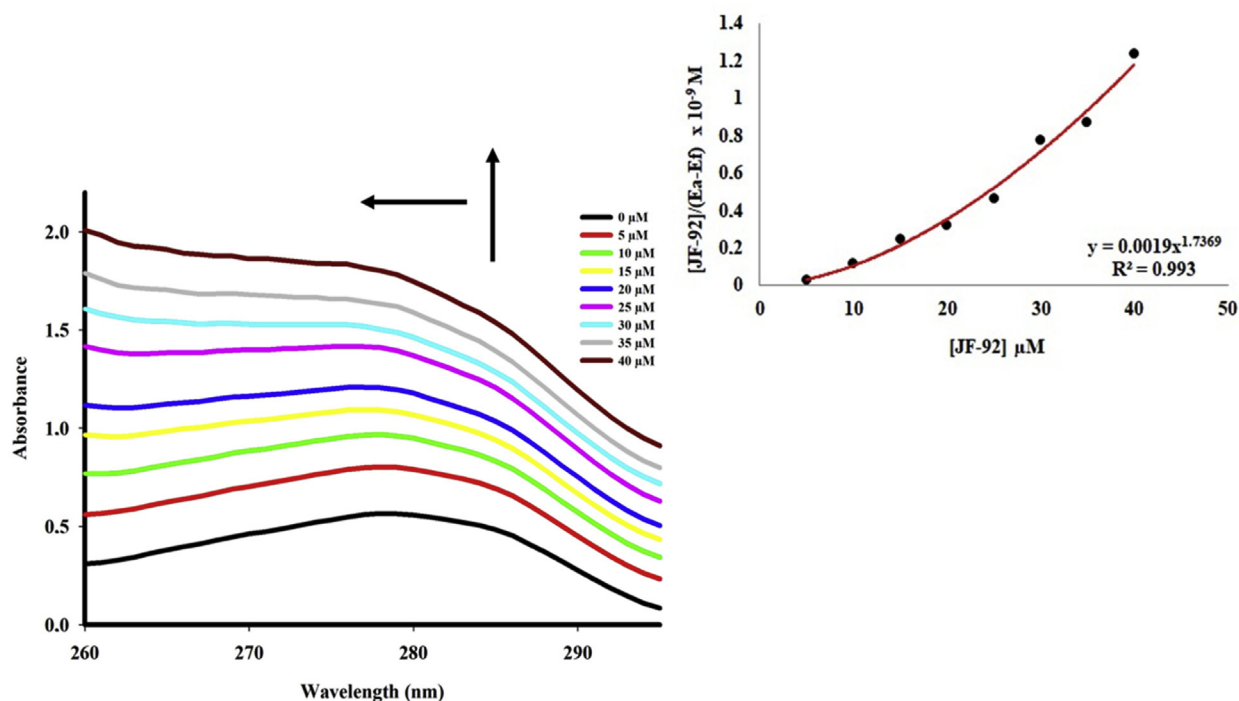


Fig. 06. Absorption spectrum of BSA in the absence and presence of derivative **JF-92**. [**JF-92**] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 μM . Arrows ($\uparrow$) and ($\downarrow$) refer to hyperchromic and hypsochromic effects, respectively. Insert: corresponding to graph of $[\text{JF-92}]/(E_a - E_f)$ in function of concentration of **JF-92**, as determined from the spectral data.

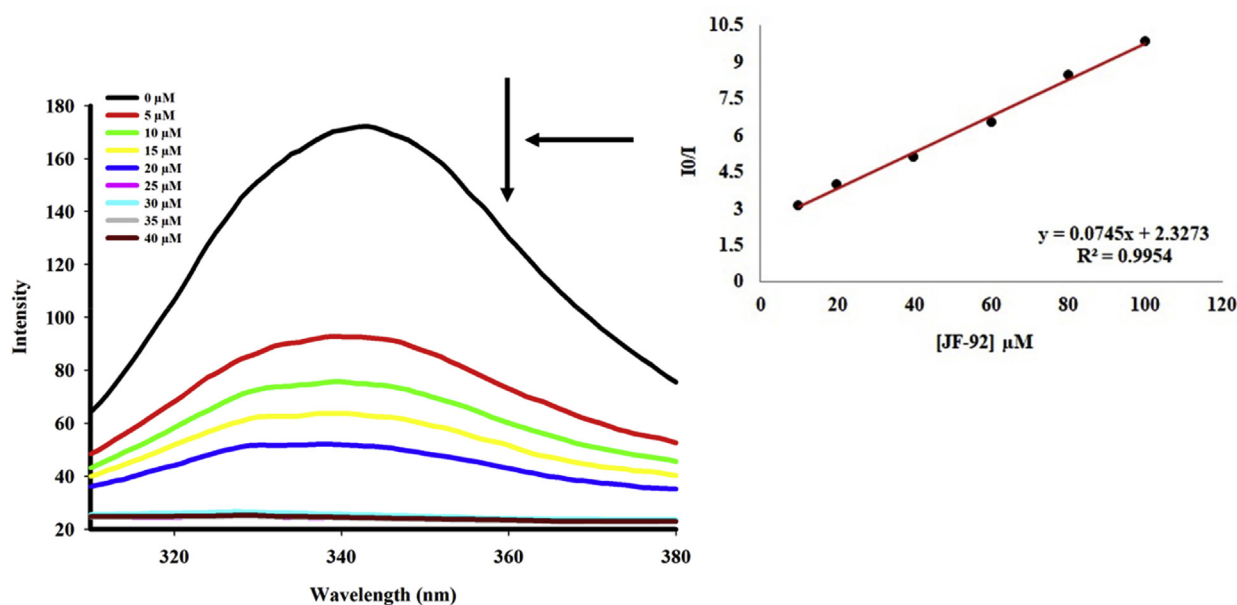


Fig. 07. Fluorescence spectrum of BSA in the absence and presence of derivative **JF-92**. [**JF-92**] = 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 μM . Insert: corresponding the fluorescence intensity of free BSA (I_0)/fluorescence intensity of bound derivative **JF-92** to BSA (I).

and -8.36 , respectively, indicating little solubility [67]. The lowest value of LogS and the highest value of LogP for **JF-89** is explained by the presence of the naphthalene grouping which contains two fused aromatic rings and leads to greater hydrophobia of the molecule as a whole.

Regarding the remaining descriptors (permeability in Caco-2, intestinal absorption and VDss), the derivatives displayed good intestinal permeability though values above 0.90 and easy absorption in the small intestine. The only compound that displayed permeability inferior to the established (0.736) was **JF-90**, due to

the presence of the Nitro group, a heavy species that hinders the molecule passive absorption. *m*-Amsa also had lower permeability, with value of 0.757. Concerning VDss, high values indicate higher distribution of compounds in tissues rather than in plasma (low: < 0.15 ; high: > 0.45) [67]. In that case, values of VDss for most derivatives show intermediate distribution in the tissues. Lower distributions were detected for **JF-89** and **90**, which might be explained by the low hydrosolubility profile and the greater ionization capacity for **JF-90**.

Considering the previous information, it was verified that most

Table 03

In silico pharmacokinetic data of **JF**'s derivatives estimated with the aid SwissADME and pkCSM webservices.

Compound	LogP ^a	LogS ^b	TPSA ^c (Å ²)	Caco-2 perm. ^d	Int. abs. ^e	VDss ^f
JF-85	2.84	−4.92	81.40	1.346	90.593	0.187
JF-86	2.65	−5.23	81.40	1.352	92.456	0.371
JF-87	1.38	−3.98	94.29	1.341	93.282	0.367
JF-88	2.95	−5.47	81.40	1.456	88.861	0.234
JF-89	3.19	−6.12	81.40	1.237	90.586	−0.094
JF-90	1.49	−5.61	127.22	0.736	89.937	−0.003
JF-91	2.69	−5.19	81.40	1.355	91.095	0.249
JF-92	2.92	−5.64	81.40	1.367	91.064	0.379
JF-93	3.07	−5.54	81.40	1.076	88.794	0.253
JF-94	2.13	−4.98	90.63	1.329	92.087	0.324
JF-95	1.58	−3.87	81.40	1.341	92.961	0.179
JF-96	2.45	−4.82	81.40	1.359	91.018	0.178
m-AMSA	2.22	−8.36	88.70	0.757	95.344	−0.839

^a SwissADME log of octanol-water partition coefficient.

^b SwissADME log of aqueous solubility.

^c SwissADME Topological Polar Surface Area (TPSA).

^d pkCSM prediction of caco-2 cell permeability as estimation of absorption at human intestinal mucosa.

^e pkCSM prediction of the proportion (%) of compound absorbed through the human small intestine.

^f pkCSM prediction of the log steady state volume distribution (VDss).

derivatives abide by the rules assigned for good oral bioavailability and are adequate to more advanced investigations.

2.4.2. Molecular docking

Docking is a tool of molecular modeling that allows the theoretical study based on the prediction of conformation and/or the geometry of certain molecules (ligands) to a target biomacromolecule, such as DNA, proteins and enzymes [68]. Docking is rather useful in the design of new drug prototypes through computer simulation of possible ligand-receptor interactions at the molecular level. It can also demonstrate the cytotoxic and therapeutic potential of substances. The present study enabled the detailed assessment of the interaction mode of **JF**'s derivatives to DNA + topoisomerase. It employed the structure of the biomolecule with the co-crystallized ligand etoposide, a well-established topoisomerase inhibitor that stabilizes a DNA complex leading to the cleavage of the double helix and consequent cell death [69,70].

The derivatives under investigation were analyzed in the same position of the ligand etoposide therefore defining the best conformation and interaction for each compound. Data on the binding energy for each ligand as well as the types of interaction between ligands and the DNA-topoisomerase complex are described in Table 04.

