

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E PROSPECÇÃO BIOLÓGICA DAS
ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS
DERIVADOS ACRIDÍNICOS

GLEYTON LEONEL SILVA SOUSA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E PROSPECÇÃO BIOLÓGICA DAS
ATIVIDADES ANTICÂNCER E ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS
DERIVADOS ACRIDÍNICOS

GLEYTON LEONEL SILVA SOUSA

Sob orientação do professor

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Sob coorientação da professora

Dra. Rosane Nora Castro

Sob coorientação do professor

Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Tese submetida como requisito para obtenção do grau de **Doutor em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Seropédica, Rio de Janeiro

Mai de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725p Sousa, Gleyton Leonel Silva , 1991-
Planejamento, síntese e prospecção biológica das
atividades anticâncer e anticolinesterásica de novos
derivados acridínicos / Gleyton Leonel Silva Sousa. -
Seropédica, 2023.
254 f.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.

Coorientador: Rosane Nora Castro.

Coorientador: Ricardo Olímpio De Moura.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2023.

1. Tiossemicarbazônico-acridínicos. 2.
Antiproliferativos. 3. Anticolinesterásicos. 4.
Topoisomerase II. 5. Multialvo. I. Kümmerle, Arthur
Eugen , 1979-, orient. II. Castro, Rosane Nora, 1965
, coorient. III. De Moura, Ricardo Olímpio , 1976-,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. V. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GLEYTON LEONEL SILVA SOUSA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 04/05/2023

Professor Dr. Arthur Eugen Kümmerle - IQ/UFRRJ

Professor Dra. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima - IQ/UFRRJ

Professora Dra. Maria Letícia de Castro Barbosa - UFRJ

Professora Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida - UPE

Professor Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira - UNILAB



Emitido em 2023

TERMO Nº 490/2023 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 09/05/2023 12:33)

ARTHUR EUGEN KUMMERLE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matricula: ###004#0

(Assinado digitalmente em 08/05/2023 16:38)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matricula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 08/05/2023 10:53)

JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.004-##

(Assinado digitalmente em 09/05/2023 13:51)

MARIA LETICIA DE CASTRO BARBOSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.697-##

(Assinado digitalmente em 08/05/2023 11:18)

SINARA MÔNICA VITALINO DE ALMEIDA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.664-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 490, ano: 2023, tipo:

TERMO, data de emissão: **08/05/2023** e o código de verificação: **37acc6ddd8**

*A Deus, pelo cuidado e sustento, à
minha família pelo apoio, amor e
ajuda em todos estes anos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir chegar nesse momento tão especial, com saúde e em paz.

À minha família, em especial, a minha amada mãe Graça, por todo incentivo, afeto e compreensão durante esses longos quatro anos em que estive longe do seu convívio diário. Estar em casa sempre foi e sempre será meu ponto de equilíbrio. Destaco ainda a amizade e companheirismo do meu cão amigo Duque, que está na nossa família há dez anos, e certamente, contribuiu com exacerbado carinho durante todo esse período.

À minha namorada, Regiane Vilanova, por ter dividido comigo cada conquista, cada angústia, por todo cuidado, carinho, paciência e amor durante esses últimos anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arthur Eugen, por ter acreditado no projeto e dado todo subsídio para o seu desenvolvimento. Nossas discussões e reflexões científicas foram fundamentais para meu aprendizado e amadurecimento como pesquisador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ricardo Olímpio, por todos os caminhos abertos, ensinamentos e principalmente, por me apresentar com tanto amor e dedicação à sua pesquisa.

À minha coorientadora, Prof. Dr^a. Rosane Nora, por todo suporte nos últimos dois anos. Sua dedicação ao nosso instituto é refletida neste trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa LaDMol-QM, pelo companheirismo durante esta etapa da minha vida. Foram inúmeros momentos felizes, tristes, repletos de aprendizados e união ao longo desses anos. A paciência, carinho e a amizade de cada um de vocês, certamente, favoreceu a construção desse momento. Agradeço individualmente a Nathalia Fonseca e a Larissa Ferreira pelos ensaios enzimáticos realizados, contribuíram grandemente aos resultados apresentados neste trabalho.

Ao Alojamento Masculino da Pós-Graduação (AMPG), por ter sido minha família carioca durante os últimos três anos. Nesse lugar cresci de forma imensurável como pessoa, conheci minha namorada, vivi momentos ímpares e que estarão marcados na minha memória. Neste espaço enfrentei a pandemia, assim como, todas as incertezas que nos cercavam. Nesse espaço o destino me apresentou a Brigitte, uma cachorra que esteve diariamente comigo ao longo dos meus últimos três anos. Esse espaço me apresentou o mundo, me acolheu, e serei eternamente grato pela oportunidade que tive de poder chamá-lo de casa durante meu doutorado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), ao Programa de Pós-graduação Química (PPGQ/UFRRJ), pela enorme contribuição em minha formação acadêmica e pessoal.

Aos técnicos do IQ-UFRRJ, em especial ao Maurício Lemos Matos (*in memoriam*), pela atenção, carinho e companheirismo enquanto presente no instituto. Sua dedicação na realização dos espectros de RMN subsidiaram este momento, o senhor será lembrado para sempre como exemplo de profissionalismo e como um querido amigo que fiz durante meu doutorado. Ao seu

sucessor, Vinicius Olivieri, por assumir com tanta dedicação a função do nosso querido Maurício.

À Universidade de Pernambuco (UPE), na pessoa da Prof. Dr^a Sinara Mônica, pela presteza e empenho na realização dos ensaios enzimáticos com a topoisomerase.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), na pessoa da Prof. Vanda Lúcia, pelo suporte no desenvolvimento dos ensaios de toxicidade aguda.

À Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), centro de Pesquisas Gonçalves Luiz – Bahia, nas pessoas do Prof. Dr. Daniel Pereira e Valdenizia Rodrigues, pelos ensaios citotóxicos realizados.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), nas pessoas da Prof. Dr^a. Alice Simon e do Dr. Thiago da Silva, pelos ensaios citotóxicos realizados.

Aos membros da banca pelas contribuições e sugestões neste trabalho tão importante em minha vida.

Agradeço a todos os meus professores desde os ensinamentos primários até minha pós-graduação, por terem repassado seus conhecimentos e contribuído para a realização desse sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**). Como minha primeira experiência de dedicação exclusiva, destaco a importância desse fomento, sem o qual não conseguiria realizar minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho e que me apoiaram nesta importante etapa da minha vida.

RESUMO GERAL

SOUSA, Gleyton Leonel Silva. **Planejamento, síntese e prospecção biológica das atividades anticâncer e anticolinesterásica de novos derivados acridínicos**. 2023. 253 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Doenças consideradas multifatoriais como Câncer e Doença de Alzheimer (DA) apresentam altas taxas de mortalidade e poucos tratamentos eficazes. Neste trabalho, relata-se o planejamento, síntese e prospecção biológica de cinquenta novos derivados acridínicos planejados a partir de duas explorações farmacodinâmicas específicas: a inibição da topoisomerase II α , quando direcionado a compostos antiproliferativos; e a inibição colinesterásica, quando a proposta era a DA. Os dois primeiros capítulos relatam a exploração farmacológica de trinta e oito derivados, provenientes das hibridações de núcleos acridínicos e fragmentos aromáticos derivados da tiossemicarbazona, como proposta de melhor ajuste farmacodinâmico a enzima alvo. De maneira geral, a maior atividade foi encontrada para um derivado acridínico mono substituído DT-3OCH₃-H (CI₅₀ = 8,83 μ M) frente a células K562-Lucena 1 (células leucêmicas resistentes). Alguns derivados mais ativos foram selecionados e apresentaram interessante inibição da Topoisomerase II α quando comparados à amsacrina, à 100 μ M, com destaque para o derivado tiossemicarbazônico-acridínico DL-08 (79%). Adicionalmente, compostos selecionados para teste de toxicidade não clínica não apresentaram sinais relevantes de toxicidade na dose de 2000 mg/kg em camundongos. O terceiro capítulo parte de um *screening* anticolinesterásico dos derivados do primeiro capítulo. Os compostos da série não substituída na acridina (CL) apresentaram melhor perfil de atividade, com destaque ao derivado CL-01 (acetilcolinesterase, AChE = 2,47 μ M; butirilcolinesterase, BChE = 0,71 μ M). A partir desses resultados, doze novos derivados foram propostos e sintetizados visando alterações na subunidade benzilidênica, assim como incorporação de atividades biológicas adicionais como, por exemplo, antioxidante. Modificação da subunidade acridina pela tetraidroacridina oriunda da tacrina também foi proposta. Os resultados inibitórios indicaram reprodutibilidade no perfil frente a BChE, com destaque na atividade para o CL-DiTerc (AChE = 10,53 μ M; BChE = 1,15 μ M). A substituição da acridina pela tetraidroacridina da tacrina (TA-H) levou à redução da potência de inibição (AChE = 13,60 μ M; BChE = 5,38 μ M). A cinética enzimática identificou modos de inibição distintos entre TA-H (inibição mista em AChE e BChE) e o derivado acridínico CL-01 (inibição não-competitiva em AChE e mista em BChE). Estudos teóricos reproduziram o perfil identificado na cinética, sugerindo que na AChE as interações dos derivados CLs estão concentradas na região do periférico e no canal, não sendo identificadas interações diretas com os resíduos do catalítico, distintamente ao encontrado para TA-H. Adicionalmente, estudos indicaram um perfil antioxidante para CL-DiTerc (DPPH EC₅₀ = 47,01 μ M), assim como alguns compostos avaliados indicaram capacidade de complexar íons metálicos (Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺), indicando que esses compostos possuem atividades multialvo.

Palavras-chave: Tiossemicarbazônico-acridínicos, antiproliferativos, anticolinesterásicos.

ABSTRACT

SOUSA, Gleyton Leonel Silva. **Design, synthesis, and biological prospection of anticancer and anticholinesterase activities of new acridine derivatives.** 2023. 253 p. Thesis (Doctorate in Chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Diseases considered multifactorial such as Cancer and Alzheimer's Disease (AD) have high mortality rates and few effective treatments. In this work, we report the design, synthesis, and biological prospecting of fifty new acridines derivatives designed from two specific pharmacodynamic explorations: the inhibition of topoisomerase II α , when directed to antiproliferative compounds; and cholinesterase inhibition, when AD was proposed. The first two chapters report the pharmacological exploration of thirty-eight derivatives, from the hybridization of acridine nuclei and aromatic fragments derived from thiosemicarbazone, as the proposal for better pharmacodynamic adjustment to the target enzyme. In general, the highest activity was found for a monosubstituted acridine derivative DT-3OCH₃-H (IC₅₀ = 8.83 μ M) against K562-Lucena 1 cells (resistant leukemic cells). Some more active derivatives were selected and showed interesting Topoisomerase II α inhibition compared to amsacrine at 100 μ M, with emphasis on the acridine–thiosemicarbazone derivative DL-08 (79%). Additionally, compounds selected for non-clinical toxicity testing did not show relevant signs of toxicity at the 2000 mg/kg dose in mice. The third chapter starts with an anticholinesterase screening of the derivatives of the first chapter. Compounds from the unsubstituted acridine (CL) series showed the best activity profile, with emphasis on the derivative (acetylcholinesterase, AChE = 2.47 μ M; butyrylcholinesterase, BChE = 0.71 μ M). From these results, twelve new derivatives were proposed and synthesized aiming at changes in the benzylidene subunit, as well as the incorporation of additional biological activities, for example, antioxidant. Modification of the acridine subunit by tetrahydroacridine from tacrine has also been proposed. The inhibitory results indicated reproducibility in the profile against BChE, with emphasis on the activity for CL-DiTerc (AChE = 10.53 μ M; BChE = 1.15 μ M). The replacement of acridine by tacrine tetrahydroacridine (TA-H) led to a reduction in the inhibition potency (AChE = 13.60 μ M; BChE = 5.38 μ M). Enzymatic kinetics identified distinct inhibition modes between TA-H (mixed inhibition in AChE and BChE) and the acridine derivative CL-01 (non-competitive inhibition in AChE and mixed in BChE). Theoretical studies reproduced the profile identified in the kinetics, suggesting that in AChE the interactions of the CL derivatives are concentrated in the peripheral region and the channel, not being identified as direct interactions with the catalytic residues, distinctly from that found for TA-H. Additionally, studies indicated an antioxidant profile for CL-DiTerc (DPPH EC₅₀ = 47.01 μ M), as well as some evaluated compounds indicated the ability to complex metal ions (Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ and Al³⁺), indicating that these compounds have multitarget activities.

Keywords: Acridine–thiosemicarbazone, antiproliferative, anticholinesterases.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo comum para a descoberta/desenvolvimento de um novo fármaco e abordagens in silico usualmente empregadas.....	4
Figura 2. Planejamento multialvo para compostos anticâncer.....	6
Figura 3. Planejamento multialvo para compostos anti-DA.....	7
Figura 4. Ciclo de resposta ao dano no DNA (DDR).....	10
Figura 5. Fármacos poliaromáticos intercaladores de DNA.....	11
Figura 6. Equilíbrio da clivagem de DNA mediada por topoisomerase II.....	13
Figura 7. Análise do encaixe molecular proposto ao etoposídeo na Topo II α (PDB ID: 5gwk).	14
Figura 8. Inibidores de colinesterases em fases clínicas para o tratamento da DA.....	16
Figura 9. Biossíntese e degradação da acetilcolina,	17
Figura 10. Sítio catalítico da AChE humana (<i>hAChE</i>) e BChE humana (<i>hBChE</i>).....	19
Figura 11. Exemplos de heterocíclicos nitrogenados fundidos à piridina.....	20
Figura 12. Derivados acridínicos biologicamente ativos utilizados na clínica.....	22
Figura 13. Derivados acridínicos com potencial atividade antiproliferativa.....	24
Figura 14. Derivados acridínicos com potencial atividade anticolinérgica.....	25
Figura 15. Planejamento estrutural dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos..	31
Figura 16. Efeitos da <i>mAMSA</i> e os derivados de acridina na atividade da topoisomerase II α	36
Figura 17. Pose final do ancoramento molecular para alguns fármacos e o DL-01 com DNA- TopoII α	37
Figura 18. Pose final do ancoramento molecular para derivados tiossemicarbazônicos- acridínicos com DNA-TopoII α	38
Figura 19. Dicroísmo circular do ctDNA na presença dos derivados acridínicos e EtdBr	41
Figura 20. Espectros de emissão e excitação do CL-07; espectros de extinção de fluorescência do ctDNA-EtdBr após a adição do composto CL-07	42
Figura 21. Intensidades de fluorescência do estado estacionário do ctDNA-EtdBr na ausência e presença dos compostos.....	42
Figura 22. Análise do encaixe molecular proposto a <i>mAMSA</i> e o DL-08 na Topo II α	68
Figura 23. Planejamento estrutural dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos..	69

Figura 24. Efeitos da mAMSA e os derivados de acridina na atividade da topoisomerase II α	76
Figura 25. Pose final do ancoramento molecular para alguns derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com DNA-TopoII α	78
Figura 26. Derivados acridínicos avaliados frente ao perfil anticolinesterásico.	100
Figura 27. Inibição dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos frente à AChE.	100
Figura 28. Inibição dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos frente à BChE.	101
Figura 29. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em eqBChE e em eeAChE para o composto CL-01.	104
Figura 30. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em eqBChE e em eeAChE para o composto CL-05.	105
Figura 31. Novos derivados acridínicos planejados para atividade anticolinérgica.....	105
Figura 32. Novos derivados da tetraidroacridina planejados em comparação aos derivados acridínicos como agentes anticolinesterásicos.	107
Figura 33. Híbridos tiossemicarbazônicos descritos com atividade anticolinérgica.....	109
Figura 34. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em eqBChE e em eeAChE para o composto TA-H.	110
Figura 35. Ancoramento molecular do CL-01 (verde-petróleo), CL-06 (bege), CL-F (verde-claro) e CL-DiTerc (azul) na eeAChE (PDB ID: 1c2b) em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja).	112
Figura 36. Ancoramento molecular do CL-InM (lilás) e TA-H (verde) na eeAChE (PDB ID: 1c2b) em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja).	114
Figura 37. Ancoramento molecular do CL-01 na eqBChE em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja) e a tacrina (magenta).	115
Figura 38. Ancoramento molecular do CL-01 na eqBChE em comparação ao encaixe encontrado para CL-DiTerc (azul) e a CL-InM (lilás).	116
Figura 39. Espectro de absorvância dos derivados avaliados (20 μ M) em MeOH/H ₂ O (50/50, v/v, Tris-HCl pH= 7,5) antes e após adição de Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺	121
Figura 40. Espectro de absorvância do CL-DiTerc (20 μ M) em MeOH/H ₂ O (50/50, v/v, Tris-HCl pH= 7,5) antes e após adição de concentrações crescentes de CuCl ₂	122
Figura 41. Viabilidade celular (%) de células SH-SY5Y.....	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica para os novos derivados acridínicos.....	34
Tabela 2. Atividade de inibição à Topo II α de derivados acridínicos.	36
Tabela 3. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com a DNA-TopoII α	37
Tabela 4. Propriedades absorptivas dos derivados e EtdBr na presença do ctDNA.....	39
Tabela 5. Propriedades emissivas do ctDNA-EtdBr na presença dos derivados acridínicos. .	43
Tabela 6. Análise toxicológica pré-clínica in vivo realizadas para alguns derivados acridínicos.	43
Tabela 7. Atividade citotóxica para os novos derivados acridínicos.....	72
Tabela 8. Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia mieloide crônica.....	74
Tabela 9. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com o DNA-TopoII α	77
Tabela 10. Avaliação das potências de inibição da série CL frente as colinesterases.	102
Tabela 11. Resultados da cinética enzimática para os compostos CL-01 e CL-05 nas colinesterases.	103
Tabela 12. Atividade inibitória frente as colinesterases para os novos derivados acridínicos.	107
Tabela 13. Atividade inibitória frente as colinesterases para os novos derivados tetraidroacridinas.	108
Tabela 14. Resultados da cinética enzimática para o derivado tacrínico TA-H nas colinesterases.	110
Tabela 15. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular dos novos derivados em um modelo cristalográfico de acetilcolinesterase enguia elétrica (PDB ID:1c2b).	111
Tabela 16. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com BChE de soro equino obtida no banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot pela modelagem por homologia.	115
Tabela 17. Atividade antioxidante para os novos derivados pela metodologia DPPH.	118
Tabela 18. Concentração de eficiência (CE ₅₀) antioxidante para o CL-DiTerc e o CL-InM.	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADMET	Propriedades farmacocinéticas "absorção, distribuição, metabolismo e excreção"
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
A β	β -amilóide
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
Bcl-2	Proteína envolvida na sinalização de morte celular
C ⁸	Citosina, base nitrogenada
CAS	Sítio catalítico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ChE's	Colinesterases
ChEIs	Inibidores de acetilcolinesterases
CI ₅₀	Concentração Inibitória média
CL	Derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos não substituídos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ctDNA	DNA de timo bovino
DA	Doença de Alzheimer
DC	Dicroísmo Circular
DCI	Dicroísmo Circular Induzido
DDR	Resposta ao dano no DNA
DG	Guanina, base nitrogenada
DL	Derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos dissubstituído
DMT	Terapia modificadora da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DT	Timina, base nitrogenada
GDE	Grupo doador de elétrons