Results allow the claim that compounds interact not only with the DNA double helix but also with certain amino acid residues present in the structure of the topoisomerase among which Arg⁴⁸⁷, Asp⁴⁶³, Met⁷⁶² and Met⁷⁶⁶. Binding energies varied from −7.06–9.78 kcal. Analyses of structures obtained through docking revealed the presence of electrons π stacking between the aromatic rings of both ligands and DNA as an important characteristic of ligand-receptor interaction. This is described in Table 04. Stacking of electrons π is fundamental for interactions between ligands containing aromatic rings and DNA during intercalation. Among the derivatives under analysis, derivative **JF-92** (*p*-ethyl) presented the highest binding constant in experimental studies. Docking analysis revealed that type of interaction with the bases A¹² and G¹³ in the fragment F of DNA (Fig. 08). Furthermore, hydrogen ligations to groups NH and S of **JF-92** were detected for bases G¹⁰, T⁹ as well as for residue Asp⁴⁶³.

The disposition of ligand **JF-92** to bind with DNA and enzyme topoisomerase II α is presented in Fig. 09. It is noted that **JF-92** is capable of intercalating between DNA bases through the stacking of

quinoline π electrons with A^{12-F} and G^{13-F} residues from DNA. These results were important to characterize the types of interaction between derivatives **JF**'s and DNA + enzyme topoisomerase II α , establishing ligation modes and confirming experimental data. Lastly, it also provides support for future analysis with these ligands.

The bond between drugs and serum proteins such as albumin was also relevant. Molecular docking studies can provide further insight into this interaction by predicting pharmacokinetic profiles (ADME) [71]. The current investigation used albumin (BSA) containing co-crystallized naproxen ligand, a non-steroidal anti-inflammatory that binds to BSA by electrostatic attraction [72]. This was used to find possible orientations and interactions between derivatives and BSA through the exploration of two ligation subdomains IIA and IIIA and their adjacencies. The complete data are seen in Table 05.

According to data displayed on Table 05, all derivatives interacted with BSA due either to hydrogen binds or to hydrophobic interactions (π -alkyl, π -alkyl/alkyl and π -electron stacking). Values for the binding energy ranged from −7.58 and −11.51. Based on absorption and fluorescence, it is assumed that the derivatives are found in hydrophobic pockets near tryptophan (Trp) residue as the interaction led to the increase of light absorption and the suppression of fluorescence for this amino acid. Experimental studies demonstrated that the derivative with the highest binding constant and suppression was **JF-92** (1.43×10^5 e 16.05×10^4 , respectively). Results of molecular docking for **JF-92** and BSA revealed the direct interaction between **JF-92** and the Trp amino acid in its highest energy conformation (−8.89 kcal/mol), realizing stacking between electrons π from the quinoline ring and electrons π from the Trp²¹³ indole ring, which can justify the experimental results. It was also possible to observe other interactions such as hydrogen binds to Ser³⁴³ and Asp⁴⁵⁰ residues and π -alkyl with residues Arg⁴⁸³, 484, 194, Trp²¹³, Val³⁴² and Leu⁴⁵⁶. Ligations π -sigma could be seen with Leu¹⁹⁷. The lowest-energy conformation complex for **JF-92** with albumin protein between the IIA and IIIA protein sites next to tryptophan is seen on Fig. 10 (highlighted in yellow).

2.5. Cell viability

Viability of non-transformed cells was assessed to verify toxicity of **JF**'s derivatives in RAW 264.7 macrophage cells. Values of CC₅₀ are seen on Table 06. Accordingly, all derivatives presented values higher than 22 μ M. Compared to positive control, all derivatives displayed higher values of CC₅₀, except for **JF-89** due to the presence of Naphthyl, that increased toxicity as it binds to cell DNA and is capable of inhibiting topoisomerase enzyme as it will be shown.

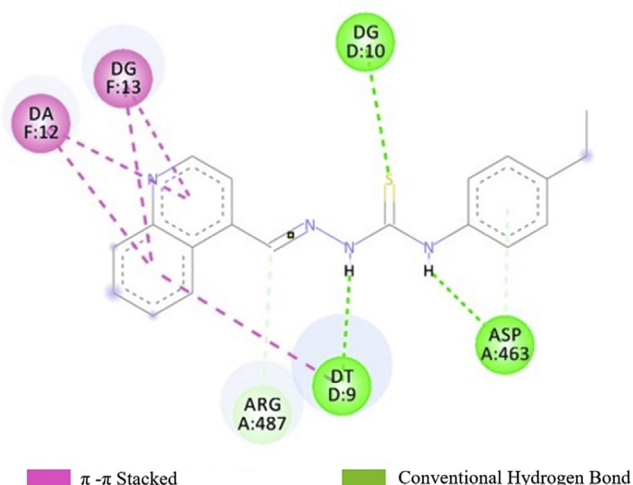
In vitro anticancer activity of **JF**'s derivatives was determined using breast tumor cell lines (MCF-7 and T-47D), with data for IC₅₀ (μ M) presented Table 06. MTT assay was employed and *m*-Amsa was used as positive control. The selectivity Index (SI) was calculated for each tumor line and it was verified high selectivity of all **JF**'s derivatives in the two tumor lines used. The most sensitive tumor line was MCF-7, with IC₅₀ values between 0.81 and 1.10 μ M. For the T-47D line, IC₅₀ values were found between 1.07 and 1.48 μ M.

The compounds with greater cytotoxicity for MCF-7 cell line were **JF-89** (Naphthyl), **JF-90** (*p*-NO₂) and **JF-92** (*p*-ethyl) with IC₅₀ values of 0.88, 0.81 and 0.82 μ M, respectively, which were lower compared to the *m*-Amsa standard (0.91 μ M). Thus, it is found that benzyl ring substitution is not necessarily favorable for cytotoxic action against MCF-7 line cell, not only by the lower IC₅₀ in the above mentioned compounds, but also by the high IC₅₀ values observed for **JF-85** (*p*-Fluor) (IC₅₀: 1.10 μ M), **JF-86** (phenylethyl) (IC₅₀: 1.09 μ M), **JF-88** (*p*-Chloro) (IC₅₀: 1.07 μ M) and **JF-96** (unsubstituted) (IC₅₀: 1.07 μ M). These results demonstrate that non-substitution, the presence of more electronegative halogens and a

Table 04Series of **JF**'s ligands for the DNA-topoisomerase II α complex by molecular docking.

Ligands	Binding energy (kcal/mol)	Drugs-receptor interaction		
		Conventional Hydrogen bond	π -alkyl	Stacked π - π
JF-85	-8.06	G ¹³ -F	Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ -D A ¹² -F G ¹³ -F
JF-86	-8.42	—	Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ -D C ⁸ -C
JF-87	-8.35	C ⁸ -C T ⁹ -D	Met ⁷⁶² Arg ⁴⁸⁷	—
JF-88	-8.83	Asp ⁴⁶³	Met ⁷⁶² Met ⁷⁶⁶	C ⁸ -C
JF-89	-9.78	G ¹³ -F T ⁹ -D	G ⁷ -C	A ¹² -F G ¹³ -F T ⁹ -D
JF-90	-9.69	T ⁹ -D A ¹² -F Asp ⁴⁶³ Arg ⁴⁸⁷	Arg ⁴⁸⁷	G ¹³ -F A ¹² -F T ⁹ -D
JF-91	-8.83	G ¹⁰ -D T ⁹ -D Asp ⁴⁶³	—	A ¹² -F G ¹³ -F
JF-92	-8.78	G ¹⁰ -D T ⁹ -D Asp ⁴⁶³	—	A ¹² -F G ¹³ -F
JF-93	-9.04	T ⁹ -D	G ⁷ -C Met ⁷⁶² Met ⁷⁶⁶ Arg ⁴⁸⁷	—
JF-94	-8.87	T ⁹ -D G ¹³ -F Arg ⁴⁸⁷	Arg ⁴⁸⁷	A ¹² -F G ¹³ -F T ⁹ -D
JF-95	-7.06	T ⁹ -D	Arg ⁴⁸⁷	—
JF-96	-8.48	G ¹⁰ -D T ⁹ -D Asp ⁴⁶³	Arg ⁴⁸⁷	A ¹² -F G ¹³ -F T ⁹ -D

A¹²; C⁸; G^x; T⁹ = Nitrogenous bases Adenine, Cytosine, Guanine e Thymine. C; D; F = Fragments of DNA strands. Arg^x; Asp^x; Met^x; Tyr^x = Amino acids residues – Enzyme topoisomerase II α .

**Fig. 08.** Structure of derivative **JF-92** with the respective modes of interaction with the DNA and topoisomerase.

spacer between the thiosemicarbazone moiety and the benzyl ring decrease the antitumor potential of these compounds. The IC₅₀ results corroborate the ones obtained in ctDNA interaction studies, which pointed the compound **JF-92** as the one with the greatest affinity to DNA interaction and second but lowest IC₅₀ value [35].

The compounds that presented lowest IC₅₀ values for cell line T-47D were **JF-85** (*p*-Fluor), **JF-86** (phenylethyl) e **JF-87** (pyridyl) (1.07, 1.12 and 1.10 μ M, respectively) demonstrating that either substitution with less voluminous atoms or non-substitution favors antitumor action for all cell lines under consideration. Furthermore,

deficiency of tumoral protein p53 (directly involved in the process of DNA repairing and survival) in T-47D lines can enhance its sensitivity to cell death induction by these derivatives [73].

2.6. Human topoisomerase inhibition

Topoisomerase is an important enzyme for cell proliferation because it works both in the DNA replication and its transcription. There are six types of topoisomerase (IA, IB and IIA) that are responsible either for the cleavage of a DNA chain or breaks in the double helix and formation of the TOP-DNA cleavage complex. Regarding the action of anticancer drugs, inhibiting Topo II is greatly relevant as the irreversible cleavage of the double helix triggers apoptosis in tumoral cells. In the absence of the compounds, the topoisomerase enzyme is able to exert its function by relaxing the DNA double strand. Therefore, drugs that bind to the same site of this enzyme in the DNA can interfere in its catalytical activity. Thus, when there is inhibition of the enzyme, the band of the supercoiled DNA can be visualized [16,35,74,75]. The inhibition for topoisomerase II α by derivatives **JF**'s was analyzed as shown in Fig. 11.

According to Fig. 11, derivatives **JF-85**, **JF-88**, **JF-89**, **JF-93**, **JF-94**, **JF-95** and **JF-96** were capable of inhibiting enzyme activity at 10 μ M concentration. In the topoisomerase assays, greater inhibition of the enzyme, caused by most of the compounds over the *m*-Amsa positive control, was observed and the reduction of the amsacrine ring to the quinoline ring was found to be important for the better inhibition of topoisomerase. We also note the importance of some substituents in the aforementioned derivatives. The halogen substituents present in the compounds **JF-85**, **JF-88** and **JF-93**, impart a positive electron and hydrophobic character ($+\sigma +\pi$), influencing the higher inhibition of the enzyme. These results corroborate with

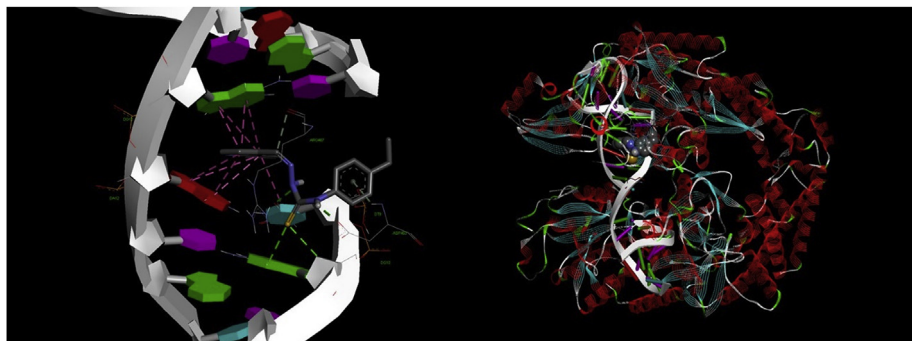
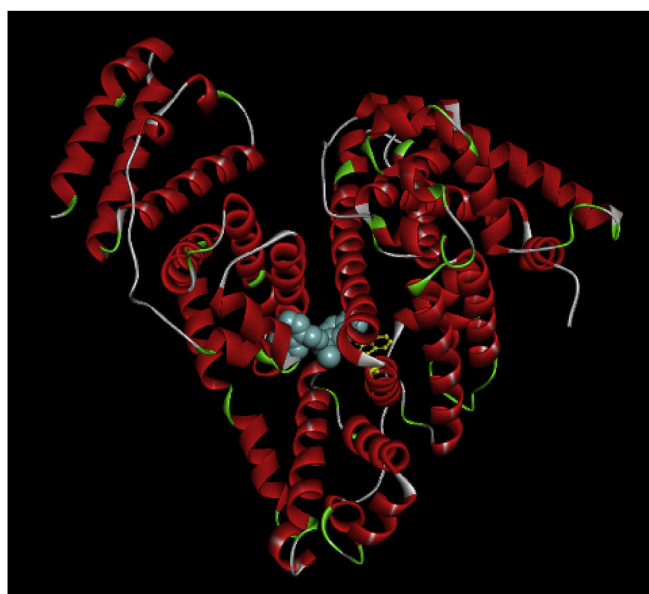
**Fig. 09.** Representation of the binding complex between **JF-92** and DNA + topoisomerase II α with the respective types of interactions.

Table 05Series of **JF**'s ligands for BSA by molecular docking.

Ligands	Binding energy (kcal/mol)	Conventional Hydrogen bond	Hydrophobic interactions		
			π -alkyl/alkyl	π -sigma	Stacked π - π
JF-85	−9.21	Arg ¹⁹⁴ Ser ³⁴³ Arg ⁴⁸⁴ Asp ⁴⁵⁰	Arg ¹⁹⁴ Val ³⁹² Arg ⁴⁸³ Leu ⁴⁵⁶ Val ⁴⁸¹	—	—
JF-86	−9.03	Ala ²⁰⁹	Ala ²⁰⁹ Lis ³⁵⁰ Val ⁴⁸¹ Leu ⁴⁸⁰ Leu ¹⁹⁷ Arg ¹⁹⁸	Val ³⁴² Leu ¹⁹⁷	—
JF-87	−9.42	Ser ³⁹³ Asp ⁴⁵⁰	Arg ⁴⁸³ Arg ⁴⁸⁴ Leu ⁴⁸⁰ Val ³⁴²	—	—
JF-88	−8.64	Ser ³⁴³	Arg ¹⁹⁸ Arg ¹⁹⁴ Val ³⁴² Leu ¹⁹⁷ Leu ³⁴⁶ Ala ²⁰⁹ Val ⁴⁸¹ Ala ²¹²	Leu ¹⁹⁷ Leu ³⁴⁶ Leu ⁴⁸⁰	—
JF-89	−9.90	Ser ³⁹³	Ala ²⁰⁹ Ala ²¹² Val ⁴⁸¹ Val ³⁴² Leu ⁴⁸⁰ Leu ³⁴⁶ Arg ¹⁹⁸	Leu ³⁴⁶ Leu ⁴⁸⁰ Leu ¹⁹⁷	Trp ²¹³
JF-90	−11.51	Ala ²⁰⁹ Ser ²⁰¹ Val ⁴⁸¹	Leu ⁴⁸⁰ Leu ³⁴⁶ Ala ²⁰⁹ Arg ¹⁹⁸ Val ³⁴² Val ⁴⁸¹	Leu ¹⁹⁷	Trp ²¹³ ; Phe ²⁰⁵
JF-91	−8.88	Ser ³⁴³ Asp ⁴⁵⁰	Arg ⁴⁸³ Arg ⁴⁸⁴ Trp ²¹³ Leu ⁴⁸⁰ Arg ¹⁹⁴ Leu ¹⁹⁷ Val ⁴⁸¹ Arg ¹⁹⁸	Leu ¹⁹⁷	Trp ²¹³
JF-92	−9.28	Ser ³⁴³ Asp ⁴⁵⁰	Arg ⁴⁸³ Arg ⁴⁸⁴ Arg ¹⁹⁴ Trp ²¹³ Val ³⁴² Leu ⁴⁵⁶	Leu ¹⁹⁷	—
JF-93	−8.87	—	Trp ²¹³ Arg ¹⁹⁸ Arg ¹⁹⁴ Arg ⁴⁸³ Arg ⁴⁸⁴ Leu ⁴⁵⁶ Leu ¹⁹⁷	Leu ¹⁹⁷ Arg ⁴⁸³	—
JF-94	−9.44	Ala ²⁰⁹ Ser ²⁰¹	Leu ⁴⁸⁰ Val ⁴⁸¹ Ala ²⁰⁹ Arg ¹⁹⁴ Arg ¹⁹⁸ Val ³⁴²	Phe ²⁰⁵ Leu ¹⁹⁷	Trp ²¹³ ; Phe ²⁰⁵
JF-95	−7.58	Arg ⁴⁸⁴ Ser ³⁴³ Asp ⁴⁵⁰	Leu ⁴⁸⁰ Arg ⁴⁸³ Leu ⁴⁵⁶ Val ⁴⁸¹	—	—
JF-96	−9.20	Arg ⁴⁸⁴ Ser ³⁴³ Asp ⁴⁵⁰	Leu ⁴⁸⁰ Leu ¹⁹⁷ Arg ¹⁹⁴ Val ⁴⁸¹ Arg ⁴⁸³	Leu ¹⁹⁷ Leu ⁴⁵⁴	Trp ²¹³

**Fig. 10.** Structure of the BSA in complex with the **JF-92** ligand (blue) (Trp²¹³ indicated in yellow). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

those obtained by Gouveia et al. [16], in which AMTAC-06 and AMTAC-07, which showed the highest inhibition of the enzyme, have Chlorine and Fluorine atoms, respectively, at the *para* position of the phenyl ring of lateral chain of acridine derivatives.

The hydrophobic substituents ($+\pi$) present in the compounds **JF-89**, **JF-95** and **JF-96** also contributed to the inhibitory activity improvement. However, this feature is not the only primordial element for an anti-topoisomerase activity. The methoxy group, present in the derivative **JF-94**, exerting a positive electronic effect on the structure, also contributed to the better inhibition, as also seen in the work of Almeida et al. [8], whose best compound with antiproliferative action associated with topoisomerase inhibition was AMTAC-02 substituted with this same group at the *para* position.

Table 06Values of CC₅₀ and IC₅₀ (in μ M) for the **JF**'s compounds tested in the untransformed lines and tumor lines, respectively.