EGFR	<i>Epidermal Growth Factor receptor</i>
EtdBr	Brometo de Etídio
FBDD	<i>Fragment-based drug design</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G ¹³	Guanina, base nitrogenada
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HDAC	Histona deacetilase
His	Histidina
Hsp90	Histidina quinase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	Constante de ligação intrínseca
K _{sv}	Constante de extinção de Stern-Volmer
LCMS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
DL ₅₀	Dose letal mediana
LRMS	<i>Low Resolution Mass Spectrometry</i>
mAMSA	Amsacrina
MS	Material Suplementar
MTDL	Ligantes Direcionados a Múltiplos Alvos
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
p170	Topoisomerase II α humana recombinante
PARP-1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PAS	Sítio aniônico periférico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
PM6	Parametric method 6, método semi-empírico
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square deviation</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBDD	<i>Structure-based drug design</i>
Ser	Serina
SIRT-3	Desacetilase sirtuin-3 dependente de NAD

SNA	Sistema Nervoso Autônomo
S _N Ar	Substituição Nucleofílica no Aromático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
T ⁹	Timina
Topo	Topoisomerase
Tris	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol</i>
Tris-HCl	Solução tampão
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Espectroscopia Ultra-Visível
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERENCIAL TEÓRICO	3
1. ABORDAGENS DA QUÍMICA MEDICINAL APLICADAS AO PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPOS BIOATIVOS	3
2. DOENÇAS MULTIFATORIAIS E A METODOLOGIA MULTIALVO.....	5
2.1 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA	7
2.1.1 DNA na terapia e resistência do câncer.....	9
2.1.2 Inibidores de topoisomerasas na terapia antineoplásica.....	11
2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2.2.1 Colinesterases (ChE's) como alvo terapêutico para DA.....	16
3. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS	19
3.1 ACRIDINAS.....	20
CAPÍTULO I.....	26
RESUMO	27
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO	29
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.1 SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.....	32
2.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	34
2.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO A TOPOISOMERASE IIa HUMANA	35
2.4 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	36
2.5 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM DNA	39
2.5.1 Ligação ao ctDNA por espectroscopia de absorção no UV-Vis	39
2.5.2 Dicroísmo Circular (DC)	40
2.5.3 Estudos de competição com o EtdBr.....	41
2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA.....	43
2.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS LEUCÊMICAS NORMAIS E RESISTENTES.	44
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	45
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	46
4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	46
4.2 SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS	47
4.2.1 Obtenção do núcleo de 9-cloroacridina	47

4.2.2 Obtenção de intermediários de tiossemicarbazona	49
4.2.3 Obtenção de derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (CL 01-10 e DL 01-10)	49
4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	59
4.3.1 Linhagens celulares.....	59
4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade	59
4.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE IIa HUMANA	59
4.5 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	60
4.6. INTERAÇÃO COM O DNA.....	60
4.6.1 Espectroscopia no UV-Visível	60
4.6.2 Dicroísmo circular (DC)	61
4.6.3 Competição de fluorescência com EtdBr	61
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA.....	61
4.7.1 Estudo de toxicidade aguda (14 dias).....	61
4.7.2 Necropsia, análise macroscópica e peso dos órgãos	62
4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS LEUCÊMICAS.....	62
4.8.1 Células.....	62
4.8.2 Ensaio de citotoxicidade	62
CAPÍTULO II	64
RESUMO	65
ABSTRACT.....	66
1. INTRODUÇÃO	67
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.1 SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.....	70
2.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	71
2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.....	73
2.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO A TOPOISOMERASE IIa HUMANA.	75
2.5 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	76
2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA.....	78
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	81
4.1 SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS	81
4.1.1 Obtenção do núcleo de 9-cloroacridina monossubstituído.....	81
4.1.2 Obtenção de derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (DTs).....	81
4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	91
4.3.1 Linhagens celulares.....	91
4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade	91
4.3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.....	92
4.4 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	93

4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA.....	93
4.5.1 Estudo de toxicidade aguda (14 dias).....	93
4.5.2 Necropsia, análise macroscópica e peso dos órgãos	94
CAPÍTULO III.....	95
RESUMO	96
ABSTRACT.....	97
1. INTRODUÇÃO	98
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
2.1 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA AChE E BChE.	100
2.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA	103
2.3 PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS.....	105
2.4 AVALIAÇÃO DA TROCA DA ACRINA PELA TETRAIDROACRIDINA NA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA 107	
2.5 ANCORAMENTO MOLECULAR	110
2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	116
2.7 ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DOS DERIVADOS FRENTE A Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} E Fe^{3+}	119
2.7 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y	122
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	124
4. PARTE EXPERIMENTAL	125
4.1 <i>SCREENING</i> DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA AS AChE E BChE.....	125
4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS AS COLINESTERASES.....	125
4.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ENZIMÁTICA	126
4.4 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS (CLs)	126
4.5 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	132
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	132
4.7 ESTUDO DA COMPLEXAÇÃO DOS DERIVADOS FRENTE A Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} E Fe^{3+}	133
4.8 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y	133
4.8.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MTT	133
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS GERAIS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
ANEXOS.....	1

INTRODUÇÃO GERAL

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos protótipos bioativos é complexo, longo e extremamente oneroso (SETHI et al., 2020; WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020). Inovações científicas e tecnológicas impactam cada vez mais na P&D com avanços expressivos na compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e dos mecanismos envolvidos nos processos patológicos (WU et al., 2020a). As bases moleculares envolvidas nesses processos nem sempre são de fácil elucidação, principalmente quando se trata das doenças tidas como multifatoriais. A proposta de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDLs) surge como alternativa no enfrentamento dessas doenças, que tem como exemplos o câncer e as doenças neurodegenerativas (JIANG et al., 2022).

As neoplasias malignas, mais conhecidas como câncer, são um importante grupo de doenças com grande impacto na morbidade e mortalidade mundial (SUNG et al., 2021). Apesar dos avanços científicos em alvos biológicos mais seguros, o mecanismo citotóxico ainda é muito comum aos tratamentos antineoplásicos existentes (BAGULEY et al., 2021). Considerando o processo de replicação do DNA, enzimas conhecidas como topoisomerasas regulam sua topologia e são essenciais ao processo. Compostos capazes de interferir na ação dessas enzimas, constituem um importante grupo quimioterápico e apresentam como principal semelhança estrutural, núcleos heterocíclicos condensados com destacada planaridade, tendo como principais exemplos na clínica a amsacrina e o etoposídeo (OKORO; FATOKI, 2023).

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência neurodegenerativa, considerada multifatorial, apresenta mecanismo patogênico complexo (“2023 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2023). As opções terapêuticas disponíveis à DA se concentram no controle dos transtornos cognitivos e redução da progressão da doença (CONTI FILHO et al., 2023). O sistema colinérgico marca o início da pesquisa voltada ao tratamento da DA, justificado principalmente por sua influência nos processos cognitivos e severidade da doença nesse sistema neurotransmissor (HAMPEL et al., 2018; S. SCHNEIDER, 2022). A 9-aminotetraidroacridina (tacrina) é um importante farmacóforo no desenvolvimento de anticolinérgicos, hibridações de outros fragmentos ao seu núcleo comumente buscam um benefício terapêutico multialvo (bloqueio da agregação β -amiloide, maior perfil anticolinérgico, capacidade de quelação frente a metais) (MAKHAEVA et al., 2023).

Dentre os derivados nitrogenados análogos ao benzeno, destaca-se o núcleo tricíclico da acridina, este fragmento é um importante *scaffold* para o desenvolvimento de quimioterápicos

e seus derivados apresentam um amplo espectro de atividades biológicas (ALBINO et al., 2020). Sua eficiência na intercalação entre os pares de bases do DNA, atribuída principalmente a sua planaridade, resulta na sua capacidade em inibir as enzimas topoisomerase, telomerase e o complexo proteassoma das células, estas características associadas justificariam seu potencial biológico (ALBINO et al., 2023; GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; SOUSA et al., 2022). Os intercaladores de DNA representam o maior grupo de inibidores Topo I/II conhecidos, sendo a amsacrina, considerada um padrão na ação citotóxica de ligação ao DNA (ELWAN et al., 2022). Interessante destacar que recentemente o núcleo acridina, além de usados no planejamento de quimioterápicos, também vem sendo utilizado na descoberta de novos inibidores de colinesterases por sua semelhança estrutural com a tetraidroacridina da tacrina.

As doenças multifatoriais, câncer e Alzheimer, foram os objetos de estudos desta tese que está apresentada em três capítulos. Os capítulos 1 e 2 discorrem sobre os planejamentos estruturais baseados em derivados acridínicos e suas atividades antiproliferativas. O planejamento estrutural baseou-se no arcabouço molecular da amsacrina, buscando potencializar uma possível inibição da topoisomerase II α por meio da inserção estrutural de fragmentos com subunidades aromáticas derivadas da tiossemicarbazona.

Através de semelhanças estruturais com inibidores colinérgicos promissores (tacrina e seus derivados) relatados nos últimos anos, um *screening in vitro* de inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) para alguns dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, propostos como inibidores de Topo II, foi realizado e subsidiou o planejamento de novos compostos anticolinérgicos apresentados no capítulo 3. A proposta de estruturas com atuação multifuncional, seja pela inibição simultânea aos sítios de ligações periféricos e catalíticos das colinesterases, seja pela adição de grupo com perfis de ação antioxidante, ou ainda pela capacidade em complexar com íons metálicos, fundamentaram o seguimento dos estudos envolvendo os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos frente a esse perfil biológico.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Abordagens da Química Medicinal aplicadas ao planejamento de protótipos bioativos

Associado sempre a uma corrida contra o tempo, seja pelo anseio populacional no tratamento para algumas doenças, seja pelo elevado custo operacional de desenvolvimento e otimização, a descoberta de um novo fármaco está cercada de incertezas, falhas e elevados gastos (BOLCATO et al., 2019; MEZA MENCHACA; JUÁREZ-PORTILLA; C. ZEPEDA, 2020; PINZI; RASTELLI, 2019). Em 2014, o custo médio para desenvolvimento de um novo medicamento girava em torno de 2,5 bilhões de dólares (SETHI et al., 2020). Em 2020, com avanços metodológicos e tecnológicos nos processos, novos estudos, indicaram um custo médio no desenvolvimento para um novo fármaco de US\$ 1 bilhão (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020).

Ao longo dos anos, a comunidade científica desenvolveu diversos modelos tentando entender e prever elementos-chave no processo do reconhecimento molecular. À medida que se estabelece uma conexão entre uma doença e seu alvo biológico, uma compreensão e otimização de novas opções terapêuticas são encaminhadas por diversas ferramentas da química medicinal (BOLCATO et al., 2019; LI, 2020a; MEZA MENCHACA; JUÁREZ-PORTILLA; C. ZEPEDA, 2020; SETHI et al., 2020).

A química medicinal é uma ciência interdisciplinar que abrange um domínio particularmente amplo situado na interface da química orgânica com as ciências da vida. Objetiva uma compreensão dos aspectos moleculares que regem os efeitos biológicos de substâncias bioativas/fármacos já conhecidos (farmacocinética e farmacodinâmica), assim como, o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novas moléculas bioativas que buscam atender necessidades médicas existentes (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019; IMMING, 2015). Atua de forma proeminente vislumbrando aumento da potência, seletividade e/ou diminuição da toxicidade, nos processos de escolha do alvo terapêutico (modelo bioquímico, celular ou *in vivo*), na identificação ou descoberta e produção de novas substâncias ativas que interagem com o alvo selecionado e na etapa de otimização de um composto com atividade conhecida (DOYTCHINOVA, 2022; IMMING, 2015).

Evoluções convergentes em áreas da química e biologia geraram uma quantidade excessiva de informações, que estavam além da capacidade de manipulação de dados “*in cerebro*”, sendo o principal motivo para o desenvolvimento das ciências computacionais nessa área (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007). Métodos de seleção computacionais aplicados em

um espaço biológico conhecido, considerando conceitos do modelo chave-fechadura, proposto por Emil Fisher, em 1890, e, o encaixe induzido, descrito por Daniel Koshland, em 1958, possibilitaram estudos teóricos e potencializaram o desenvolvimento de novos fármacos (MACARI et al., 2019; WINGERT; CAMACHO, 2018). Etapas de descobrimento, assistidas por abordagens *in silico*, podem potencializar a chegada de compostos às etapas clínicas do desenvolvimento (Figura 1) (LIN; LI; LIN, 2020; MACARI et al., 2019; MEZA MENCHACA; JUÁREZ-PORTILLA; C. ZEPEDA, 2020; WU et al., 2020a).

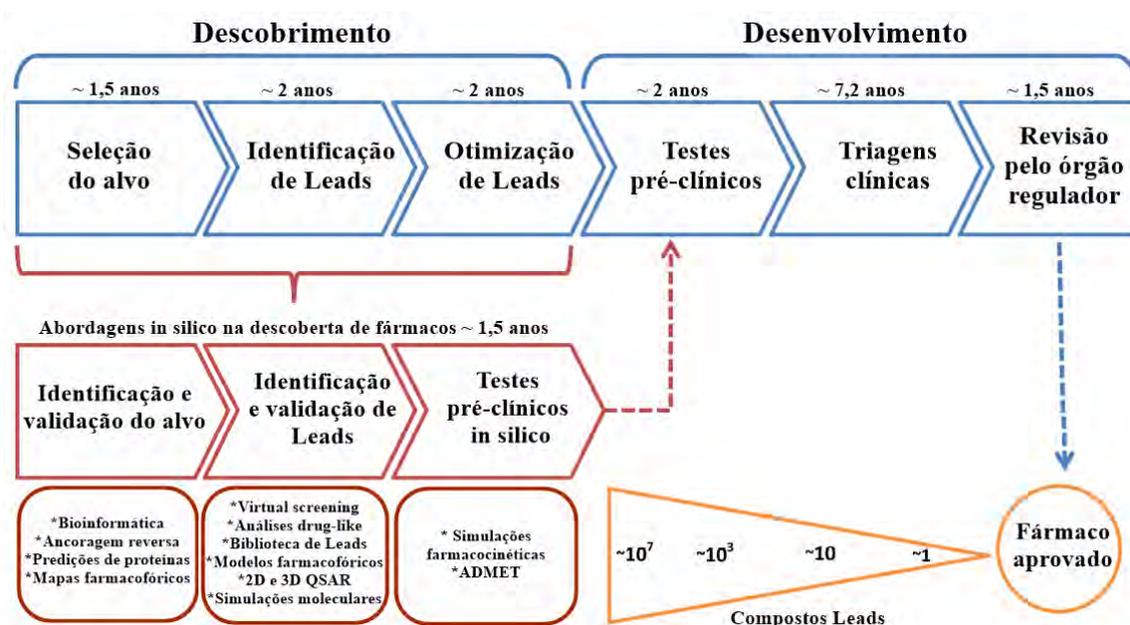


Figura 1. Linha do tempo comum para a descoberta/desenvolvimento de um novo fármaco e abordagens *in silico* usualmente empregadas. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Importantes avanços na biologia estrutural e molecular, associados ao desenvolvimento espectroscópico das últimas décadas, proporcionaram elucidações tridimensionais de milhares de proteínas. Com isso, o número de dados no *Protein Data Bank* (PDB) dobrou na última década, aumentando em dez vezes nos últimos vinte anos (BOLCATO et al., 2019). Este aumento impactou diretamente a descoberta de fármacos baseados na estrutura do alvo SBDD (do inglês, *structure-based drug design*). São exemplos, o raltitrexedo, antimetabólito usado na quimioterapia do câncer; e o norfloxacino, inibidor de topoisomerases II e IV, indicado para o tratamento de infecções do trato urinário (BATOOL; AHMAD; CHOI, 2019; SUN et al., 2020).