Compound	Macrophages RAW 264.7	MCF-7	SI	T-47D	SI
JF-85	45.87	1.10 $\pm$ 0.2	41.7	1.07 $\pm$ 0.1	42.87
JF-86	32.97	1.09 $\pm$ 0.2	30.25	1.12 $\pm$ 0.2	29.44
JF-87	91.61	0.97 $\pm$ 0.1	94.44	1.10 $\pm$ 0.0	83.28
JF-88	63.47	1.07 $\pm$ 0.0	59.32	1.27 $\pm$ 0.2	49.98
JF-89	22.55	0.88 $\pm$ 0.3	25.62	1.21 $\pm$ 0.2	18.64
JF-90	82.49	0.81 $\pm$ 0.3	101.84	1.33 $\pm$ 0.4	62.02
JF-91	50.52	0.98 $\pm$ 0.2	51.55	1.32 $\pm$ 0.3	38.27
JF-92	35.72	0.82 $\pm$ 0.4	43.56	1.28 $\pm$ 0.3	27.91
JF-93	53.54	0.99 $\pm$ 0.1	54.08	1.48 $\pm$ 0.0	36.18
JF-94	101.4	0.99 $\pm$ 0.1	102.42	1.36 $\pm$ 0.2	74.56
JF-95	105.23	0.97 $\pm$ 0.3	108.48	1.23 $\pm$ 0.0	85.55
JF-96	118.00	1.07 $\pm$ 0.2	110.28	1.38 $\pm$ 0.1	85.51
m-Amsa	95.5	0.91 $\pm$ 0.2	104.94	0.94 $\pm$ 0.2	101.60
Asulacrine	31.17	—	—	—	—

The substitution at the ring *para* position improves this activity since **JF-86** and **JF-87** derivatives have not shown to be promising in this assay. The positive electronic effect of compound **JF-90** nitro-group did not favor the activity in this class of molecules, possibly due to the lower hydrophobicity and greater electronic effect, compared to the other compounds. Derivatives that showed great cytotoxic activity in tumoral cells but little or no topoisomerase inhibition, such as **JF-91** and **JF-92**, are justified by the presence of another antitumoral action mechanism, thus allowing their consideration as promising for anticancer treatment after future investigations.

3. Conclusion

Quinoline-thiosemicarbazone derivatives were successfully synthesized and their chemical structures dutifully assessed. All **JF**'s compounds displayed potential for DNA and BSA binding as well as cytotoxic activity regarding tumoral cell lines MCF-7 and T-47D. Derivative **JF-92** was highlighted as it displayed greater potential for DNA and BSA binding through Kb and Ksv values, respectively, attesting a likely mechanism of interaction to DNA by intercalation, verified through absorption techniques, CD and

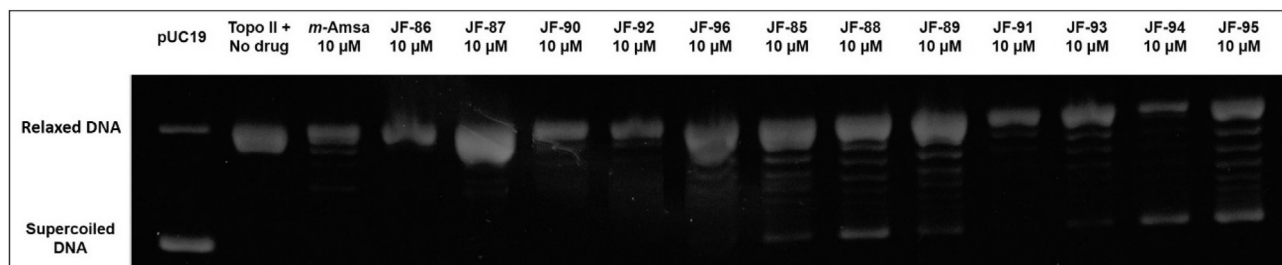


Fig. 11. Effect of JF's derivatives and *m*-Amsa on the inhibition of human topoisomerase II α .

molecular docking. Furthermore, this derivative showed smaller IC₅₀ value for lines MCF-7 (0.82 μ M) and it partially inhibited topoisomerase II α , thus being considered an interfacial antitumoral inhibitor. We also conclude that the interaction mechanism of these derivatives to DNA varies according to electronic and lipophilic properties of the substituent groups and that lipophilic properties influence positively for better interactions with BSA. These results suggest that DNA binding potential is not the only reason for antitumoral effect and that reduction of the acridine ring did not disrupt the antitumor action. Besides the substitution patterns are important for both topoisomerase inhibition and bio-macromolecule interaction affinity. Therefore, different action mechanisms can induce the observed cytotoxic effects, which will be investigated farther on.

4. Experimental protocols

4.1. Chemical and interaction analysis

To analyse the synthesized compounds, thin layer chromatography was performed (TLC) using Polygram Sil G/UV 254 (0.20 mm) chromatographic plates, developed under ultraviolet light at 254 nm. The melting point was determined using the dry melting point apparatus Model 431D (Fisatom, São Paulo, Brazil).

Characterization and structural verification was assessed by infrared (IR) spectroscopy Bruker IFS66 spectrometer (Bruker, Berlin, Germany), hydrogen (at 400 MHz) and carbon (100 MHz) nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR and ¹³C NMR), respectively, using the Varian Plus spectrophotometer (Varian, Santa Clara, CA, USA); DMSO-*d*₆ solvent and mass spectrometry (MALDI-TOF) Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The coupling constants (*J*) were reported in Hertz (Hz) and chemical shifts were reported in δ units. The multiplicities were given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet).

UV–Vis spectra were measured on an Ultraspec 3000 PRO UV–Visible spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), the fluorescence spectra on a JASCO FP-6300 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) spectrofluorometer and Circular Dichroism on a JASCO J-815 CD spectrometer (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

4.2. Preparation of the thiosemicarbazones derivatives

The starting thiosemicarbazides (*N*-(4-fluorophenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-phenethylhydrazinecarbothioamide; *N*-(pyridin-3-yl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(4-chlorophenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(4-nitrophenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(*p*-toluyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(4-ethylphenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(4-bromophenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-(4-methoxyphenyl)hydrazinecarbothioamide; *N*-allyl-2-(quinolin-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide; *N*-phenylhydrazinecarbothioamide) were

prepared based on protocols by Gursoy et al. [24] and Liesen et al. [25].

The synthesized thiosemicarbazides and the reagent 4-quinoline-carboxaldehyde supplied by Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) were used for the synthesis of the quinoline-thiosemicarbazones derivatives, which were refluxed in ethanol (10 mL) in the presence of acetic acid (30 drops) at 37 °C for 2 h. Afterwards, the mixture was filtered and washed with water.

4.2.1. *N*-(4-fluorophenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (JF-85)

C₁₇H₁₃FN₄S; Yield: 84.31%; Melting point: 186–187 °C; Rf: 0.47 (*n*-hexane/EtOAc 6:4).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.23 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH phenyl), 7.58 (dd, *J*₁ = 5.2 Hz/*J*₂ = 4.8 Hz, 2H, CH phenyl), 7.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 7.82 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.27 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.36 (d, *J* = 4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.97 (d, *J* = 4 Hz, 1H, CH quinoline), 9.02 (s, 1H, HC=N), 10.35 (s, 1H, NH), 12.10 ppm (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 117.71 (CH quinoline), 122.67 (CH quinoline), 125.17 (Cq quinoline), 127.37 (CH quinoline), 128.20 (phenyl), 129.53 (CH quinoline), 129.85 (CH quinoline), 135.25 (phenyl), 137.12 (Cq quinoline), 138.01 (HC=N), 148.36 (Cq quinoline), 150.05 (CH quinoline), 158.58 (phenyl), 160.99 (phenyl), 176.82 ppm (C=S).

IR: 3349, 3143 and 2969 cm⁻¹ (NH); 1514 (C=N); 1086 (C–S).

MS [*M* + 1]: calculated: 325.0879; found: 325.0907.

4.2.2. *N*-phenethyl-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (JF-86)

C₁₉H₁₈N₄S; Yield: 77.57%; Melting point: 192–194 °C; Rf: 0.60 (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.95 (t, *J* = 8 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (m, 2H, CH₂), 7.23 (t, *J* = 7 Hz, 1H, CH phenyl), 7.31 (m, 4H, CH phenyl), 7.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 7.82 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.09 (d, *J* = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.13 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.79 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 11.79 ppm (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.65 (CH₂), 45.16 (CH₂), 117.50 (CH quinoline), 122.81 (CH quinoline), 125.03 (Cq quinoline), 126.18 (CH phenyl), 127.35 (CH quinoline), 128.43 (CH phenyl), 128.57 (CH phenyl), 129.55 (CH quinoline), 129.82 (CH quinoline), 137.21 (HC=N), 137.36 (Cq quinoline), 139.12 (Cq phenyl), 148.36 (Cq quinoline), 150.03 (CH quinoline), 177.23 ppm (C=S).

IR: 3464, 3338 and 3165 cm⁻¹ (NH); 1529 (C=N); 1083 (C–S).

MS [*M* + 1]: calculated: 335.1286; found: 335.1300.

4.2.3. *N*-(pyridin-3-yl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (JF-87)

C₁₆H₁₃N₅S; Yield: 80.92%. Melting point: 216–218 °C; Rf: 0.55 (Chloroform 100%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.44 (dd, J_1 = 8.0 Hz/ J_2 = 4.8 Hz, 1H, CH phenyl), 7.74 (dd, J_1 = 8.0 Hz/ J_2 = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 7.83 (dd, J_1 = 8.0 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH phenyl), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.34 (d, J = 3.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.41 (d, J = 4.4 Hz, 1H, CH phenyl), 8.70 (s, 1H), 8.97 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.02 (s, 1H, HC=N), 10.54 (s, 1H, NH), 12.20 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 117.96 (CH quinoline), 122.92 (CH quinoline), 123.18 (CH phenyl), 125.29 (Cq quinoline), 127.60 (CH quinoline), 129.78 (CH quinoline), 129.92 (CH quinoline), 133.79 (CH phenyl), 135.88 (Cq phenyl), 137.23 (Cq quinoline), 138.78 (HC=N), 146.44 (CH phenyl), 147.40 (CH phenyl), 148.44 (Cq quinoline), 150.20 (CH quinoline), 177.28 ppm (C=S).

IR: 3130 and 2947 cm^{-1} (NH); 1507 (C=N); 1087 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 308.0925; found: 308.0940.

4.2.4. *N*-(4-chlorophenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-88**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$; Yield: 67.85%; Melting point: 194–196 °C; Rf: 0.48 (*n*-hexane/EtOAc 6:4).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.45 (d, J = 7.6 Hz, 2H, CH phenyl), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 2H, CH phenyl), 7.74 (dd, J_1 = 8 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 7.83 (dd, J_1 = 8 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.10 (d, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.36 (d, J = 3.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.97 (d, J = 4 Hz, 1H, CH quinoline), 9.02 (s, 1H, HC=N), 10.38 (s, 1H, NH), 12.14 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 117.80 (CH quinoline), 122.70 (CH quinoline), 125.17 (Cq quinoline), 127.42 (CH quinoline), 127.60 (CH phenyl), 128.04 (CH phenyl), 129.59 (Cq phenyl), 129.59 (CH quinoline), 129.87 (CH quinoline), 137.08 (Cq quinoline), 137.91 (Cq phenyl), 138.29 (HC=N), 148.36 (Cq quinoline), 150.09 (CH quinoline), 176.49 ppm (C=S).

IR: 3330, 3140 and 2992 cm^{-1} (NH); 1539 (C=N); 1092 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 341.0583; found: 341.0590.

4.2.5. *N*-(naphthalen-1-yl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-89**)

$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$; Yield: 73.49%; Melting point: 200–202 °C; Rf: 0.56 (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.56 (m, 4H, CH naftil), 7.75 (t, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 7.84 (t, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 7.90 (m, 2H, CH naftil), 8.00 (m, 1H, CH naftil), 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.43 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.95 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.08 (s, 1H, HC=N), 10.66 (s, 1H, NH), 12.18 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 117.76 (CH quinoline), 122.74 (CH quinoline), 123.30 (naftil), 125.20 (Cq quinoline), 125.43 (CH naftil), 126.06 (CH naftil), 126.14 (CH naftil), 126.40 (CH naftil), 127.07 (CH naftil), 127.36 (CH quinoline), 128.01 (CH naftil), 129.52 (CH quinoline), 129.87 (CH quinoline), 130.45 (Cq naftil), 133.70 (Cq naftil), 135.54 (Cq naftil), 137.26 (Cq quinoline), 137.79 (HC=N), 148.39 (Cq quinoline), 150.09 (CH quinoline), 178.22 ppm (C=S).

IR: 3244, 3131 and 2993 cm^{-1} (NH); 1520 (C=N); 1087 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 357.1129; found: 357.1120.

4.2.6. *N*-(4-nitrophenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-90**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$; Yield: 82.21%; Melting point: 225–227 °C; Rf: 0.42 (*n*-hexane/EtOAc 6:4).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.74 (dd, J_1 = 8 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 7.83 (dd, J_1 = 8.0 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.07 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH phenyl), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.27 (d, J = 8.0 Hz, 2H, CH phenyl), 8.28 (d, J = 7.2 Hz, 1H,

CH quinoline), 8.34 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.0 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.05 (s, 1H, HC=N), 10.65 (s, 1H, NH), 12.40 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 118.03 (CH quinoline), 122.75 (CH quinoline), 123.77 (phenyl), 124.68 (phenyl), 125.16 (Cq quinoline), 127.49 (CH quinoline), 129.62 (CH quinoline), 129.89 (CH quinoline), 136.87 (Cq quinoline), 139.32 (HC=N), 143.68 (phenyl), 145.20 (phenyl), 148.36 (Cq quinoline), 150.11 (CH quinoline), 175.92 ppm (C=S).

IR: 3292 and 3082 cm^{-1} (NH); 1544 (C=N); 1093 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 352.0824; found: 352.0830.

4.2.7. 2-(quinoline-4-ylmethylene)-*N*-(*p*-toluyl)hydrazinecarbothioamide (**JF-91**)

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$; Yield: 78.41%; Melting point: 197–199 °C; Rf: 0.51 (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.32 (s, 3H, CH_3), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH phenyl), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH phenyl), 7.74 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 7.83 (d, J = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.09 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.39 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.96 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.01 (s, 1H, HC=N), 10.28 (s, 1H, NH), 12.02 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 20.58 (CH_3), 117.71 (CH quinoline), 122.67 (CH quinoline), 125.17 (Cq quinoline), 125.92 (CH phenyl), 127.36 (CH quinoline), 128.59 (CH phenyl), 129.53 (CH quinoline), 134.76 (Cq phenyl), 136.36 (Cq phenyl), 137.18 (Cq quinoline), 137.71 (HC=N), 148.37 (Cq quinoline), 150.09 (CH quinoline), 176.50 (C=S).

IR: 3322 and 3210 cm^{-1} (NH); 1540 (C=N); 1075 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 321.1129; found: 321.1130.

4.2.8. *N*-(4-ethylphenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-92**)

$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}$; Yield: 69.99%; Melting point: 200–202 °C; Rf: 0.59 (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.2 (t, J = 7.6 Hz, 3H, CH_3), 2.63 (q, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 7.23 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH phenyl), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 2H, CH phenyl), 7.73 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 7.82 (t, J = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.27 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.37 (d, J = 3.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.96 (d, J = 4.4 Hz, 1H, CH quinoline), 9.02 (s, 1H, HC=N), 10.28 (s, 1H, NH), 12.04 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 15.65 (CH_3), 27.71 (CH_2), 117.72 (CH quinoline), 122.67 (CH quinoline), 125.17 (Cq quinoline), 125.95 (CH phenyl), 127.36 (CH quinoline), 127.40 (CH phenyl), 129.52 (CH quinoline), 129.86 (CH quinoline), 136.54 (Cq phenyl), 137.18 (Cq quinoline), 137.73 (HC=N), 141.14 (Cq phenyl), 148.36 (Cq quinoline), 150.06 (CH quinoline), 176.44 ppm (C=S).

IR: 3295, 3186 and 2969 cm^{-1} (NH); 1551 (C=N); 1088 (C-S).

MS [$M + 1$]: calculated: 335.1286; found: 335.1310.

4.2.9. *N*-(4-bromophenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-93**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{S}$; Yield: 91.02%; Melting point: 209–211 °C; Rf: 0.45 (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.58 (s, 4H, CH phenyl), 7.74 (d, J = 6.8 Hz, 1H, CH quinoline), 7.81 (d, J = 6.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.11 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.26 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.35 (s, 1H, CH quinoline), 8.97 (s, 1H, CH quinoline), 9.03 (s, 1H, HC=N), 10.37 (s, 1H, NH), 12.15 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 117.78 (phenyl), 117.83 (CH quinoline), 122.68 (CH quinoline), 125.96 (Cq quinoline), 127.39 (CH quinoline), 127.88 (phenyl), 129.55 (Cq quinoline), 129.86 (CH quinoline), 130.95 (phenyl), 137.05 (Cq quinoline), 138.30 (HC=N),

138.33 (phenyl), 148.36 (Cq quinoline), 150.06 (CH quinoline), 176.38 ppm (C=S).

IR: 3302 and 3082 cm^{-1} (NH); 1527 (C=N); 1095 (C-S).

MS [M + 1]: calculated: 385.0078; found: 385.0130.

4.2.10. N-(4-methoxyphenyl)-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-94**)

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$; Yield: 79.68%; Melting point: 203–205 °C; Rf: 0.40 (n-hexane/EtOAc 6:4).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 3.78 (s, 3H, CH_3), 6.95 (d, J = 9.2 Hz, 2H, CH phenyl), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 2H, CH phenyl), 7.73 (t, J = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 7.82 (t, J = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 8.10 (d, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.37 (d, J = 4.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.96 (d, J = 4.8 Hz, 1H, CH quinoline), 9.01 (s, 1H, HC=N), 10.25 (s, 1H, NH), 12.00 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 55.23 (CH_3), 113.35 (phenyl), 117.68 (CH quinoline), 122.68 (CH quinoline), 125.18 (Cq quinoline), 127.35 (CH quinoline), 127.62 (phenyl), 129.53 (CH quinoline), 129.86 (CH quinoline), 131.79 (phenyl), 137.22 (Cq quinoline), 137.60 (HC=N), 148.36 (Cq quinoline), 150.06 (CH quinoline), 157.11 (phenyl), 176.78 ppm (C=S).

IR: 3316 and 3302 cm^{-1} (NH); 1549 (C=N); 1085 (C-S).

MS [M + 1]: calculated: 337.1078; found: 337.1080.

4.2.11. N-allyl-2-(quinolin-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-95**)

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{S}$; Yield: 78.50%; Melting point: 199–200 °C; Rf: 0.54 (n-hexane/EtOAc 6:4).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 4.27 (s, 2H, CH_2), 5.12 (d, J = 10.4 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 5.20 (d, J = 17.6 Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 5.93 (m, 1H, HC=C), 7.71 (t, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 7.81 (t, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.08 (d, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.24 (d, J = 4.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.24 (d, J = 8 Hz, 1H, CH quinoline), 8.93 (s, 2H, HC=N/NH), 8.95 (d, J = 4.4 Hz, 1H, CH quinoline), 11.80 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 45.91 (CH_2), 115.62 (CH_2), 117.44 (CH quinoline), 122.69 (CH quinoline), 125.08 (Cq quinoline), 127.29 (CH quinoline), 129.50 (CH quinoline), 129.82 (CH quinoline), 134.75 (HC=C), 137.18 (Cq quinoline), 137.33 (CH HC=N), 148.35 (Cq quinoline), 150.01 (CH quinoline), 177.49 ppm (Cq C=S).

IR: 3377 and 3202 cm^{-1} (NH); 1524 (C=N); 1083 (C-S).

MS [M + 1]: calculated: 271.0973; found: 271.1150.