Uma definição usualmente aplicada no planejamento de compostos bioativos introduzida por Ehrlich, em 1909, proporciona a identificação de fragmentos estruturais essenciais a atividade biológica em um determinado arcabouço molecular (ROY; KAR; DAS, 2015). O conceito de farmacóforo fundamenta inúmeros planejamentos sintéticos (“*Fragment-based drug design*” – FBDD), em que a associação de fragmentos direcionais (*phoros*)

responsáveis por uma atividade biológica (*farmacon*) em uma única molécula, propicia um conjunto de recursos estereo-eletrônicos necessários para interações supramoleculares com alvos específicos, sendo muito utilizada para doenças multifatoriais, como o câncer e DA (LI, 2020b; YANG, 2010).

2. Doenças multifatoriais e a metodologia multialvo

No passado, o paradigma “uma doença – um alvo – um medicamento” delineou o planejamento da maioria dos compostos bioativos conhecidos, apresentando conceitos que pregavam maior potência e segurança farmacológica aos seus derivados. Apesar do sucesso e avanço na época, atualmente, não há dúvida de que essa proposta tenha eficácia restrita contra doenças complexas, na qual a patogênese envolve um conjunto de eventos bioquímicos operando simultaneamente. Nesse contexto, surge a proposta de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDLs), apresentando-se como uma ferramenta potencial contra doenças como câncer, malária, tuberculose (TB), diabetes e doenças neurodegenerativas (MAKHOBBA et al., 2020; ROSSI et al., 2021; SAMPIETRO et al., 2022).

Em um desenvolvimento multialvo, a seleção de alvos é direcionada por dados clínicos de terapias combinadas, triagens fenotípicas ou abordagens *in silico* (JIANG et al., 2022). Um dos principais exemplos na modulação farmacofórica híbrida em um composto multialvo aplicado na terapia anticâncer, o sunitinibe (**1**), da classe dos inibidores de múltiplas quinases, apresentou interessante eficácia dentro da terapia anticâncer existente, justificada principalmente, por sua destacada seletividade (RAUSCH et al., 2020). A amsacrina (**2**), outro exemplo da abordagem híbrida, é um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento da leucemia, que atua transformando a enzima Topo II em um agente que danifica o DNA. Os intercaladores de DNA representam o maior grupo de inibidores Topo I/II conhecidos, sendo a amsacrina, considerada um padrão na ação citotóxica de ligação ao DNA (JANGIR et al., 2012; SKOK et al., 2020). Outras abordagens híbridas são avaliadas e exploradas na terapia anticâncer. Na Figura 2 temos alguns mecanismos anticâncer validados, que em associação, podem fundamentar o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos (MAKHOBBA et al., 2020; RAMSAY et al., 2018).

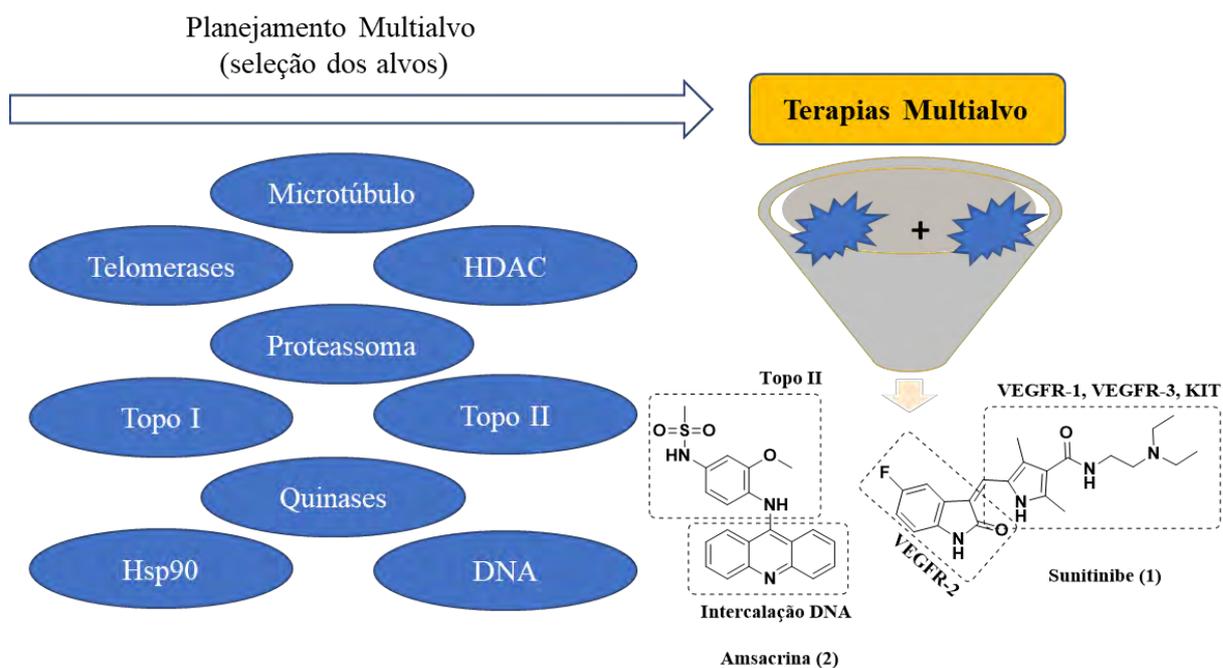


Figura 2. Planejamento multialvo para compostos anticâncer. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Os MTDLs podem apresentar estratégias que envolvem o planejamento de híbridos conectados, fundidos ou mesclados. A seleção dos múltiplos alvos biológicos a serem atingidos é provavelmente o aspecto mais crítico na descoberta de compostos multialvo, pois tem papel intrínseco ao curso da doença e na sinergia biológica envolvida. Adicionalmente, parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos também devem ser acompanhados, principalmente na estratégia de híbridos conectados. A AChE é o alvo biológico mais buscado nas estratégias MTDLs para a DA, seguido pela agregação do peptídeo β -amiloide, estresse oxidativo, BChE e homeostase metálica. Estes, constituem os cinco principais alvos na maioria dos projetos de desenvolvimento de compostos anti-DA, assim como, suas respectivas combinações binárias também são amplamente apresentadas nos relatos de pesquisas dos últimos anos contra a doença (OSET-GASQUE; MARCO-CONTELLES, 2018; ROSSI et al., 2021; SAMPIETRO et al., 2022).

A donepezila **(3)** (Figura 3), medicamento aprovado pelo FDA, atua na função colinérgica aumentando os níveis de ACh no SNC e serve de modelo para diversos derivados multialvo. Tanto o fragmento da benzilpiperidina, um farmacóforo de ligação ao sítio catalítico aniônico (CAS) da AChE, quanto a fração indanona, que interage com o sítio periférico aniônico (PAS) da AChE via interações de empilhamento π - π , são utilizados como inspiração em compostos multialvos que inibem a agregação de $A\beta$, atuam como complexantes de metais, antioxidante e neuroprotetores (KIM et al., 2014; WANG et al., 2016).

A tacrina (4) é um potente agente não seletivo inibidor de AChE e BChE, sendo a primeira terapia aprovada para DA, em 1993. Contudo, foi descontinuada em 2013 devido a problemas como hepatotoxicidade, justificada, provavelmente, pela estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e depleção de glutatona, além da baixa biodisponibilidade após administração oral fundamentaram a sua suspensão na clínica (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2021; SAMEEM et al., 2017). Combinações multialvo do farmacóforo da tacrina condensado a fragmentos com propriedades antioxidantes e inibidores da agregação β -amiloide, sucederam as pesquisas envolvendo seus derivados, com objetivo de controlar os efeitos adversos identificados em seu precursor, assim como híbrido tacrina-indol (5) demonstrado na Figura 3 (CHALUPOVA et al., 2019; HAMULAKOVA et al., 2021; TSENG et al., 2020).

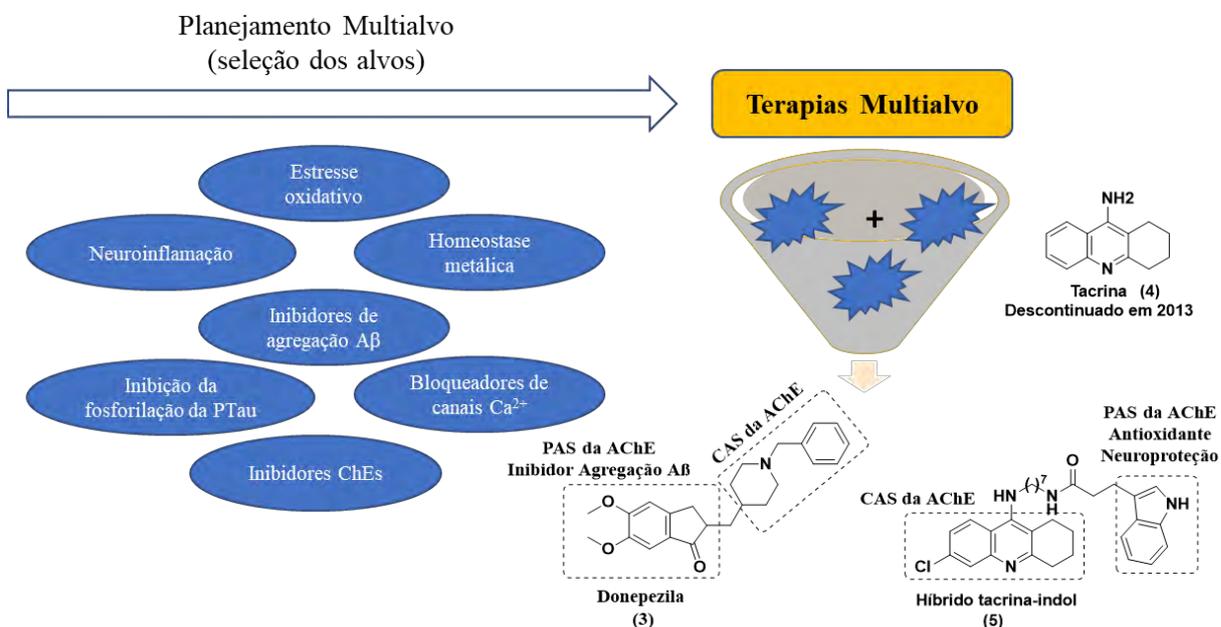


Figura 3. Planejamento multialvo para compostos anti-DA. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Em resumo, o processo de planejamento baseado nas premissas da Química Medicinal, proporciona racionalidade durante a busca de compostos biologicamente ativos, favorecendo uma redução do tempo e custo operacional, embora o caminho ainda seja longo e repleto de obstáculos (MACARI et al., 2019; PINZI; RASTELLI, 2019; SANT'ANNA, 2009; SETHI et al., 2020; TORRES et al., 2019; WINGERT; CAMACHO, 2018).

2.1 Aspectos farmacológicos da quimioterapia antineoplásica

Câncer, tumores malignos e neoplasias malignas são alguns dos termos utilizados para doenças crônicas causadas por uma desordem genética celular. Estas desordens são responsáveis pelo surgimento e replicação de células anormais que possuem grande capacidade

de proliferação, podendo alcançar tecidos e órgãos adjacentes rapidamente, em processos conhecidos como metástase (SIEGEL et al., 2023). Metástases generalizadas são a principal causa de morte por câncer (*National Cancer Institute*, 2021). Uma estimativa recente, realizada para o ano de 2020, indicou a ocorrência de 19 milhões de novos casos de câncer, com cerca de 10 milhões de óbitos. Atualmente, uma em cada seis mortes no mundo são relacionados ao câncer (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou a ocorrência de cerca de 704 mil novos casos por ano, para o triênio 2023-2025 (SANTOS et al., 2023).

O câncer possui fatores de risco tanto ambientais como hereditários, dos quais o meio ambiente contribui majoritariamente para o surgimento de células tumorais, em um processo que envolve a interação entre os fatores genéticos de uma pessoa e os agentes carcinogênicos externos aos quais ela está exposta (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Tabagismo, consumo de álcool, maus hábitos alimentares, sedentarismo e a poluição do ar são exemplos de fatores carcinogênicos externos (EXARCHAKOU et al., 2022). A incidência da doença aumenta drasticamente com a idade, provavelmente pelo acúmulo de possíveis indutores ao longo da vida, assim como, pela tendência dos mecanismos de reparo celular serem menos eficazes à medida que a pessoa envelhece (AUNAN; CHO; SØREIDE, 2017).

Em geral, os tumores malignos apresentam perfis altamente heterogêneos em características moleculares e sensibilidades às terapias existentes. A depender do subtipo do câncer, estágio e fatores clínicos do paciente, terapias são direcionadas para inicialmente promover a eliminação do câncer; ou ainda, quando identificada metástase, o tratamento tem por objetivo prolongar a taxa de sobrevida do paciente (PUCCI; MARTINELLI; CIOFANI, 2019). As estratégias convencionais de tratamento do câncer mais utilizadas incluem a ressecção cirúrgica dos tumores seguida de radioterapia com raios-X e/ou quimioterapia (DEBELA et al., 2021). A cirurgia continua a ser um tratamento de primeira linha para muitos tipos de câncer, principalmente em estágios iniciais da doença; avanços em sua precisão, suporte de imagem molecular e, mais recentemente, procedimentos cirúrgicos assistidos por inteligência artificial foram perceptíveis nos últimos anos. Outra estratégia tida como convencional, a quimioterapia, atua preferencialmente na inibição da proliferação celular e multiplicação tumoral. O uso clínico de quimioterápicos foi melhorado por ajustes nas dosagens e terapias combinadas, assim como, em novas abordagens mecânicas envolvendo conceitos de terapia-alvo (CHEN et al., 2021; KIFLE et al., 2021).

Mesmo considerando todo o progresso, os agentes quimioterápicos são comumente associados a efeitos colaterais graves, sendo reflexo, na maioria das vezes, do mecanismo de ação envolvido para sua resposta farmacológica (SUNG et al., 2021; ZHONG et al., 2021). O índice terapêutico na quimioterapia do câncer apresenta uma janela muito pequena, visto que a maioria dos fármacos demonstram atividade em células que se multiplicam rapidamente, sendo elas normais ou neoplásicas. Em resumo, as principais limitações identificadas na quimioterapia convencional são: dificuldade na identificação de uma dosagem mais eficaz, falta de especificidade, resistência a tratamentos existentes, metabolização rápida e, principalmente, seus efeitos colaterais (HABET, 2021).

2.1.1 DNA na terapia e resistência do câncer

O câncer tem origem em alterações na estrutura genética (ácido desoxirribonucleico, DNA) das células, as chamadas mutações. Em um processo normal, uma célula sadia possui um ciclo pré-determinado de crescimento, divisão, funcionamento e morte celular. Qualquer alteração que ocorra durante esse ciclo pode resultar no surgimento de uma célula neoplásica (FARES et al., 2020). A resposta ao dano no DNA (DDR) através de algumas vias de reparo, como apresentado na Figura 4, constitui uma tentativa de manutenção da estabilidade e integridade genética. Quando as células são expostas a agentes endógenos ou exógenos com potencial para dano, o desequilíbrio funcional dessas vias de reparo é conectado a origem e progressão do câncer. A DDR pode resultar na sobrevivência da célula quando a quantidade e o tipo de dano são gerenciáveis, ou ainda, na senescência ou morte celular quando o dano é muito grave. As terapias anticâncer tidas como primárias (radiação ionizante e agentes quimioterápicos) induzem a morte celular causando danos diretos ou indiretos ao DNA, esses danos podem ocasionar uma hipersensibilidade ou resistência das células cancerígenas a essas terapias, explicadas pelo ciclo apresentado abaixo (LI et al., 2021a; MANSOORI et al., 2017; ZELL et al., 2021).