4.2.12. N-phenyl-2-(quinoline-4-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (**JF-96**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$; Yield: 65.70%; Melting point: 200–201 °C; Rf: 0.41 (n-hexane/EtOAc 6:4).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.24 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH phenyl), 7.40 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH phenyl), 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 2H, CH phenyl), 7.74 (dd, J_1 = 8.0 Hz/ J_2 = 7.2 Hz, 1H, CH quinoline), 7.83 (t, J = 7.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.10 (d, J = 8.0 Hz, 1H, CH quinoline), 8.28 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH quinoline), 8.37 (d, J = 3.6 Hz, 1H, CH quinoline), 8.97 (d, J = 4.0 Hz, 1H, CH quinoline), 9.02 (s, 1H, HC=N), 10.33 (s, 1H, NH), 12.06 ppm (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 117.74 (CH quinoline), 122.67 (CH quinoline), 125.14 (Cq quinoline), 125.52 (CH phenyl), 125.88 (CH phenyl), 127.33 (CH quinoline), 128.08 (CH phenyl), 129.49 (CH quinoline), 129.83 (CH quinoline), 137.11 (Cq quinoline), 137.92 (HC=N), 138.89 (Cq phenyl), 148.34 (Cq quinoline), 150.04 (CH quinoline), 176.44 ppm (C=S).

IR: 3136 and 2973 cm^{-1} (NH); 1502 (C=N); 1091 (C-S).

MS [M + 1]: calculated: 307.0973; found: 307.0950.

4.3. Preparation of the ctDNA and albumin solution

Preparation of the DNA solution involved leaving the bovine thymus DNA (ctDNA) (Sigma Aldrich) for 24 h, at 20 °C in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.6). Afterwards, the solution was sonicated for 30 min and its concentration was determined using the molar extinction coefficient $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 260 nm [76]. The DNA purity was assessed by determination of the 260/280 ratio value.

Bovine Serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich) solution was also prepared in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.6) [77] at a final concentration of 1 mM.

4.4. UV-vis absorption measurements

Compounds **JF**s were dissolved in DMSO to obtain a stock concentration of 1 mM. Working solutions (concentrations 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 μM) were prepared by dilution of the stock solution in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.6).

The derivatives, in fixed concentration (30 μM), were also exposed to increasing concentrations of ctDNA (0–100 μM), and left for 10 min at room temperature. At optimum concentrations (5–40 μM), the compounds were exposed to BSA (20 μM). The system was stirred and left for 10 min at room temperature. Measurements of the BSA-compound and ctDNA-compound solutions were performed in a rectangular quartz cuvette with a path length of 1 cm.

The intrinsic binding constant (K_b) was obtained by the McGee and Von Hippel equation [34]:

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

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

where, ϵ_a , ϵ_b and ϵ_f represent the apparent, bound and free extinction coefficients, respectively. The graphs of [compounds]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) versus [compounds] for albumin and [DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$) versus [DNA] were used to obtain K_b s from the slope to intercept ratio. Binding data were obtained using SigmaPlot 10.0 software.

4.5. Fluorescence measurements

Interactions of compounds **JF**s with BSA were analyzed by emission spectras in the region of 310–400 nm using an excitation wavelength of 285 nm, with excitation (2.5 nm) and emission bands (2 and 5 nm), at increasing concentrations of the derivatives (5–40 μM) and fixed concentration of BSA (10 μM). Fluorescence titrations were performed by adding increasing amounts of ctDNA (0–100 μM) in the presence of the derivatives (concentration of 10 μM).

All measurements were performed at 25 °C in a rectangular quartz cuvette with a path length of 1 cm. Fluorescence intensities of the compounds exposed to different concentrations of ctDNA were used to calculate the Stern-Volmer constant (K_{sv}), by the following equation Lakowicz [62]:

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

where F_0 and F represent the steady state fluorescence intensities of compounds in the absence and presence of ctDNA and compounds, K_{sv} is the Stern-Volmer constant, and $[Q]$ is the concentration of inhibitor. Binding data were obtained using SigmaPlot 10.0 software.

4.6. Circular Dichroism measurements

Initially, the derivatives **JF**s were dissolved in DMSO at a stock solution of 1 mM and the working solutions diluted in Tris HCl buffer (0.1 M, pH 7.5). Final solutions of ctDNA (100 μM) and

compounds (30 μ M) were shaken and left for 10 min at room temperature. Measurements were performed in the range of 230–400 nm, with a speed of 100 nm/min and 1 nm light beam band using a rectangular quartz cuvette. Binding data were obtained using SigmaPlot 10.0 software.

4.7. Viscosity measurements

Hidrodynamic viscosity technique elucidates the binding mode of JF's derivatives to DNA. Salmon sperm solution (ssDNA) was prepared at 100 μ M concentrations and JF's compounds at concentrations of 0, 12, 24, 36, 48 and 60 μ M. The same concentrations were used for *m*-AMSA solutions to define them as intercalation patten and compare the remaining compounds used in this study. This would enable the definition of the binding mode of the ligands to DNA. Viscosity readings were executed with the Stabinger Viscometer - Anton Paar (SVM 3000/G2) viscosimeter at 25 °C. Relative viscosity data obtained in the DNA solutions in the presence and absence of JF's derivatives and *m*-AMSA were plotted in SigmaPlot 10.0, using the formula $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus R (Relation between the concentrations of the ssDNA-ligand/concentrations of free ssDNA in which η is the viscosity of DNA in the presence of ligands and η_0 is the viscosity of DNA in their absence [78]).

4.8. Molecular modeling

4.8.1. Analysis of ADME in silico properties and molecular docking

The analysis of the ligand-receptor interactions of the compounds was performed using Autodock 4.2.6 [79] with the Lamarckian Genetic algorithm. The *absorption, distribution, metabolism and excretion* (ADME) profile of the compounds was investigated using the online platforms SwissADME [80] and pkCSM [81].

4.8.2. Preparation of ligand structures

The structures of the compounds under analyse were built in the Avogadro 1.2.0 software and completely optimized using the semi-empirical method PM6 [82] implemented in MOPAC 2016. After the optimization the structures were saved in the pdb format. Non-polar hydrogens were mixed with the equivalent carbons using AutoDockTools, and Gasteiger's charges of the atoms were calculated. The rotatable bonds of the linkers were defined and the structures were saved in the pdbqt format for use in the docking studies.

4.8.3. Preparation of topoisomerase and bovine serum albumin (BSA) structures

The structure of the topoisomerase containing the co-crystallized etoposide inhibitor (PDB code: 5GWK) and the albumin structure containing the cocrystallized naproxen binder (PDB code: 4OR0) [83,84] were selected as receivers. Using the Discovery Studio Visualizer ("Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer", 2016), the water molecules and ligands were removed. Then, the non-polar hydrogens were mixed with the respective carbon atoms using AutoDockTools and the polar hydrogens were added to the structure of the enzyme and albumin. Kollman's charges were added and the structure was saved in the pdbqt format. For topoisomerase II α , the 0.8 charge was assigned to the Mg atoms present at the receptor.

4.8.4. Docking

4.8.4.1. Topoisomerase II α in the presence of the ligands. Using AutoDockTools and AutoGrid 4.2.6, the parameters for 3D grid generation were generated. 70 $\times$ 70 $\times$ 70 grid points were created with a spacing of 0.0375 nm. The grid was centered on the position of the co-crystallized linker present in the B-chain of the protein. The Lamarckian Genetic Algorithm in AutoDock 4.2.6 was applied

in the search for the best conformation and special orientation of the ligands, using the standard search settings. During each docking experiment, 100 conformations were obtained. At the end, the conformations were grouped in RMSD (Root-Mean-Square-Deviation) clusters of 2 Å, and only conformations present in clusters with at least 10 conformations were considered for analysis, being those of lower energies. The lowest energy conformation obtained for each binder was analyzed in the AutoDockTools and Discovery Studio Visualizer programs. To validate the docking procedure, the docking calculation of the co-crystallized ligand Etoposide was previously performed.

4.8.4.2. BSA in the presence of the binders. The albumin protein has more than one possible binding site. The main hydrophobic sites for aromatic and/or heterocyclic compounds are site I, located in subdomain IIA and site 2, located in subdomain IIIA [85]. Using AutoDockTools and AutoGrid 4.2.6, the parameters for 3D grid generation were generated. 126 $\times$ 126 $\times$ 126 grid points were created with a spacing of 0.0375 nm. The first grid was centered on the position of the co-crystallized linker present at the I site of the A chain of the protein. The second, at the position of the co-crystallized linker present at the II site of the A chain of the protein. The Lamarckian Genetic Algorithm in AutoDock 4.2.6 was applied in the search for the best conformation and special orientation of the ligands, using the standard search settings. During each docking experiment, 100 conformations were obtained and analyzed. At the end, the lowest energy conformation obtained for each binder was considered and analyzed in the AutoDockTools and Discovery Studio Visualizer programs.

4.9. Cell viability of breast cancer and macrophages cells

Epithelial-like breast cancer cells (MCF-7 and T-47 D) were maintained in RPMI-1640 with 10% FBS, 1% GlutaMax-I (100X) and 1% Penicillin and streptomycin.

For cell viability assays were used 1 $\times$ 10⁴ (MCF-7) and 2 $\times$ 10⁴ (T-47D) cells/well. The experimental conditions comprised compounds JF's in four different concentrations - 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M and 100 μ M, and incubated for 48 h (based on the NCI60 protocol) in a 5% CO₂ humidified chamber. For macrophage RAW 264.7 cell cytotoxicity, the concentrations from 6.125 to 200 μ M were used in the same conditions of temperature and CO₂.

Cell viability was assessed with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Briefly, MTT solution was added to each well to a final concentration of 5 mg/mL and incubated for 3 h. The formed formazan crystals were dissolved with DMSO, until complete dissolution. Absorbance was read at 575 nm with plate reader Varioskan. The experiment was done in triplicate and the IC₅₀ values obtained through non-linear regression using the software GraphPad Prism 7. The selectivity index for each compound in each of the lines was calculated from the ratio between CC₅₀ and IC₅₀ (CC₅₀/IC₅₀).