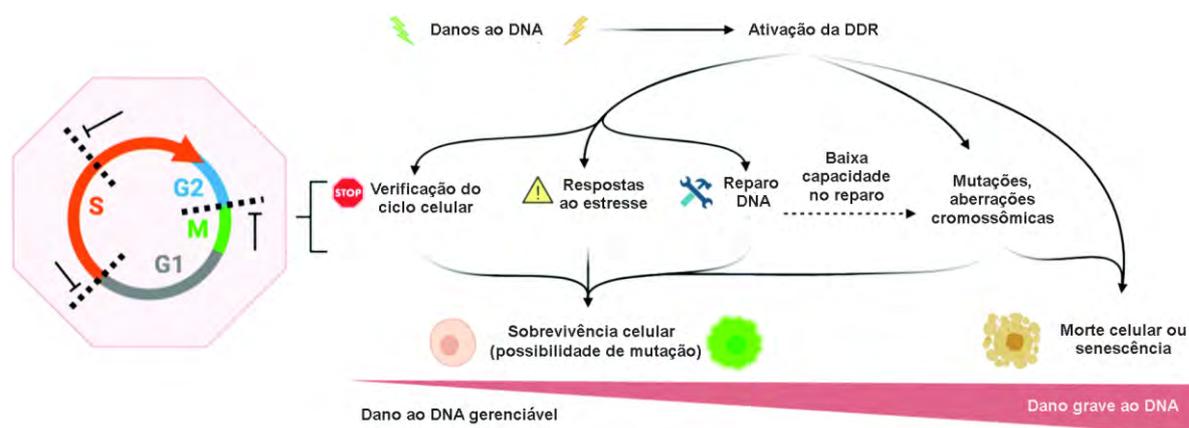


Figura 4. Ciclo de resposta ao dano no DNA (DDR); adaptado (ZELL et al., 2021).

Apesar dos avanços científicos em planejamentos biológicos mais seletivos e seguros, o mecanismo citotóxico ainda é muito comum aos tratamentos antineoplásicos existentes (BAGULEY et al., 2021). O DNA, como detentor de informação genética, é um alvo importante para a interação de compostos bioativos por sua efetiva participação no crescimento e divisão celular (HMOUD ALOTAIBI; ABDALLA MOMEN, 2020). Estudos descrevem uma grande variedade de moléculas que interagem com o DNA, apresentando variados perfis biológicos como antibióticos (PÉREZ-ARNAIZ et al., 2014; SHAHABADI; HASHEMPOUR, 2019), anticâncer (BAGULEY et al., 2021; DE ALMEIDA et al., 2015), antiviral (RAMANA et al., 2015) e antiprotozoário (DOGANC et al., 2021).

A maioria das terapias direcionadas acomete células com alta taxa de proliferação, como as neoplásicas, e com instabilidade genômica, entretanto, células normais também podem ser afetadas (NAGEL; SEMENOVA; BERNIS, 2016). Essa interação de compostos bioativos ao DNA pode acontecer indiretamente, quando a ligação transcorre através de proteínas que estão conectadas ao DNA, ou diretamente, quando interações intermoleculares, covalentes ou não, são responsáveis pela atração de pequenas moléculas a estrutura helicoidal do DNA (HMOUD ALOTAIBI; ABDALLA MOMEN, 2020). Fármacos como a cisplatina, carboplatina e ciclofosfamida realizam interações irreversíveis com o DNA, do tipo covalente; estes, constituem uma importante classe de quimioterápicos, os agentes alquilantes, que atuam diretamente no ciclo celular (LEHMANN; WENNERBERG, 2021). A outra forma de interação, a não covalente, apresenta em geral um perfil farmacológico mais seguro, justificado muitas vezes, pelo modo de ligação reversível ao DNA (BAUER, 2015).

Apesar de apresentar maior fragilidade energética quando comparadas com as interações covalentes, as interações não covalentes constituem um artifício crucial para “comunicação” com alvos biológicos; estando presentes em funções biológicas importantes

como no reconhecimento de ligantes, estabilidade de proteínas, alterações conformacionais, entre outras. As formas de interação não covalente mais frequentes incluem: interações de hidrogênio, forças de Van der Waals, π -cátion e as interações de empilhamento (JIN et al., 2022; JOHNSON et al., 2010). Definida pela atração causada por elétrons π de dois sistemas aromáticos, as interações de empilhamento desempenham um papel crucial na estabilidade secundária do DNA, sendo assim muito explorada na terapia anticâncer (BAGULEY et al., 2021; SONI et al., 2017). A intercalação de moléculas ao DNA consiste na inserção de compostos formados por sistemas fundidos de anéis aromáticos ou heteroaromáticos entre pares de bases do DNA, resultando em alterações na sua estrutura helicoidal com torções e alongamentos (RESCIFINA et al., 2014). Embora esteja bem estabelecido que a ligação ao DNA na forma não covalente, tão somente, não é suficiente para conferir atividades citotóxicas promissoras, esta afinidade é frequentemente considerada um critério que pode desencadear vários processos enzimáticos intrínsecos a mecanismos de ação antineoplásicos (HMOUD ALOTAIBI; ABDALLA MOMEN, 2020; RESCIFINA et al., 2014). Derivados de antraciclinas, acridinas e antraquinonas são exemplos de compostos com interações não covalentes ao DNA utilizados na clínica; a Figura 5, apresenta alguns destes derivados poliaromáticos intercaladores de DNA, e que também são inibidores da enzima topoisomerase II, sendo essa associação responsável pela resposta biológica antiproliferativa apresentada (VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

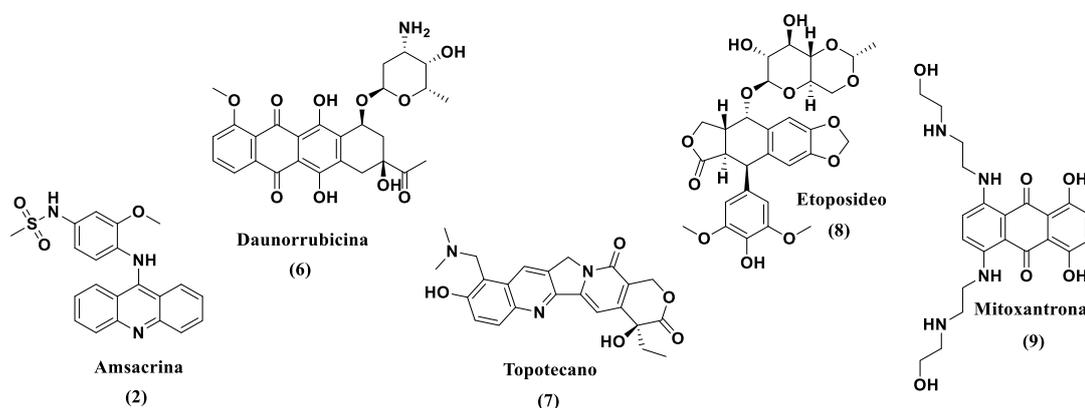


Figura 5. Fármacos poliaromáticos intercaladores de DNA. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

2.1.2 Inibidores de topoisomerases na terapia antineoplásica

As enzimas topoisomerases (Topo) controlam a estrutura do material genético durante muitos processos celulares (replicação do DNA, transcrição e recombinação ou condensação cromossômica). Atuam por meio de uma ligação covalente da tirosina, presente no sítio ativo

enzimático, ao grupo fosfórico do DNA para aliviar seu estado helicoidal ou desembaraçar cromossomos interligados, através da clivagem ou religação de suas fitas. Conforme as quebras do DNA em fita simples ou dupla durante a catálise, são classificadas em dois grupos, Topo I e Topo II, respectivamente (LEE; BERGER, 2019; MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021).

A maioria dos organismos eucarióticos expressa uma única topoisomerase tipo II, conhecida como DNA topoisomerase II. Os vertebrados apresentam duas isoformas, a Topo II α e a Topo II β . No geral, as duas enzimas apresentam homologia de 68%, chegando a 78%, nas subunidades catalíticas (WENDORFF et al., 2012). A primeira, expressada majoritariamente nas fases S e M do ciclo celular, está principalmente ativa durante o processo de replicação do DNA e segregação cromossômica para mitose; já a Topo II β , participa da regulação da transcrição de expressão gênica, tendo sua expressão independente do ciclo celular (RICCIO; SCHELLENBERG; WILLIAMS, 2020).

Ao considerar o mecanismo de fragmentação do genoma como parte do processo, as enzimas Topo do tipo II são relativamente perigosas, mesmo quando destacado que esse mecanismo é reversível e de curta duração; a sua desregulação pode ocasionar sinalização de reparo/recombinação do DNA ou vias de morte celular, por isso, esse mecanismo é bastante explorado no desenvolvimento terapêutico antimicrobiano e anticâncer (MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

Os inibidores de topo II α humano estão na literatura divididos em dois grandes grupos: inibidores catalíticos e venenos da Topo II. Os inibidores catalíticos não induzem a formação do complexo de clivagem enzima-DNA. Atuam diretamente na enzima Topo II inibindo sua atividade através de variadas etapas no ciclo catalítico, incluindo a ligação ao DNA e ao ATP. Esses inibidores têm baixo perfil genotóxico, mas ainda podem efetivamente suprimir a proliferação celular através do estresse topológico no DNA pela inibição enzimática da Topo II, evento este que pode induzir um processo conhecido como catástrofe mitótica, Figura 6. No entanto, os inibidores catalíticos apresentam sérios efeitos fora do alvo, como também, baixa estabilidade (LOBODA et al., 2020; MATIAS-BARRIOS et al., 2021).

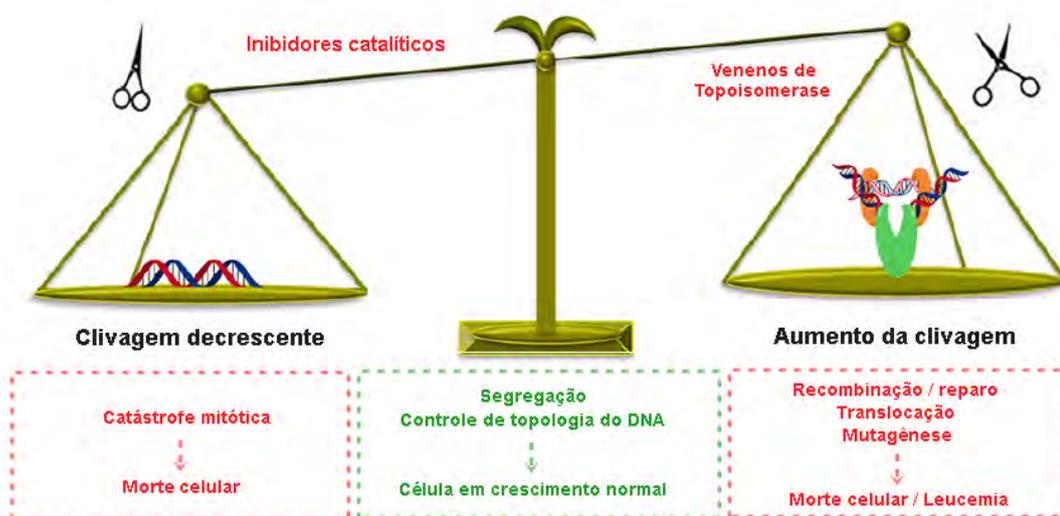


Figura 6. Equilíbrio da clivagem de DNA mediada por topoisomerase II; adaptado (VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

O termo “veneno” é aplicado devido a característica de conversão da enzima em uma toxina celular que desencadeia consequências mutagênicas e letais; o aumento dos níveis de complexos de clivagem representam um grande distúrbio nas quebras de DNA, interferindo na capacidade da enzima de religar essas moléculas clivadas por meio da estabilização do complexo enzima-DNA (BUZUN et al., 2020; POMMIER et al., 2010; RICCIO; SCHELLENBERG; WILLIAMS, 2020). Apesar da conotação negativa associada ao termo “veneno”, todos os compostos direcionados a Topo II, conhecidos clinicamente, atuam por essa via de mecanismo (VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

A Figura 7 apresenta parte de um complexo DNA-Topo II α e seu modo de interação com o etoposídeo, um veneno de Topo II, disponível no PDB (ID:5gwk). A tirosina catalítica (Tyr805), destacada na Figura 7A pela cor magenta, é a responsável pelo ataque nucleofílico ao DNA, desencadeando o processo de clivagem. As interações de empilhamento de elétrons π , associadas a ligações de hidrogênio com os resíduos da enzima (Asp⁴⁶³), coordenam o modelo proposto para formação de um complexo DNA-TopoII α -etoposídeo, responsável por retardar ou impedir o processo de reclivagem natural (DRWAL et al., 2014; WENDORFF et al., 2012). O modelo farmacofórico apresentado indica que a subunidade aromática do 4-hidroxi-3,5-dimetoxifenila do etoposídeo se liga à bolsa cercada por resíduos como o Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³ e Arg⁴⁸⁷, sendo o principal responsável pelas interações fármaco-proteína (DA SILVA FILHO et al., 2019; TYLIŃSKA et al., 2021).

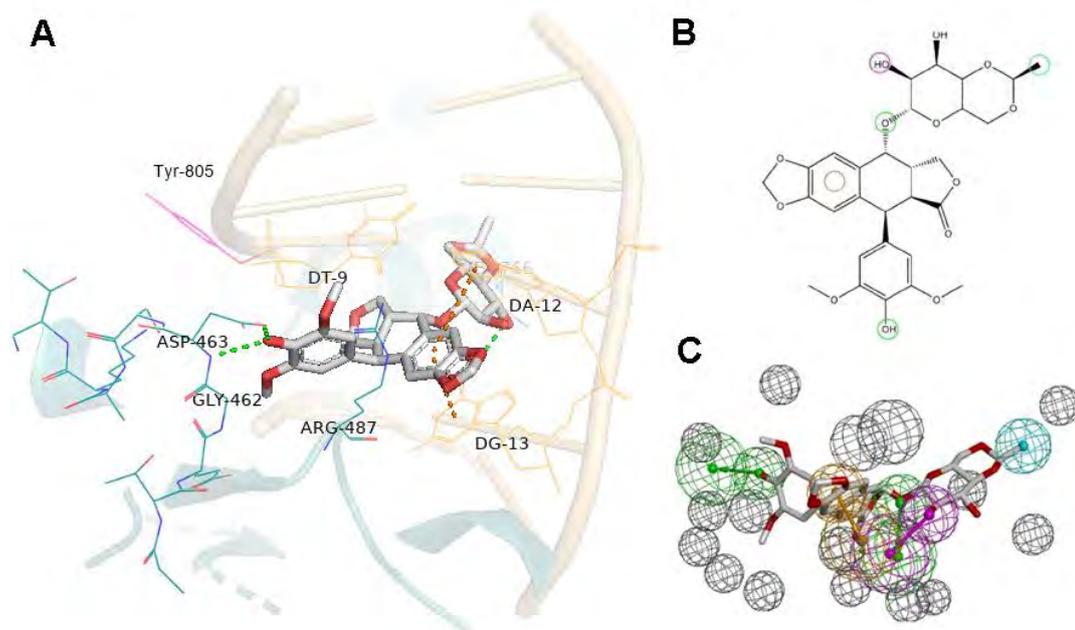


Figura 7. Análise do encaixe molecular proposto ao etoposídeo na Topo II α (PDB ID: 5gwk), adaptado (DRWAL et al., 2014). (A) Pose de encaixe do etoposídeo com a DNA-Topo II α aponta, respectivamente, para interações de empilhamento de elétrons π (tracejados em laranja) e ligações de hidrogênio (verde). Na cor laranja claro apresentasse as bases de DNA envolvidas na clivagem com a enzima (verde azulado); (B) e (C) representações 2D e 3D do modelo farmacofórico proposto para interação do etoposídeo com a enzima; na cor verde, aceptores de ligação de hidrogênio; em rosa, doador de ligação de hidrogênio; a cor azul representa grupo hidrofóbico; em laranja, pontos favoráveis para interações eletrônicas π - π ; em cinza, complementação da cavidade estérica do sítio excluída.

2.2 Aspectos farmacológicos da Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva irreversível, responsável pela perda de memória, demência e comprometimento das funções cognitivas do corpo humano (ABUBAKAR et al., 2022). Segundo estimativas da *Alzheimer's Disease International*, 50 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com alguma forma de demência; projeções indicam que estes números podem triplicar até 2050, sendo a DA a principal causa dessa síndrome. No Brasil, estima-se que 1,2 milhão de pessoas tenham a doença, com média de 100 mil novos casos diagnosticados por ano (CHUFAROVA et al., 2018; TSENG et al., 2020).

Associada ao envelhecimento populacional, com etiologia não totalmente esclarecida, mas considerada multifatorial, a DA, indica impacto em vários sistemas de neurotransmissão, agregados filamentosos da proteína β -amiloide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína tau (FALCO et al., 2015). Embora esses eventos possam ser perceptíveis no cérebro de um idoso saudável, não são frequentemente observados conjuntamente e com a mesma intensidade comparativamente às pessoas acometidas pela doença (DE STROOPER; KARRAN, 2016).

Diversos outros sinais bioquímicos também são observados na DA como, por exemplo, estresse oxidativo difundido no cérebro, neuroinflamação, desregulação de cálcio, deficiência de acetilcolina, mutações genéticas, trauma cerebral e problemas na homeostase metálica. A progressão da doença leva à morte em um período entre 6 e 12 anos após seu início, sendo normalmente associadas a complicações com a imobilidade do paciente ou problemas respiratórios (CHUFAROVA et al., 2018; RABBITO et al., 2020).