4.10. Human topoisomerase II α inhibition assay

Inhibition of the II α topoisomerase activity by derivatives JF's was determined using 100 ng of plasmid pUC19 DNA and recombinant human II α units (P170) in relaxation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP and 0.5 mM dithiothreitol) [7,8]. The derivatives were incubated for 45 min, at 37 °C at the concentration of 10 μ M and the same concentration of *m*-AMSA was used as positive control. Agarose gel electrophoresis (0.8%) was used to assessed the inhibition of the topoisomerase II α , with ethidium bromide, and the bands visualized under UV light. Qualitative analysis of these bands (supercoated and relaxed DNA)

was performed using image processing software (Adobe Photoshop CS4 11.0 × 2007, San Jose, CA, USA).

Acknowledgments

Authors are thankful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, grant number 407355/2016-2), CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Brazil, Finance Code 001), and FACEPE (Fundo de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brazil, grant number 1133-2.07/2012) for financial support.

Supporting information

Images of the supporting information refer to ¹H NMR, ¹³C NMR and Infrared spectra which contributed to the interpretation of the twelve compounds in the series studied. Also spectra of UV–Visible Absorption and Fluorescence of the other derivatives with DNA and BSA will be found.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111592>.

References

- [1] National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva, Chemotherapy, 2019. Seen in 15 abr. 2018, http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101. (Accessed 15 April 2018).
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [3] R. Kumar, A. Sharma, S. Sharma, O. Silakari, M. Singh, M. Kaur, Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S956–S963.
- [4] J.F. Oliveira, A.L. Silva, D.B. Vendramini-Costa, C.A.C. Amorim, J.F. Campos, A.G. Ribeiro, R.O. Moura, J.L. Neves, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima, Synthesis of Thiophene-thiosemicarbazone derivatives and Evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities, *Eur. J. Med. Chem.* 104 (2015) 148–156.
- [5] A.Q. Ali, S.G. Teoh, A. Salhin, N.E. Eltayeb, M.B.K. Ahamed, A.M.S.A. Majid, Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: *in vitro* anti-cancer, DNA binding and cleavage activities, *Spectrochim. Acta, Part A* 125 (2014) 440–448.
- [6] J.F. Oliveira, T.S. Lima, D.B. Vendramini-Costa, S.C.B.L. Pedrosa, E.A. Lafayette, R.M.F. Silva, S.M.V. Almeida, R.O. Moura, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima, Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay, *Eur. J. Med. Chem.* 136 (2017) 305–314.
- [7] S.M.V. Almeida, E.A. Lafayette, L.P.B. Gomes da Silva, C.A.C. Amorim, T.B. Oliveira, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I.C. Beltrão, M.C.A. Lima, L.B. Carvalho Júnior, Synthesis, DNA binding, and Antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 13023–13042.
- [8] S.M.V. Almeida, E.A. Lafayette, W.L. Silva, V.L. Serafim, T.M. Menezes, J.L. Neves, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I.C. Beltrão, L.B.C. Junior, M.C.A. Lima, New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016) 467–475.
- [9] E.J. Barreiro, Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo, *Quim. Nova* 25 (2002) 1172–1180.
- [10] L.M. Lima, Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira, *Quim. Nova* 30 (2007) 1456–1468.
- [11] C.V. Júnior, V.S. Bolzani, E.J. Barreiro, Os produtos naturais e a química medicinal moderna, *Quim. Nova* 29 (2006) 326–337.
- [12] R. Ghodsi, E. Azizi, A. Zarghi, Design, synthesis and biological evaluation of 4-(imidazolylmethyl)-2-(4-methylsulfonyl phenyl)-quinoline derivatives as selective COX-2 inhibitors and *in vitro* anti-breast cancer agents, *Iran. J. Pharm. Res.* 15 (2016) 169–177.
- [13] H.-H. Kuo, R. Kakadiya, Y.-C. Wu, T.-L. Su, T.-C. Lee, Y.-W. Lin, L.-H. Yih, Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis, *Oncotarget* 7 (2016) 38078–38090.
- [14] D.K. Yadav, R. Rai, N. Kumar, S. Singh, S. Misra, P. Sharma, P. Shaw, H. Pérez-Sánchez, R.L. Mancera, E.H. Choi, M.-h. Kim, R. Pratapb, New arylated benzo[h]quinolines induce anticancer activity by oxidative stress-mediated DNA damage, *Sci. Rep.* 6 (2016) 38128.
- [15] S.O. Malayeri, K. Abnous, A. Arab, M. Akaberi, S. Mehri, A. Zarghi, R. Ghodsi, Design, synthesis and biological evaluation of 7-(aryl)-2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-g]quinoline derivatives as potential Hsp90 inhibitors and anti-cancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 1294–1302.
- [16] R.G. Gouveia, A.G. Ribeiro, M.A.S.P. Segundo, J.F. Oliveira, M.C.A. Lima, T.R.C.L. Souza, S.M.V. Almeida, R.O. Moura, Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 26 (2018) 5911–5921.
- [17] K.N.A. Rahman, J. Haribabu, C. Balachandran, N.S.P. Bhuvanesh, R. Karvembu, A. Sreekanth, Copper, nickel and zinc complexes of 3-acetyl coumarin thiosemicarbazone: synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of cytotoxicity and DNA/protein binding properties, *Polyhedron* 135 (2017) 26–35.
- [18] M. Ishtikhar, G. Rabbani, R.H. Khan, Interaction of 5-fluoro-5'-deoxyuridine with human serum albumin under physiological and non-physiological condition: a biophysical investigation, *Colloids Surf., B* 123 (2014) 469–477.
- [19] A. Bose, Interaction of tea polyphenols with serum albumins: a fluorescence spectroscopic analysis, *J. Lumin.* 169 (2016) 220–226.
- [20] C. Hebba, L. Bekale, P. Chanphai, J. Agbebi, H.A. Tajmir-Riahi, Trypsin inhibitor complexes with human and bovine serum albumins: TEM and spectroscopic analysis, *J. Photochem. Photobiol., B* 130 (2014) 254–259.
- [21] Y.-J. Hu, Y. Liu, X.-S. Shen, X.-Y. Fang, S.-S. Qu, Studies on the interaction between 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin, *J. Mol. Struct.* 738 (2005) 143–147.
- [22] M. Sedighipour, A.H. Kianfar, W.A.K. Mahmood, M.H. Azarian, Synthesis and electronic structure of novel Schiff bases Ni/Cu (II) complexes: evaluation of DNA/serum protein binding by spectroscopic studies, *Polyhedron* 129 (2017) 1–8.
- [23] P. Singla, V. Luxami, K. Paul, 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 (2016) 59–69.
- [24] A. Gürsoy, N. Terzioğlu, G. Ötük, Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials, *Eur. J. Med. Chem.* 32 (1997) 753–757.
- [25] A.P. Liesen, T.M. Aquino, C.S. Carvalho, V.T. Lima, J.M. Araújo, J.G. Lima, A.R. Faria, E.J. Melo, A.J. Alves, E.W. Alves, A.Q. Alves, A.J. Góes, Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3685–3691.
- [26] M.V. Cardoso, L.R. Siqueira, E.B. Silva, L.B. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, R.S. Ferreira, L.F. Cruz, D.R. Moreira, V.R. Pereira, M.C. Castro, P.V. Bernhardt, A.C. Leite, 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 48–59.
- [27] J.W. Espíndola, M.V. Cardoso, G.B. Filho, D.A.O. Silva, D.R. Moreira, T.M. Bastos, C.A. Simone, M.B. Soares, F.S. Villela, R.S. Ferreira, M.C. Castro, V.R. Pereira, S.M. Murta, P.A.S. Junior, A.J. Romanha, A.C. Leite, Synthesis and structure activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 818–835.
- [28] S. Halder, S. Dey, P. Roy, A quinoline based Schiff-base compound as pH sensor, *RSC Adv.* 68 (2015).
- [29] R. Kumar, P. Bhargava, R. Srivastava, P. Tyagi, Synthesis and electroluminescence properties of tris-[5-chloro-8-hydroxyquinoline] aluminum Al(5-Clq)₃, *J. Semicond.* 36 (2015).
- [30] C. Ozluur, H.E.S. Kara, *In vitro* DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques, *J. Photochem. Photobiol., B* 138 (2014) 36–42.
- [31] R. Palchaudhuri, P.J. Hergenrother, DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 497–503.
- [32] M. Mohamadi, A. Hassankhani, S.Y. Ebrahimipour, M. Torkzadeh-Mahani, *In vitro* and *in silico* studies of the interaction of three tetrazoloquinazoline derivatives with DNA and BSA and their cytotoxicity activities against MCF-7, HT-29 and DPSC cell lines, *Int. J. Biol. Macromol.* 94 (2017) 85–95.
- [33] S. Agarwal, D.K. Jangir, R. Mehrotra, Spectroscopic studies of the effects of anticancer drug mitoxantrone interaction with calf-thymus DNA, *J. Photochem. Photobiol., B* 120 (2013) 177–182.
- [34] J.D. McGhee, P.H. Von Hippel, Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Co-operative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice, *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469–489.
- [35] L. Janovec, M. Kozurkova, D. Sabolova, J. Ungvarsky, H. Paulikova, J. Plsikova, Z. Vantova, J. Imrich, Cytotoxic 3,6-bis-(imidazolidinone)iminoacridines: synthesis, DNA binding and molecular modeling, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1790–1801.
- [36] P.N. Craig, Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies, *J. Med. Chem.* 14 (1971) 680.
- [37] K. Faulhaber, A. Granzhan, H. Ihmels, D. Otto, L. Thomas, S. Wells, Studies of the fluorescence light-up effect of amino-substituted benzo[b]quinolinium derivatives in the presence of biomacromolecules, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1535–1545.
- [38] K. Karami, M. Alinaghi, Z. Amirghofran, J. Lipkowski, Synthesis and characterization of two new trans palladium (II) complexes containing benzylamine ligand: DNA/BSA interactions, molecular docking and *in vitro* cytotoxic activity, *Inorg. Chim. Acta* 471 (2017) 797–807.
- [39] E.A. Lafayette, S.M.V. Almeida, M.G.R. Pitta, E.I.C. Beltrão, T.G. Silva, R.O. Moura, I.R. Pitta, L.B.C. Júnior, M.C.A. de Lima, Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives, *Molecules* 18 (2013) 15035–15050.