Apesar de inúmeras tentativas para compreensão das vias envolvidas no surgimento e evolução da doença, o que gerou grande número de hipóteses, o único fato considerado unânime entre os estudiosos é que a DA tem correlação direta com a idade (XIA et al., 2018), mas que fatores genéticos e exógenos também atuam em sua evolução (HOOGMARTENS; CACACE; VAN BROECKHOVEN, 2021; TABASSUM; MISRANI; YANG, 2020). Os fatores de risco genéticos que estão associados/relacionados ao acometimento de pacientes pela DA são considerados raros, responsáveis por 5% dos casos totais, e estão associados a mutações no gene da proteína precursora A β (APP) ou presenilina, que é um constituinte do complexo da enzima γ -secretase que degrada a APP em A β , e devido a mutações nas isoformas da apolipoproteína transportadora de colesterol (ApoE). Adicionalmente, os riscos exógenos incluem: trauma cerebral, obesidade, diabetes, fatores associados ao sistema imunológico e vascular, assim como, exposição exógena a metais, incluindo chumbo, mercúrio e alumínio (A. ARMSTRONG, 2019).

Até 2020, os tratamentos comercialmente disponíveis à DA se concentravam ao controle dos transtornos cognitivos e redução na progressão da doença (CUMMINGS, 2021). Em 2021, a primeira terapia modificadora da doença (DMT) foi aprovada, aducanumab, sendo indicada para pacientes em fase de comprometimento cognitivo e demência leve. Este, é um anticorpo monoclonal anti-amiloide, que concentra uma importante via mecanística para futuros tratamentos, ainda apresentando dois compostos bioativos em revisão pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), a donanemab e lecanemab. Na busca por DMTs eficientes para a DA, abordagens também são voltadas para o controle dos impactos sobre os processos colinérgicos, que apresentam grave perfil degenerativo e danos irreversíveis à memória. Atualmente, dois compostos estão em fases clínicas para DA: a octaidroaminoacridina (**10**) e o derivado AD-35 (**11**), Figura 8, todos inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Destaca-se ainda a abordagem multimecanística do AD-35 capaz de atuar na agregação β -amiloide por indução metálica, assim como, na ativação de astrócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias (CUMMINGS et al., 2022; LI et al., 2017b; XIAO et al., 2017).

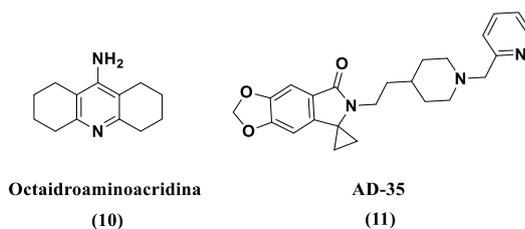


Figura 8. Inibidores de colinesterases em fases clínicas para o tratamento da DA. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

2.1.1 Colinesterases (ChE's) como alvo terapêutico para DA

O sistema colinérgico marca o início da pesquisa voltada ao tratamento da DA, justificado principalmente pela severidade da doença nesse sistema neurotransmissor (HAMPEL et al., 2018). Estratégias terapêuticas envolvendo processos pré-colinérgicos como precursores de acetilcolina, inibidores de colinesterases (ChEi, do inglês *cholinesterase inhibitor*) e agonistas de receptores muscarínicos e nicotínicos foram estudados quanto à eficácia frente a DA. Entretanto, a única classe que obteve relativo sucesso clínico foram os ChEIs, representando a primeira classe de abordagens farmacológicas eficazes para o tratamento da DA (S. SCHNEIDER, 2022).

As colinesterases (ChE's), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), são enzimas serina hidrolases, responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A ACh é considerada um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular. Quando funcionam normalmente, os neurônios colinérgicos do sistema nervoso central (SNC) liberam ACh na fenda sináptica, onde se liga a receptores pós-sinápticos ou pré-sinápticos, muscarínicos ou nicotínicos, dependendo do trato específico ao qual a célula pertence. A ACh permanece ativa até ser hidrolisada em colina e acetato pela acetilcolinesterase (AChE), como um mecanismo fisiológico para interromper suas ações. Ao inibir a AChE e, portanto, a hidrólise da ACh na fenda sináptica, os ChEIs aumentam efetivamente a quantidade de ACh disponível para os receptores colinérgicos, compensando em teoria, a hipofunção causada pela DA no SNC. A redução nos níveis de ACh nos neurônios colinérgicos e não-colinérgicos é correlacionada com a perda progressiva e irreversível de memória na DA. Uma mimetização do ciclo de produção da ACh é apresentado na Figura 9 (GOULART et al., 2021; S. SCHNEIDER, 2022).

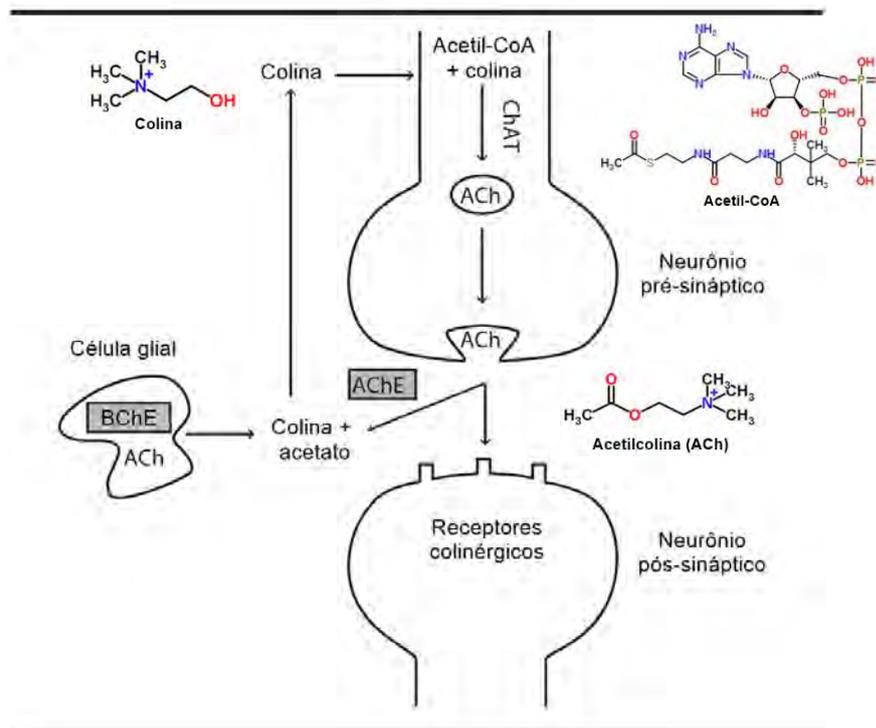


Figura 9. Biossíntese e degradação da acetilcolina, adaptado NORDBERG et al. (2013).

Em um cérebro normal, a AChE é responsável por aproximadamente 95% da atividade das colinesterases sendo capaz de hidrolisar 6×10^5 moléculas de ACh por minuto, mostrando assim, alta especificidade pela acetilcolina (STANCIU et al., 2019). Outra característica fisiológica, presente na DA e que está associada à enzima AChE como importante cofator, é a agregação do peptídeo A β . A AChE induz alterações conformacionais e bioquímicas em solução deste peptídeo, acelerando sua fibrilogênese. Adicionalmente, os complexos AChE-A β exibem uma neurotoxicidade consideravelmente maior em comparação com os peptídeos A β livres (CARVAJAL; INESTROSA, 2011; DINAMARCA et al., 2010).

A butirilcolinesterase (BChE), também conhecida por pseudocolinesterase, é sintetizada no fígado e encontrada primariamente no plasma, sendo amplamente distribuída em outros tecidos, como: pulmões, coração, sistema nervoso central e periférico, principalmente de origem glial (ZHOU; HUANG, 2022). Quanto ao perfil fisiológico, a BChE apresenta taxas de hidrólise mais lentas, participando na hidrólise de outros ésteres como a butirilcolina (BCh), sendo menos específica que a ACh (POPE; BRIMIJOIN, 2018). Entretanto, em pacientes com a DA avançada, o aumento em mais de 120% nos percentuais de BChE, correlacionados com a drástica redução dos níveis de AChE (55-67%), tornam-na um interessante alvo, tanto na proposta de biomarcador para doença, quanto ao planejamento de potenciais inibidores (LI et al., 2021c).

A AChE desempenha um papel mais dominante que a BChE na neurotransmissão colinérgica, muito pela predominância da origem glial da BChE (REID; CHILUKURI; DARVESH, 2013). Contudo, estudos apontaram a capacidade dessa enzima em compensar o déficit de hidrólise da ACh causado por inibidores seletivos de AChE. Adicionalmente, a inibição seletiva de BChE reduziu os níveis de peptídeo β -amiloide no cérebro de camundongos e células de neuroblastoma humano sem diminuir a viabilidade celular; assim como, estudos com ratos idosos, apresentaram aumento no desempenho cognitivo e na vida dos animais (GREIG et al., 2005; KOŠAK et al., 2016). Além disso, características neuropatológicas da DA, como placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares, foram correlacionadas com a presença de altos níveis de BChE (DARVESH et al., 2012). Portanto, a descoberta de inibidores de BChE vislumbra possíveis candidatos para o tratamento sintomático da DA (DO N. GOULART et al., 2021; MARUCCI et al., 2021; ZHOU; HUANG, 2022).

A AChE e BChE apresentam relativa homologia, com cerca de 65% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos. Ambas dispõem de uma região aniônica periférica, denominada PAS, e outra composta por uma tríade catalítica, conhecida por CAS, separados por um canal com aproximadamente 20 Å (Figura 10). O sítio periférico nas colinesterases (PAS) é revestido por resíduos aromáticos que desempenham um papel fundamental na ligação e orientação de substratos aromáticos e/ou catiônicos em seu caminho, através do canal, até as regiões do CAS. Esta última, ainda é composta por dois subsítios, um com propriedades iônicas e outro esterásica, onde se liga à ACh. Portanto, um potencial composto ChEI pode atuar em qualquer uma dessas regiões mimetizando um ligante colinérgico (FRANJESEVIC et al., 2019; ROSENBERRY et al., 2017).

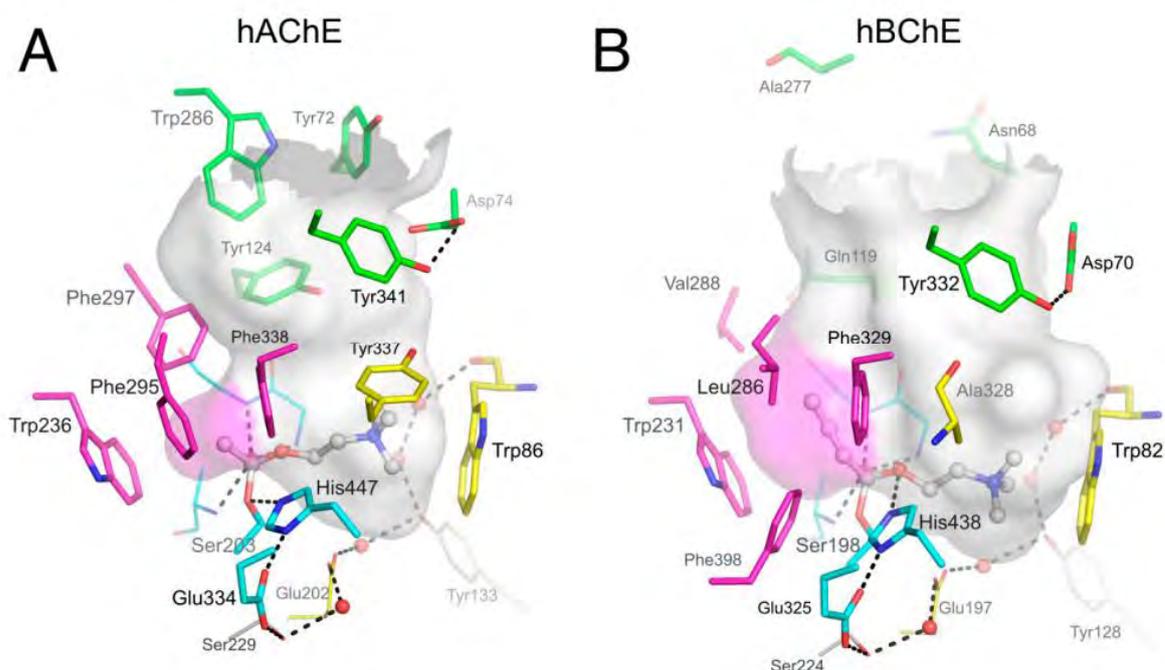


Figura 10. (A) Sítio catalítico da AChE humana (*hAChE*) (PDB ID: 4ey4); (B) BChE humana (*hBChE*) (PDB ID: 1p0i) (ROSENBERRY et al., 2017). Os principais resíduos envolvidos durante o encaixe da ACh e BCh as colinesterases são apresentados, tendo os respectivos ligantes representados na forma de bolas e *sticks*; as regiões periféricas (PAS) estão em verde, na sequência, superfícies nas cores cinza e magenta indicam, respectivamente, aminoácidos envolvidos no canal e as regiões direcionadas para interações com os fragmentos acilas dos substratos. As tríades catalíticas estão representadas na cor ciano, assim como, as moléculas de água conservadas estruturalmente, resíduos envolvidos na ligação a colina, e a rede de ligações de hidrogênio, presentes no sítio CAS, são representadas em esferas vermelhas, linhas amarelas e tracejados pretos, de modo respectivo.

Como apresentado acima, as tríades catalíticas na *hAChE* e na *hBChE* consistem em aminoácidos conservados: Ser²⁰³, His⁴⁴⁷, Glu³³⁴ e Ser¹⁹⁸, His⁴³⁸, Glu³²⁵, respectivamente. O sítio periférico concentra a região com maior discrepância entre as enzimas, dos 10 resíduos aromáticos que interagem com ligantes, incluindo os presentes no canal com interação potencial com a ACh, apenas 4 permanecem nessa região da BChE humana: Tyr³³² (Tyr³⁴¹ em AChE) no sítio PAS; e Trp⁸², Phe³²⁹ e Trp²³¹ (Trp⁸⁶, Phe³³⁸ e Trp²³⁶ em AChE) no sítio CAS. Tais características estruturais podem justificar respostas distintas a atividade inibitória de compostos frente as colinesterases, contribuindo assim, para um perfil mais seletivo considerando que a BChE acomode substratos mais volumosos (ROSENBERRY et al., 2017).

3. Compostos Heterocíclicos

Estruturas orgânicas cíclicas, especialmente as heterocíclicas, são amplamente estudadas e apontam como um dos principais grupos da química orgânica e medicinal (ALBINO et al., 2020; LI et al., 2021b). Além de sua presença marcante no mundo biológico em vitaminas, ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, hormônios, alcaloides, entre outros; a

existência crescente de diversos heterocíclicos em compostos bioativos pode estar associada aos avanços em metodologias sintéticas, como reações de acoplamento cruzado e hetero acoplamento, que permitem acesso rápido a uma ampla variedade de heterocíclicos. Assim como, fornecem compostos orgânicos com propriedades físico-químicas fármaco-similares (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020).

Um composto heterocíclico é caracterizado pela presença de ao menos um hetero átomo em seu sistema cíclico, tendo o nitrogênio (N), o oxigênio (O) e / ou o enxofre (S) como os átomos mais comuns entre os compostos naturais e sintéticos conhecidos. O estudo da química heterocíclica se concentra principalmente em derivados insaturados, não tensionados, de 5 e 6 membros, como: piridina, tiofeno, pirrol e furano (JAMPILEK, 2019). A piridina, análogo ao benzeno, tem um sistema conjugado de seis elétrons π deslocalizados sobre o anel. Em contraste com o benzeno, a densidade eletrônica não é distribuída uniformemente sobre o anel, refletindo o efeito indutivo do átomo de nitrogênio. Os compostos à base de piridina desempenham diversos papéis na química orgânica; descrições reacionais como ligantes, solventes e catalisadores sustentam os relatos que crescem anualmente para esse fragmento (KISHBAUGH, 2012; LI et al., 2021b; SILVA et al., 2022).

Outra grande classe de heterocíclicos são àqueles fundidos a anéis de benzeno. Por exemplo, os derivados do benzeno fundidos a piridina (**12**), Figura 11, como a quinolina (**13**), a 1,2,3,4-tetraidroacridina (**14**) e a acridina (**15**), são arcabouços com ampla versatilidade sintética e biológica (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; JAMPILEK, 2019; WEYESA; MULUGETA, 2020). A propósito, a química envolvendo heterocíclicos nitrogenados concentra cerca de 60% dos medicamentos aprovados pela agência reguladora FDA, sendo uma das mais importantes e exploradas no universo farmacológico (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020; VITAKU; SMITH; NJARDARSON, 2014).



Figura 11. Exemplos de heterocíclicos nitrogenados fundidos à piridina.

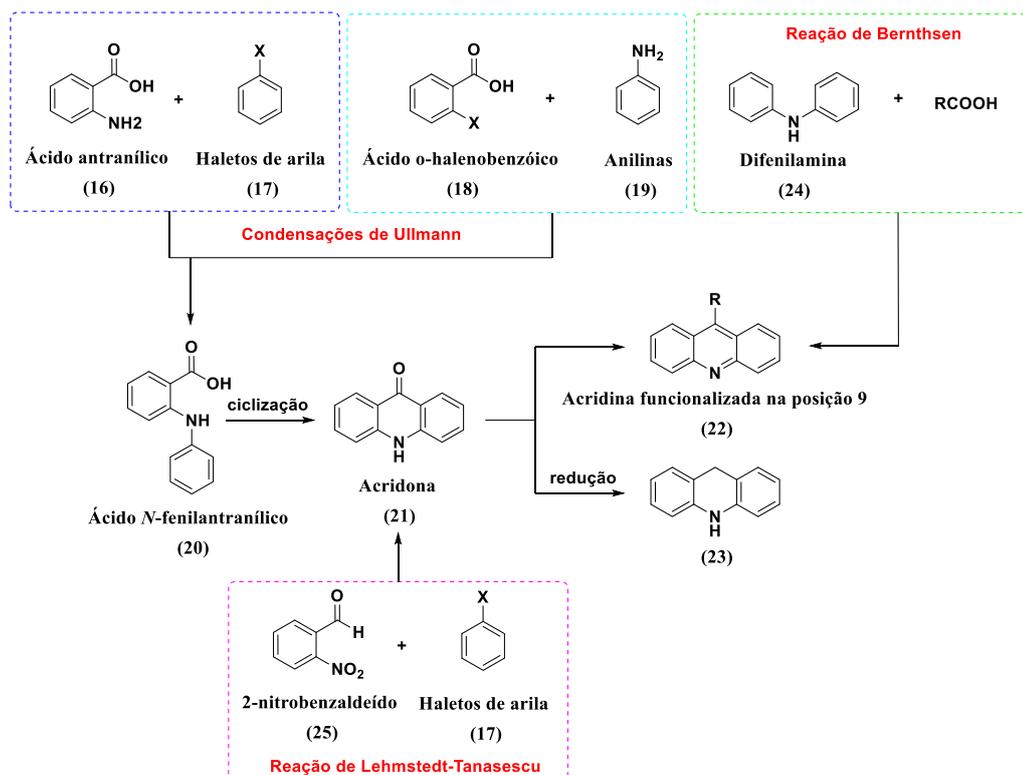
3.1 Acridinas

Dentre os derivados nitrogenados análogos ao benzeno, destaca-se o núcleo tricíclico acridina, derivado natural encontrado no alcatrão; este apresenta relatos de aplicação desde o século XIX, no qual era muito utilizado na indústria de pigmentos e corantes (PRABAKARAN et al., 2021). Físico-quimicamente, possui propriedades semelhantes ao seu precursor, a

piridina, e ao seu análogo benzênico, o antraceno, com propriedades fluorescentes (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020; RUPAR et al., 2020). Alguns métodos são conhecidos para síntese das acridinas e seus derivados, o Esquema 1 apresenta os mais aplicados na obtenção desse núcleo.

Em 1884, Bernthsen relatou a primeira síntese de acridina na qual a difenilamina foi condensada com ácido benzóico usando cloreto de zinco em temperaturas elevadas; desde então, otimizações foram propostas como a de Popp (1961)(POPP, 1962), relatando um sucesso reacional com a substituição do catalisador derivado de zinco pelo ácido polifosfórico (PPA). O uso do micro-ondas também constituiu uma evolução nas reações propostas por Bernthsen que apresentavam baixos rendimentos, elevados tempos reacionais e limitações eletrônicas dos substratos envolvidos (BENOIT, 2013; DAS; THAKUR, 2011).

As reações de condensação do tipo Ullmann-Goldberg estão entre as metodologias mais utilizadas em substituições nucleofílicas envolvendo haletos de arila e, apresentam grande relevância para a síntese dos ácidos *N*-fenilantranílicos (**20**), intermediário chave nas rotas sintéticas envolvendo as acridinas (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017). No geral, esse tipo de acoplamento C-N envolve uma catálise metálica, na qual o cobre pode polarizar a ligação carbono-halogênio e, conseqüentemente, favorecer o ataque nucleofílico inter ou intramolecular. Mecanismos para esse tipo de acoplamento ainda são discutidos e envolvem teorias como adição oxidativa e transferência de um único elétron (SHERBORNE et al., 2017). Em uma segunda etapa, os ácidos *N*-fenilantranílicos formados sofrem uma ciclização intramolecular de Friedel-Crafts catalisada por ácidos, como o sulfúrico (H₂SO₄) e o polifosfórico (PPA), originando a acridona (**21**), um intermediário sintético também muito importante, que pode ser reduzido ou funcionalizado na posição 9 do núcleo acridínico (KANCHARLA et al., 2019). Uma opção de síntese *one-pot* para a obtenção da acridona (**21**) também é descrita, e conhecida como reação de Lehmstedt-Tanasescu. Esta proposta envolve uma síntese a partir do *orto*-nitrobenzaldeído (**25**) que, na presença de haletos de arilas (**17**), em condições reacionais ácidas, forma um intermediário conhecido como benzidrol, posteriormente ciclizado, dando origem a acridona (WILEY, 2010).



Esquema 1. Rotas sintéticas descritas para obtenção do núcleo acridínico.

Biologicamente, a acridina é utilizada para obtenção de derivados com propriedades terapêuticas diversas, como apresentado na Figura 12 (RUPAR et al., 2020; SILVA et al., 2022); perfis farmacológicos com ação anti-inflamatória (SONDHI et al., 2010), anticâncer (ABBAS; AL-HARBI; SH EL-SHARIEF, 2020; DAI et al., 2020; HAIDER et al., 2019; LISBOA et al., 2019; RUPAR et al., 2020), antituberculose (MUSCIA; BULDAIN; ASÍS, 2014), antimalárica (FONTE, MÉLANIE et al., 2021), antiviral (SALAS ROJAS et al., 2021; TONELLI et al., 2011), antifúngico (GABRIEL, 2020) e inibidor de acetilcolinesterase (HAMULAKOVA et al., 2017; MAKHAEVA et al., 2017) são descritos na literatura. Comumente, esse perfil biológico é atribuído a sua estrutura semiplanar heterocíclica, que pode interagir com diferentes alvos biomoleculares (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017).

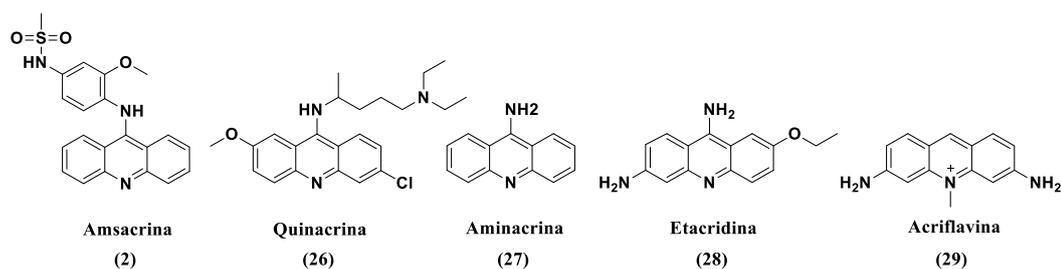


Figura 12. Derivados acridínicos biologicamente ativos utilizados na clínica.

A aplicação das acridinas como agentes antiproliferativos encontra ampla descrição na literatura. A Figura 13 apresenta os últimos relatos derivados acridínicos com atividade antitumoral, assim como os mecanismos estudados e correlacionados com a atividade encontrada. O desenvolvimento de moléculas híbridas à base de acridina vai muito além do DNA como alvo; a possibilidade de inibição da topoisomerase e da telomerase, a iniciação do estresse oxidativo mediado por ROS, a interrupção do ciclo celular e a interação com a glicoproteína P são mecanismos descritos na literatura.

Muito associado à acessibilidade sintética, a condensação na posição 9 do núcleo acridínico é a mais explorada, sendo a mais comum entre os compostos biologicamente ativos conhecidos dessa classe. As condensações laterais nessa região podem direcionar o perfil de inibição enzimático associativo a atividade já conhecida de intercalação do DNA; assim como este perfil de condensação também pode ser responsável em potencializar ou dificultar as interações do anel tricíclico da acridina aos pares de base dessa biomacromolécula (KOZURKOVA; SABOLOVA; KRISTIAN, 2021; PRASHER; SHARMA, 2018). Os compostos **32**, **34**, **35**, **36** e **37** apresentaram inibição enzimática, *in vitro*, da topoisomerase. Como um agente de dano ao DNA, um inibidor de Topo I/II pode desencadear o processo de apoptose através das cisões em sua estrutura helicoidal (ZHANG et al., 2019) e, em sua grande maioria, o bloqueio é observado na fase G2/M do ciclo celular (RUPAR et al., 2020). Ademais, os derivados acridínicos descritos apresentaram potência inibitória frente ao crescimento/proliferação de vários tipos de células tumorais. Quando avaliada, a seletividade para células tumorais foi destacada nos trabalhos de HAIDER et al. (2019) e ABBAS et al. (2020) (ABBAS; AL-HARBI; SH EL-SHARIEF, 2020; ABDEL-HAFEZ et al., 2022; DAI et al., 2020; HAIDER et al., 2019; LISBOA et al., 2020; REN et al., 2021; RUPAR et al., 2020; ZHANG et al., 2019).

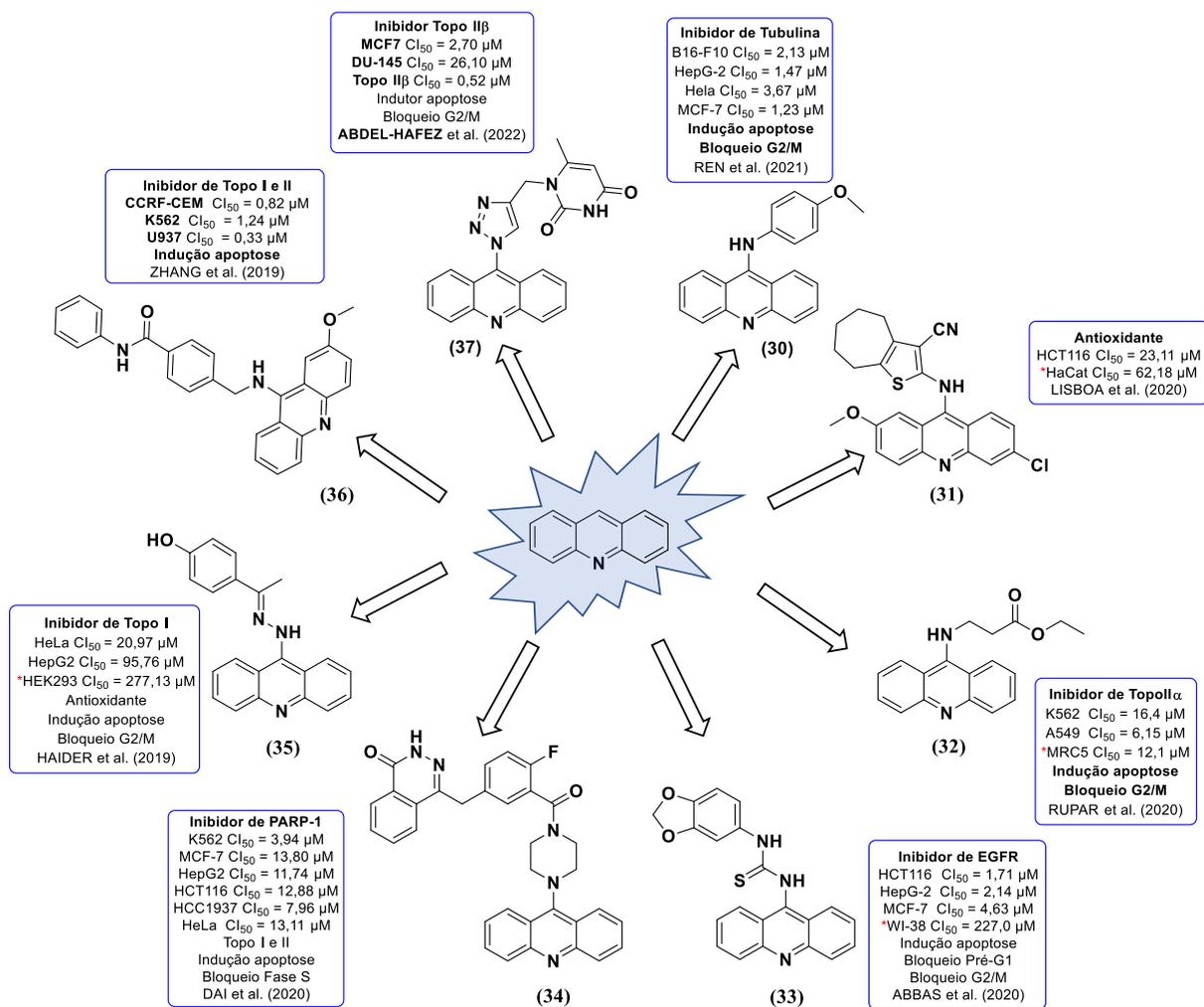


Figura 13. Derivados acridínicos com potencial atividade antiproliferativa. *citotoxicidade em células não-tumorais.

Além de propriedades antitumorais, o núcleo acridina também se destaca pelo perfil anti-DA. Este, é justificado principalmente não pela acridina em particular, mas principalmente pelo seu derivado parcialmente saturado, a tetraidroacridina (14), base estrutural da tacrina (4) (SAMEEM et al., 2017). Mesmo sendo descontinuada por seu perfil hepatotóxico, seus híbridos apresentam relevante potência correlacionada, muitas vezes, pela capacidade deste núcleo em interagir com o sítio catalítico das colinesterases. Nesse sentido, o desenvolvimento de análogos da tacrina, Figura 14, concentrou-se basicamente em condensações que apresentassem perfis adicionais como, eliminação de radicais, propriedades antioxidantes e inibição da agregação amiloide, podendo levar a um duplo benefício terapêutico, com o aumento da transmissão colinérgica e a retardação da formação das placas extracelulares neuro tóxicas (ALFADLY et al., 2019; CHALUPOVA et al., 2019; ROSSI et al., 2021). Importante mencionar, alguns dos compostos apresentaram a capacidade de empilhamento π - π de elétrons tanto nos sítios da região do CAS (40 e 41), quanto ao PAS (42) das colinesterases. Por sinal, este perfil de atuação

constitui uma importante estratégia no desenvolvimento de novas terapias frente a DA (CHUFAROVA et al., 2018; CZARNECKA et al., 2017; HAMULAKOVA et al., 2017; MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI et al., 2016; NAJAFI et al., 2016; ROSSI et al., 2021; TSENG et al., 2020).

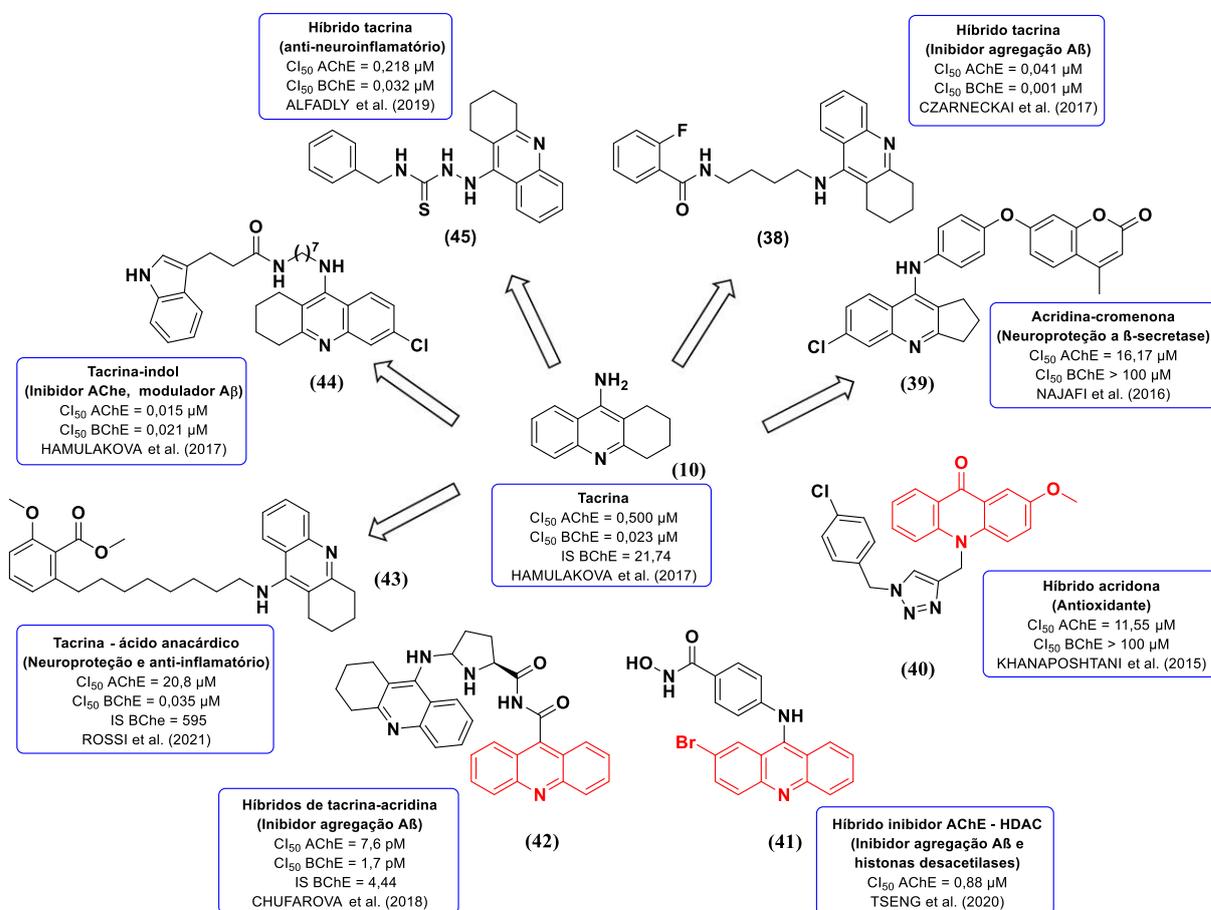


Figura 14. Derivados acridínicos com potencial atividade anticolinérgica.