- [40] N. Shankaraiah, C. Jadaia, S. Nekkanti, K.R. Senwar, N. Nagesh, S. Shrivastava, V.G. Naidu, M. Sathish, A. Kamal, Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo-b-carboline derivatives: anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies, *Bioorg. Chem.* 64 (2016) 42–50.
- [41] A. Gaál, V.G. Mihucz, S. Bösze, I. Szabó, M. Baranyi, P. Horvát, C. Strelci, N. Szoboszlai, Comparative *in vitro* investigation of anticancer copper chelating agents, *Microchem. J.* 137 (2016) 227–235.
- [42] N. Shahabadi, N.H. Moghadam, Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 99 (2012) 18–22.
- [43] X. Lang, Q. Sun, Y. Chen, L. Li, C. Tan, H. Liu, C. Gao, Y. Jiang, Novel synthetic 9-benzoyloxycridine analogue as both tyrosine kinase and topoisomerase I inhibitor, *Chin. Chem. Lett.* 24 (2013) 677–680.
- [44] M.S. Ali, M.A. Farah, H.A. Al-Lohedana, K.M. Al-Anazib, Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: a multi spectroscopic and molecular modelling study, *RSC Adv.* 8 (2018) 9083–9093.
- [45] G. Kumaravel, P.U. Ponnukalai, D. Mahendiran, N. Raman, Exploring the DNA interactions, FGF growth receptor interaction and biological screening of metal(II) complexes of NNN donor ligand derived from 2 (aminomethyl) benzimidazole, *Int. J. Biol. Macromol.* 126 (2019) 1303–1317.
- [46] Z. Mirzaei-Kalar, *In vitro* binding interaction of atorvastatin with calf thymus DNA: multispectroscopic, gel electrophoresis and molecular docking studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (2018) 31111–31117.
- [47] M. Ganeshpandian, S. Ramakrishnan, M. Palaniandavar, E. Suresh, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha, Mixed ligand copper(II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity, *J. Inorg. Biochem.* 140 (2014) 202–212.
- [48] M. Parveen, F. Ahmada, A.M. Malla, M.S. Khan, S.U. Rehmanb, M. Tabish, M.R. Silva, P.S. Silva, Structure elucidation and DNA binding specificity of natural compounds from *Cassia siamea* leaves: a biophysical approach, *J. Photochem. Photobiol., B* 159 (2016) 218–228.
- [49] D.K. Jangir, S.K. Dey, S. Kundu, R. Mehrotra, Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques, *J. Photochem. Photobiol., B* 114 (2012) 38–43.
- [50] A.C. Ketron, W.A. Denny, D.E. Graves, N. Osheroff, Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug DNA interactions, *Biochemist* 51 (2012) 1730–1739.
- [51] M.A. Husain, H.M. Ishqi, S.U. Rehman, T. Sarwar, S. Afrin, Y. Rahman, M. Tabish, Elucidating the interaction of sulindac with calf thymus DNA: biophysical and *in silico* molecular modelling approach, *New J. Chem.* 41 (2017) 14924–14935.
- [52] F.D. Sani, N. Shakibapour, S. Beigoli, H. Sadeghian, M. Hosainzadeh, J. Chamani, Changes in binding affinity between ofloxacin and calf thymus DNA in the presence of histone H1: spectroscopic and molecular modeling investigations, *J. Lumin.* 203 (2018) 599–608.
- [53] R. Eswaran, R. Bertani, P. Sgarbossa, N. Karuppannan, N.S.P. Bhuvanesh, 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 (2016) 1–8.
- [54] P. Kalaivani, R. Prabhakaran, M.V. Kaveri, R. Huang, R.J. Staples, K. Natarajan, Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium (II) complexes containing triphenylarsine, *Inorg. Chim. Acta* 405 (2013) 415–426.
- [55] R. Prabhakaran, P. Kalaivani, P. Poornima, F. Dallemer, R. Huang, V.V. Padma, K. Natarajan, Synthesis, DNA/protein binding and *in vitro* cytotoxic studies of new palladium metallo thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 6742–6752.
- [56] M. Mishra, K. Tiwari, S. Shukla, R. Mishra, V.P. Singh, Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N0-(phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, *Spectrochim. Acta: Mol. Biomol. Spectrosc.* 132 (2014) 452–464.
- [57] D.S. Raja, N.S.P. Bhuvanesh, K. Natarajan, DNA binding, protein interaction, radical scavenging and cytotoxic activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde(20-hydroxybenzoyl)hydrazide and its Cu(II) complexes: a structure activity relationship study, *Inorg. Chim. Acta* 385 (2012) 81–93.
- [58] A. Belatik, S. Hotchandani, J. Bariyanga, H.A. Tajmir-Riahi, Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins, *Eur. J. Med. Chem.* 48 (2012) 114–123.
- [59] J.G. Silva, A.A.R. Despaigne, S.R. Louro, C.C. Bandeira, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper (II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 415–426.
- [60] G. Kalaiarasi, C. Umadevi, A. Shanmugapriya, P. Kalaivani, F. Dallemer, R. Prabhakaran, DNA (CT), protein (BSA) binding studies, anti-oxidant and cytotoxicity studies of new binuclear Ni (II) complexes containing 4(N)-substituted thiosemicarbazones, *Inorg. Chim. Acta* 453 (2016) 547–558.
- [61] M. Muralisankar, S. Sujith, N.S.P. Bhuvanesh, A. Sreekanth, Synthesis and crystal structure of new monometallic and bimetallic copper(II) complexes with N-substituted isatin thiosemicarbazone ligands: effects of the complexes on DNA/protein-binding property, DNA cleavage study and *in vitro* anticancer activity, *Polyhedron* 118 (2016) 103–117.
- [62] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., Springer, New York, USA, 2006.
- [63] M. Szumilak, W. Lewgond, A. Stanczak, *In silico* ADME studies of polyamine conjugates as potential anticancer drugs, *Acta Pol. Pharm.* 73 (2016) 1191–1200.
- [64] G. Bocci, E. Carosati, P. Vayer, A. Arrault, S. Lozano, G. Cruciani, ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [65] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 4–17.
- [66] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623.
- [67] C. Lambertucci, G. Marucci, D.D. Ben, M. Buccioni, A. Spinaci, S. Kachler, K.N. Klotz, R. Volpini, New potent and selective A 1 adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 199–213.
- [68] R.V.C. Guido, A.D. Andricopulo, G. Oliva, Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas, *Estud. av. São Paulo* 24 (2010) 81–98.
- [69] E.L. Baldwin, N. Osheroff, Etoposide, topoisomerase II and cancer, *Curr. Med. Chem.* 5 (2005) 363–372.
- [70] A. Zabka, K. Winnicki, J.T. Polit, J. Maszewski, The effects of anti-DNA topoisomerase II drugs, etoposide and ellipticine, are modified in root meristem cells of *Allium cepa* by MG132, an inhibitor of 26S proteasomes, *Plant Physiol. Biochem.* 96 (2015) 72–82.
- [71] O.A. Chaves, A.P. Amorim, L.H. Castro, C.M. Sant'Anna, M.C. Oliveira, D. Cesarin-Sobrinho, J.C. Netto-Ferreira, A.B. Ferreira, Fluorescence and docking studies of the interaction between human serum albumin and pheophytin, *Molecules* 20 (2015) 19526–19539.
- [72] T. Banerjee, S.K. Singh, N. Kishore, Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: biophysical aspects, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 24147–24156.
- [73] Z. Jahanafrooz, N. Motameh, B. Bakhshandeh, Comparative evaluation of silybin effects on cell cycling and apoptosis in human breast cancer MCF-7 and T47D cell lines, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 17 (2016) 2661–2665.
- [74] W. Hu, X.-S. Huang, J.-F. Wu, L. Yang, Y.-T. Zheng, Y.-M. Shen, Z.-Y. Li, X. Li, Discovery of novel topoisomerase II inhibitors by medicinal chemistry approaches, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 8947–8980.
- [75] S.M.V. Almeida, A.G. Ribeiro, G.C.L. Silva, J.E.F. Alves, E.I.C. Beltrão, J.F. Oliveira, L.B.C. Júnior, M.C.A. Lima, DNA binding and Topoisomerase inhibition: how can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? *Biomed. Pharmacother.* 96 (2017) 1538–1556.
- [76] A. Wolfe, G.H. Shimer, T. Meehan, Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denaturated DNA, *Biochemist* 26 (1987) 6392–6396.
- [77] V.D. Suryawanshi, L.S. Walekar, A.H. Gore, P.V. Anbhule, G.B. Kolekar, Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 56–63.
- [78] G. Cohen, H. Eisesberg, Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes, *Biopolymers* 8 (1969) 45–55.
- [79] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (16) (2009) 2785–2791.
- [80] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42717.
- [81] D.E.V. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures, *J. Med. Chem.* 58 (9) (2015) 4066–4072.
- [82] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements, *J. Mol. Model.* 13 (12) (2007) 1173–1213.
- [83] Y.R. Wang, S.F. Chen, C.C. Wu, Y.W. Liao, T.S. Lin, K.T. Liu, Y.S. Chen, T.K. Li, T.C. Chien, N.L. Chan, Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry, *Nucleic Acids Res.* 45 (18) (2017) 10861–10871.
- [84] A. Bujacz, K. Zielinski, B. Sekula, Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen, *Proteins* 82 (9) (2014) 2199–2208.
- [85] J. Jayabharathi, K. Jayamoorthy, V. Thanikachalam, Docking investigation and binding interaction of benzimidazole derivative with bovine serum albumin, *J. Photochem. Photobiol., B* 117 (2012) 27–32.