CAPÍTULO I

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS ACRIDÍNICOS

Artigo publicado: Gleyton Sousa, Maria C. F. de Almeida, Lucas L. Lócio, Vanda L. dos Santos, Daniel P. Bezerra, Valdenizia R. Silva, Sinara M. V. de Almeida, Alice Simon, Thiago da S. Honório, Lucio M. Cabral, Rosane N. Castro, Ricardo O. de Moura and Arthur E. Kümmerle. Synthesis and Evaluation of Antiproliferative Activity, Topoisomerase II α Inhibition, DNA Binding and Non-Clinical Toxicity of New Acridine–Thiosemicarbazone Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1098, 2 set. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15091098>.

RESUMO

Neste estudo, é relatada a síntese de vinte novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e suas respectivas atividades antiproliferativas. Mecanismos de ação como a inibição da topoisomerase II α e a interação com o DNA foram estudados para alguns dos derivados mais ativos por meio de métodos *in silico* e *in vitro*, e avaliações das toxicidades não clínicas (*in vivo*) em camundongos. De maneira geral, os compostos apresentaram maior citotoxicidade contra células B16-F10, com maior potência para DL-08 (CI₅₀ = 14,79 μ M). Os derivados DL-01 (77%), DL-07 (74%) e DL-08 (79%) apresentaram interessante inibição da Topoisomerase II α quando comparados à amsacrina, à 100 μ M. Estudos *in silico* propuseram a forma de ligação desses compostos com a Topo II α , e uma possível razão estereo-eletrônica para ausências de atividades enzimáticas para os derivados CL-07 e DL-06. As interações com o DNA apresentaram diferentes efeitos espectroscópicos e apontaram para o composto CL-07 como o de maior afinidade pelo DNA ($K_b = 4,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K_{sv} = 2,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Adicionalmente, os compostos selecionados para teste de toxicidade não clínica não apresentaram sinais graves de toxicidade na dose de 2000 mg/kg em camundongos; testes citotóxicos realizados em células leucêmicas (K-562) e sua forma resistente (K-562 Lucena 1) identificaram ainda um perfil de potência moderada para o DL-01 e DL-8, com CI₅₀ entre 11,45 e 17,32 μ M.

Palavras-chave: Tiossemicarbazônico-acridínico; Antiproliferativa; Topoisomerase II α .

ABSTRACT

In this study, we report the synthesis of twenty new acridine–thiosemicarbazone derivatives and their antiproliferative activities. Mechanisms of action such as the inhibition of topoisomerase II α and the interaction with DNA have been studied for some of the most active derivatives by means of both in silico and in vitro methods, and evaluations of the non-clinical toxicities (in vivo) in mice. In general, the compounds showed greater cytotoxicity against B16-F10 cells, with the highest potency for DL-08 (IC₅₀ = 14.79 μ M). Derivatives DL-01 (77%), DL-07 (74%) and DL-08 (79%) showed interesting inhibition of topoisomerase II α when compared to amsacrine, at 100 μ M. In silico studies proposed the way of bonding of these compounds and a possible stereo electronic reason for the absence of enzymatic activity for CL-07 and DL-06. Interactions with DNA presented different spectroscopic effects and indicate that the compound CL-07 has higher affinity for DNA (K_b = 4.75 x 10⁴ M⁻¹; K_{sv} = 2.6 x 10³ M⁻¹). In addition, compounds selected for non-clinical toxicity testing did not show serious signs of toxicity at the dose of 2000 mg/kg in mice; cytotoxic tests performed on leukemic cells (K-562) and its resistant form (K-562 Lucena 1) identified moderate potency for DL-01 and DL-08, with IC₅₀ between 11.45 and 17.32 μ M.

Keywords: Acridine-thiosemicarbazone; Antiproliferative; Topoisomerase II α .

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo usado para um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de neoplasias malignas (MARKHAM et al., 2020), tratado como um grave problema de saúde pública e caracterizado pelo crescimento desordenado de células com alto potencial de metástase (FARES et al., 2020). Além de fatores como o envelhecimento e o crescimento da população, inúmeros agentes iniciadores e promotores de neoplasias estão presentes diariamente na vida humana, como radiação, solventes orgânicos, anticoncepcionais, bebidas, tabaco, entre outros (FARES et al., 2020; WU et al., 2018). Caracteriza-se por uma alta taxa de proliferação de células defeituosas, como resultado de alterações no material genético (ácido desoxirribonucleico, DNA) de uma ou mais células; tendo o desequilíbrio nos mecanismos reguladores da divisão celular como principal alicerce para seu desenvolvimento (DUARTE et al., 2020; HAIDER et al., 2019; SALEM et al., 2016). Entre as opções de tratamento existentes, a quimioterapia ainda é considerada uma das mais eficientes; entretanto, vários estudos relatam efeitos adversos associados ao uso de quimioterápicos (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018; SCHIRRMACHER, 2019; WU et al., 2018). Diante desses efeitos, existe a necessidade de novos tratamentos contra o câncer, visando a redução da toxicidade e uma maior eficácia.

As DNA topoisomerases (Topo) são um grupo de enzimas responsáveis pela manutenção da topologia do DNA durante processos celulares vitais, incluindo replicação, recombinação, transcrição e sistemas de reparo (MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021; RICCIO; SCHELLENBERG; WILLIAMS, 2020). Dois tipos de topoisomerases estão presentes nas funções fisiológicas dos seres vivos: a Topo I, que atua com cortes em uma das fitas do DNA, e a Topo II, com cortes na fita dupla do DNA. Em mamíferos, duas isoformas funcionalmente distintas para Topo II são encontradas: Topo II α e Topo II β (KITDUMRONGTHUM et al., 2020; MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021). Topo II α é expressa principalmente em tecidos com alta taxa de proliferação celular e células cancerígenas, tornando-se um alvo interessante para compostos anticâncer (AN et al., 2018; COSS et al., 2009; LEE; BERGER, 2019; MATIAS-BARRIOS et al., 2021; RODY et al., 2009).

Dependendo do modo de interação com a enzima, os inibidores da topoisomerase foram classificados em “venenos da topoisomerase” e inibidores catalíticos (RICCIO; SCHELLENBERG; WILLIAMS, 2020; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021). Os primeiros inibidores aumentam os níveis dos complexos de clivagem da Topo II-DNA, gerando intermediários tóxicos ao metabolismo celular, induzindo eventos mutagênicos e letais

(KETRON et al., 2012; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021); os catalíticos, diminuem a atividade da enzima, impedindo-a de formar o complexo enzima-DNA, seja pela obstrução da ligação com o DNA ou impedindo que a Topo II clive o DNA (LOBODA et al., 2020). Inúmeros inibidores da topoisomerase II foram introduzidos na clínica oncológica, como: doxorubicina, etoposídeo, vosaroxina, mitoxantrona, daunorrubicina e amsacrina (KETRON et al., 2012; KITDUMRONGTHUM et al., 2020; SKOK et al., 2020). É importante destacar que a maioria desses inibidores são bifuncionais, o que potencializa os níveis de cisão no DNA; a associação de fragmentos direcionais ao DNA e a topoisomerase II α poderia justificar a atividade anticancerígena encontrada nesses fármacos (BAILLY, 2021; HU et al., 2018; LI et al., 2017a; SKOK et al., 2020; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

Muitos trabalhos associando anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos têm sido relatados nos últimos anos (ALBINO et al., 2020; GABRIEL, 2020; KOZURKOVA; SABOLOVA; KRISTIAN, 2021; LI et al., 2021b; SILVA et al., 2022). Dentre eles, destaca-se o núcleo acridina, importante arcabouço para o desenvolvimento de quimioterápicos. Derivados acridínicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como: antibacteriana (CHEN; SEUKEP; GUO, 2020; CZARNECKA et al., 2020; GÜNDÜZ et al., 2019; MEDAPI et al., 2016), antimalária (DE M. SILVA et al., 2018; FONTE et al., 2021; KUMAR et al., 2010), antiproliferativa (ALMEIDA et al., 2016; CISÁRIKOVÁ et al., 2016; DAI et al., 2020; DUARTE et al., 2020; GAO et al., 2015; LI et al., 2017a; RUPAR et al., 2020), entre outras. Sua eficiência na intercalação entre os pares de bases do DNA, atribuída principalmente à sua planaridade, resulta na sua capacidade em inibir as enzimas topoisomerase, telomerase e o complexo proteossoma das células, justificando seu potencial contra células tumorais (ALMEIDA et al., 2016; CHEN; SEUKEP; GUO, 2020; HAIDER et al., 2019; SALEM et al., 2016).

As tiossemicarbazonas são fragmentos amplamente explorados na química medicinal como ligantes entre grupos farmacofóricos devido às suas propriedades eletrônicas e reatividade (ALMEIDA et al., 2018; HEFFETER et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020; YALOWICH et al., 2012; ZEGLIS; DIVILOV; LEWIS, 2011). Muitas atividades biológicas têm sido relatadas para este grupo, como: antibacteriana (GOVENDER et al., 2019), antimalária (MATSA et al., 2019), antiviral (PADMANABHAN et al., 2017), anticâncer (ALMEIDA et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2015; HARIBABU et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019; YALOWICH et al., 2012; ZEGLIS; DIVILOV; LEWIS, 2011), entre outras. Sua atividade antiproliferativa está frequentemente associada a sua capacidade de ligar e clivar o DNA,

induzir a apoptose e inibir enzimas celulares, bem como sua capacidade quelante frente a íons metálicos (ALMEIDA et al., 2018; HEFFETER et al., 2019; YALOWICH et al., 2012; ZEGLIS; DIVILOV; LEWIS, 2011).

Alguns estudos avaliaram o perfil antiproliferativo de derivados da acridina e quinolina condensados com fragmentos aromáticos da tiossemicarbazona substituídas (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; RIBEIRO et al., 2019). Da Silva Filho indicou importantes inibições à Topo II α para derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos; segundo os estudos teóricos apresentados, o fragmento acridínico foi capaz de se intercalar ao DNA, sendo esta, a principal característica do ancoramento molecular apontado no trabalho para justificar os resultados biológicos encontrados. Com base nesses resultados, novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos foram propostos por meio de uma estratégia de retroisosterismo (Figura 15), prevendo interações adicionais à enzima, principalmente ao resíduo Arg⁴⁸⁷, intrínseco a complexação da amsacrina (DA SILVA FILHO et al., 2019; LIMA; BARREIRO, 2005). Grupos com diferentes efeitos estéricos e eletrônicos, propostos a partir da árvore de Topliss, foram explorados nos substituintes (R) tentando entender suas interferências na atividade antiproliferativa e enzimática frente à Topo II α (RICHTER, 2017; TOPLISS, 1972). Além disso, dados os relatos biológicos de acridinas dissustituídas em fármacos como a quinacrina (EHSANIAN; VAN WAES; FELLER, 2011) e a pironaridina (BAILLY, 2021), ambos com mecanismo envolvendo DNA e Topo II, os novos compostos também foram propostos com substituições no núcleo acridínico (R₁ e R₂) (Figura 15). A partir do planejamento e síntese dos novos derivados, uma prospecção antiproliferativa foi realizada, assim como, um estudo acerca do perfil de inibição à Topo II α e interação com DNA para os compostos mais ativos. Por fim, mas não menos importante, por ser um problema recorrente entre os quimioterápicos disponíveis (AAPRO et al., 2020; NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018; PEARCE et al., 2017) e derivados de acridina (LISBOA et al., 2020; NAKAMURA et al., 2014), uma avaliação da toxicidade aguda e subcrônica em camundongos foi proposta para alguns derivados.

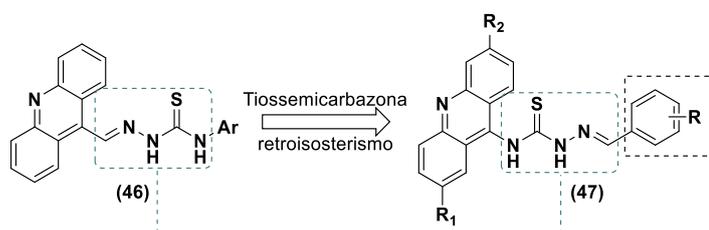
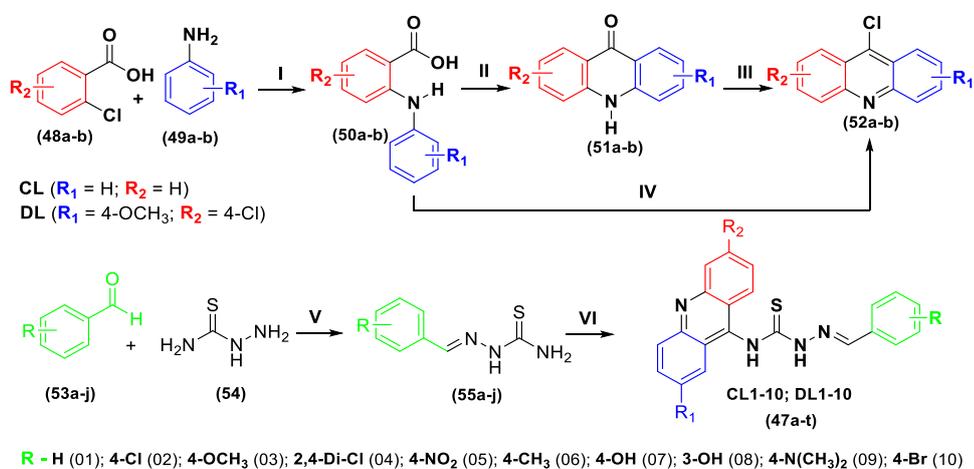


Figura 15. Planejamento estrutural dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos

Os novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (**CL-01** a **CL-10** e **DL-01** a **DL-10**; **47a-t**) foram sintetizados em quatro ou cinco etapas, dependendo da rota escolhida para o núcleo de acridina (Esquema 2). Os mecanismos reacionais propostos estão indexados no material suplementar (MS, Figuras S1 a S5) (ĆMIKIEWICZ; GORDON; BERSKI, 2018; FUI et al., 2020; KUMAR; KUMAR; PRASAD, 2013; PAUL; LADAME, 2009; SPEROTTO et al., 2010). Inicialmente, os compostos **50a-b** foram obtidos usando ácido 2-clorobenzóico **48a-b** reagido com derivados de fenilamina **49a-b** via reações de Ullmann. Em seguida, as reações de acilação de Friedel-Crafts foram conduzidas por PPA, no caso da rota através do intermediário de acridona isolado (**51a-b**), ou por cloreto de fosforila para produzir os intermediários de acridina correspondentes **52a-b** (DAI et al., 2020; KUMAR; KUMAR; PRASAD, 2013; RUPAR et al., 2020). Em paralelo, a tiossemicarbazida foi reagida com diferentes aldeídos na presença de uma quantidade catalítica de AcOH, via reação de condensação, formando derivados tiossemicarbazônicos **55a-j** (HOSSEINPOOR et al., 2020). Na última etapa, as tiossemicarbazonas obtidas na etapa anterior sofreram uma nova condensação, desta vez os núcleos de acridinas sintetizados através de uma substituição nucleofílica do tipo S_NAr gerando os compostos finais (**47a-t**) (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019). Os rendimentos dos compostos finais obtidos variaram de 74 a 92%.



I) **48** (1eq), **49** (2eq), 0,1eq Cu⁰, 2eq K₂CO₃, DMF, 120°C, 8h, 55-75%. II) **50** (1eq), PPA, 80°C, 3h, 70-80%. III) **51** (1eq), SOCl₂ (5eq), 80°C, 2h, 70-85%. IV) **50** (1eq), POCl₃ (5eq), 110°C, 3h, 60-65%. V) **53** (1eq), **54** (1eq), EtOH, AcOH, rt, 3h, 70-90%. VI) **52** (1eq), **55** (1eq), EtOH, rt, 3h, 74-92%.

Esquema 2. Síntese dos novos derivados acridínicos.

Para elucidar as estruturas químicas dos compostos sintetizados foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional ^1H e ^{13}C (MS, Figuras S6-S45), assim como, espectrometria de massas. A espectroscopia de RMN confirmou todos os hidrogênios e carbonos esperados para as estruturas dos compostos, bem como suas correlações bidimensionais. A pureza e a massa molecular dos novos derivados foram confirmadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS).

Os espectros de RMN ^1H mostraram simpletos variando de δ 9,53 – 8,93 ppm associados a hidrogênios da tiossemicarbazona, que apresentaram variações em seus deslocamentos de acordo com o tipo e força eletrônica dos substituintes em **R** do fragmento do benzilideno, bem como, com as mudanças de densidade eletrônica no núcleo de acridina devido às substituições em R_1 e R_2 . Sinais entre δ 8,72 – 6,62 ppm foram correlacionados com os hidrogênios aromáticos do núcleo da acridina e benzilideno, seguindo as características de acoplamento esperadas para cada padrão de substituição. Adicionalmente, um simpleto característico nos espectros entre δ 7,09 – 6,71 ppm foi associado ao hidrogênio metilideno da ligação imínica. A possibilidade de isômeros configuracionais, nesta região, foi descartada pela observação de um único simpleto correspondente a cada hidrogênio da ligação imínica nos espectros de RMNs ^1H . A literatura indica inúmeros relatos de preferência pelo isomerismo *E*, assim como cálculos semi-empíricos realizados para os derivados sintetizados, mostraram uma grande diferença energética entre os isômeros, indicando o isomerismo *E* como energeticamente mais estável (DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; LIU et al., 2014). Por fim, os sinais característicos para os substituintes aromáticos propostos foram encontrados e sinalizados nos respectivos espectros contidos no material suplementar (MS, Figuras S6-S45).

Os espectros de RMNs ^{13}C para os novos derivados mostraram sinais relacionados aos carbonos do grupo tiocarbonila (C=S) na região entre δ 181,1-180,0 ppm e carbonos de imina (HC=N) na região entre δ 144,9 -137,6 ppm, ambos os sinais confirmam a presença do ligante tiossemicarbazona nos derivados. Uma característica peculiar das acridinas substituídas (DL), a presença de um grupo substituinte doador de elétrons (GDE) alterou os sinais característicos nos espectros desta série; o carbono alfa (C-1) a metoxila apresentou-deslocamentos entre 99,4 e 98,4 ppm, para o carbono C-2, o efeito de desblindagem do grupo substituinte no núcleo proporcionou deslocamentos entre 159,0 e 157,9 ppm. Os sinais esperados para o grupo benzilideno após as substituições propostas foram encontrados e estão apresentados nas descrições químicas deste trabalho. Os compostos apresentaram purezas acima de 98% por CLAE-DAD, e m/z [+1] dentro do esperado pelo cálculo teórico para os novos derivados.

2.2 Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica *in vitro* dos compostos (Tabela 1) foi avaliada frente as linhagens de células cancerígenas HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e não tumoral MRC-5 (células normais de pulmão humano) utilizando o ensaio Alamar blue, após 72 h de incubação; a doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Os derivados não substituídos no núcleo de acridina foram codificados pelas letras CL e os derivados dissubstituídos DL.

Tabela 1. Atividade citotóxica para os novos derivados acridínicos.

R	Comp	CI ₅₀ (μM) ^a				Comp	CI ₅₀ (μM) ^a			
		HCT116	HepG2	B16-F10	MRC-5		HCT116	HepG2	B16-F10	MRC-5
H	CL-01	> 70	> 70	ND	> 70	DL-01	> 60	21,12	39,56	36,97
4-Cl	CL-02	> 70	> 70	ND	> 70	DL-02	> 60	> 60	30,57	> 60
4-OCH₃	CL-03	> 70	> 70	>70	> 70	DL-03	> 60	> 60	> 60	> 60
2,4-Cl	CL-04	> 60	> 60	ND	> 60	DL-04	> 60	> 60	> 60	> 60
4-NO₂	CL-05	> 60	> 60	22,71	26,78	DL-05	> 60	> 60	> 60	> 60
4-CH₃	CL-06	64,76	58,06	23,54	28,02	DL-06	> 60	33,38	26,26	> 60
4-OH	CL-07	39,67	50,66	19,83	43,40	DL-07	28,46	24,84	21,87	23,64
3-OH	CL-08	39,16	49,42	21,32	33,38	DL-08	21,33	21,28	14,79	14,36
4-N(CH₃)₂	CL-09	> 60	> 60	ND	> 60	DL-09	> 60	> 60	46,04	> 60
4-Br	CL-10	> 60	> 60	ND	> 60	DL-10	> 50	20,88	34,62	> 50
	DOX ^b	0,5	0,3	0,2	2,22	5-FU ^c	4,1	1,3	3,5	57,9

^a Os dados apresentam como valores de CI₅₀ em μM, tendo intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, através do ensaio de azul de Alamar. ^b A doxorubicina foi usada como controle positivo. ^c A citotoxicidade para 5-fluorouracil (5-FU) foi publicado por Silva et al. (2018)(SILVA et al., 2018). N.D.: Não determinado devido a problemas técnicos.

Dentre os compostos avaliados, os resultados de citotoxicidade mais promissores foram verificados para aqueles que apresentavam substituintes monovalentes não halogenados em R, destacando-se o substituinte hidroxila. A introdução deste grupo nas posições *meta* e *para* da subunidade do benzilideno proporcionou atividades, principalmente contra B16-F10, com valores de CI₅₀ entre 14,79 (DL-08) e 21,32 (CL-08) μM. DL-08 foi o derivado mais citotóxico contra as linhagens tumorais e não tumorais estudadas neste trabalho, indicando ausência de seletividade para sua atividade. Notavelmente, derivados com substituintes volumosos em R (OCH₃, NO₂, e N(CH₃)₂) causaram uma drástica redução na atividade antiproliferativa,

mostrando que o perfil estérico dos substituintes nesta posição impacta diretamente o perfil antiproliferativo desse arcabouço (DE ALMEIDA et al., 2015).

As relações estrutura-atividade (SAR) descritas para substituintes no núcleo de acridina indicaram um aumento considerável na atividade antiproliferativa com a presença de grupos fortes doadores de elétrons e fracos retiradores de elétrons nas posições 2 e 6, respectivamente (PRASHER; SHARMA, 2018). Neste trabalho, os derivados DL-07 e DL-08 aumentaram significativamente sua potência nas cepas HCT116 e HepG2, apresentando atividades antiproliferativas moderadas com CI_{50} entre 21,28 (DL-08, HepG2) e 28,46 μ M (DL-07, HCT116), quando comparado ao seu núcleo não substituído (CL) com CI_{50} entre 39,16 (CL-08, HCT116) e 50,66 μ M (CL-07, HepG2). Além disso, compostos halogenados com bromo (DL-10, CI_{50} = 20,88 μ M) e sem substituição em R (DL-01, CI_{50} = 21,87 μ M) mostraram alguma atividade contra HepG2.

2.3 Ensaio de inibição a topoisomerase II α humana

Vários estudos relatam a capacidade de derivados acridínicos em inibir topoisomerasas, sendo muitas vezes, associado como o principal mecanismo responsável pelas atividades antiproliferativas deste núcleo (ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018; KETRON et al., 2012; WOLF et al., 2009). A possibilidade dos novos derivados de acridina inibirem a Topo II α em sua função biológica de relaxamento da dupla fita do DNA foi investigada neste trabalho. Essa inibição enzimática pode ser acompanhada pela presença de uma banda de DNA superenovelada ou não enovelada, realizada com o plasmídeo pUC19, conforme mostrado na Figura 16. Neste estudo, a *m*AMSA foi utilizado como controle de inibição positiva.

Os derivados DL-01, DL-07 e DL-08 foram capazes de inibir a atividade enzimática na concentração de 100 μ M. Os valores médios de intensidade obtidos por densitometria, em correlação direta com *m*AMSA, foram usados para calcular a porcentagem de inibição enzimática para melhor analisar o efeito e estão apresentados na Tabela 2. Assim como seu precursor não substituído (**72**), o derivado DL-01 apontou interessante perfil inibitório, 77%. A ausência de substituição no núcleo de acridina (CL-07), bem como substituintes estericamente impedidos na posição *para* do anel fenil da tiossemicarbazona (DL-06), foram características associadas ao perfil não inibitório à Topo II α para essa classe de compostos (DA SILVA FILHO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019). O composto DL-08 apresentou o maior perfil inibitório com 79%, tendo o DL-07 um percentual de 74% frente à atividade enzimática.

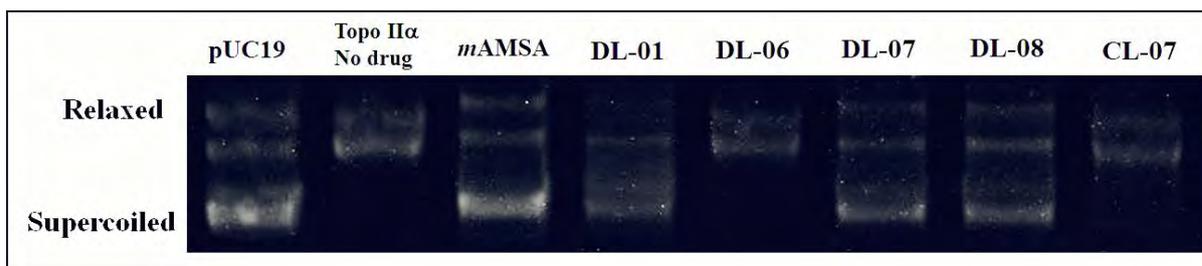


Figura 16. Efeitos da *mAMSA* e os derivados de acridina na atividade da topoisomerase II α . O pUC19 superenovelado nativo foi incubado por 30 min a 37 ° C com 2 unidades de topo II α humano na ausência (pista 2) ou na presença de ligantes a uma concentração de 100 μ M. A inibição da relaxação de DNA induzida pela supressão do papel enzimático da Topo II α pela *mAMSA* (pista 3) foi usada como controle positivo. As amostras de DNA foram executadas em um gel de agarose seguida de coloração com brometo de etídio.

Tabela 2. Atividade de inibição à Topo II α de derivados acridínicos.

Compostos	<i>mAMSA</i>	DL01	DL06	DL07	DL08	CL07
% de inibição enzimática	100	77	-	74	79	-

2.4 Ancoramento molecular

De modo a compreender os resultados observados *in vitro* para a inibição de Topo II α , estudos *in silico* foram propostos para simular um encaixe dos novos derivados a partir de um modelo cristalográfico de Topoisomerase II α Humana em complexo com DNA disponível no PDB (ID:5gwk) (WANG et al., 2017). Este estudo pode agregar conhecimentos importantes sobre o modo de ligação dos novos derivados na enzima, bem como delimitações estéreo-eletrônicas de seu sítio ativo, que podem auxiliar no entendimento da ausência de atividade para os compostos CL-07 e DL-06 (GILAD; SENDEROWITZ, 2014). Os ensaios de encaixe foram baseados no local de complexação de Topo II α com etoposídeo. A validação do estudo foi realizada tanto por estudos de *redocking* (RMSD = 0,48), quanto pela utilização da amsacrina como ligante, um controle positivo para o estudo *in vitro* com interações já descritas com a enzima, validando assim os parâmetros utilizados pelo programa *Gold* para os cálculos teóricos (DRWAL et al., 2014; SADER; WU, 2017; TORRES et al., 2019).

A amsacrina e o etoposídeo apresentam o mesmo comportamento no acoplamento com o sítio de ligação DNA-TopoII α : interagem por meio de interações polares com resíduos de aminoácidos Ser⁴⁶⁴, Asp⁴⁶³ e Arg⁴⁸⁷. Além disso, interações de empilhamento de elétrons na região do DNA com o grupo aromático substituído das estruturas potencializam a estabilização das poses de encaixe, favorecendo a afinidade pelo sítio de ligação estudado (DRWAL et al., 2014). Essas informações sobre o encaixe dos compostos de referência podem ser confirmadas na Figura 17, na qual o ancoramento da amsacrina é mostrado em comparação com o etoposídeo

e o DL-01. A pontuação de encaixe para cada composto, bem como os tipos de interações entre os ligantes e o complexo DNA-TopoII α estão descritos na Tabela 3.

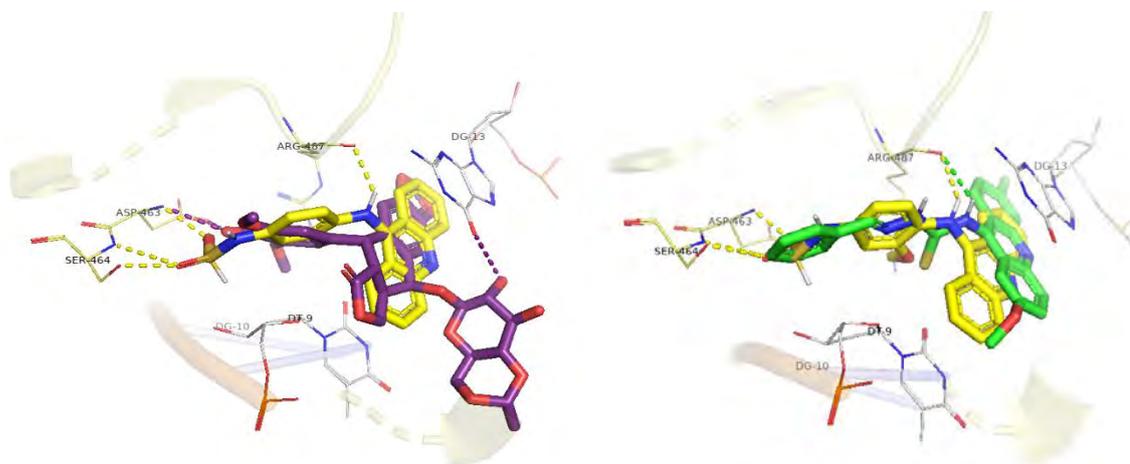


Figura 17. Pose final do ancoramento molecular para alguns fármacos e o DL-01 com DNA-TopoII α . À esquerda, conformêros finais da amsacrina (amarelo) e etoposídeo (lilás) complexados com DNA-Topo II α humana (PDB ID:5gwk); à direita, uma ilustração detalhada das interações intermoleculares do DL-01 (verde) comparado com a amsacrina. Os traços indicam as interações polares feitas por cada estrutura com o receptor e seguem suas respectivas cores.

Tabela 3. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com a DNA-TopoII α .

Compostos	Score	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	
			π -alquil	π -alquil
CL-07	82,02	T ^{9a} G ^{10a}	Arg ⁴⁸⁷	A ¹² G ¹³
DL-01	93,88	Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³
DL-06	84,01	-	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	A ¹² G ¹³
DL-07	97,98	Arg ⁴⁸⁷ T ^{9a} Ser ⁴⁶⁴ G ^{10a}	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	A ¹² G ¹³
DL-08	98,06	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ G ¹³
<i>m</i> AMSA	95,21	Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴ Arg ⁴⁸⁷	Arg ⁴⁸⁷	C ⁸ T ⁹ G ¹³
Etoposide	98,35	Asp ⁴⁶³	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³ Arg ⁴⁸⁷

^a Fragmentos de fitas de DNA.

A análise do encaixe revelou que as interações hidrofóbicas com a base nucleotídica G¹³ no fragmento F do DNA são essenciais para o ancoramento e comuns a todos os compostos. A capacidade inibitória dos compostos Topo II α depende da possibilidade de interação tanto na região específica da enzima quanto do DNA (BUZUN et al., 2020). Os derivados DL-01, DL-07 e DL-08 apresentaram, além de interações com DNA, interações polares com o resíduo Arg⁴⁸⁷, consistente com os compostos de referência estudados, com distâncias que variaram de 2,4Å (Amsacrine) a 3.0Å (DL-07). O composto DL-08 ainda apresentou interações polares com os aminoácidos da díade (Ser⁴⁶⁴-Asp⁴⁶³), e por esta razão, considerando também as interações

hidrofóbicas descritas na Tabela 3, apresentou a maior pontuação de encaixe do estudo, 98.06 (DRWAL et al., 2014; SADER; WU, 2017).

As poses finais encontradas no acoplamento dos derivados acridínicos com DNA-TopoII α são mostradas nas Figuras 17 e 18. Os resultados encontrados para os compostos CL-07 e DL-06 levantaram duas observações a serem discutidas, que podem ajudar no entendimento sobre suas baixas pontuações nos estudos teóricos e ausências de atividades enzimáticas (*in vitro*). Primeiro ponto: a interferência dos substituintes inseridos em R₁ e R₂ na força e modo de interação com o DNA; alterações nos ângulos e distâncias envolvidas principalmente no empilhamento de elétrons π - π com a base G¹³ do DNA foi perceptível quando comparado os compostos CL-07 e DL-07. A não substituição reduziu a intensidade da interação com as bases, acometendo ao encaixe uma mudança desfavorável para interações com os resíduos Arg⁴⁸⁷ e Ser⁴⁶⁴, encontradas para o composto DL-07 (YANG et al., 2018). Adicionalmente, a substituição na posição *para* do benzilideno pode ultrapassar o limite do sítio ativo apresentado pela cristalografia; neste contexto, o composto DL-06 perdeu a capacidade de interação com a díade (Ser⁴⁶⁴ e Asp⁴⁶³), falhando em realizar as interações polares encontradas, por exemplo, no DL-08 (RIBEIRO et al., 2019). Por fim, os compostos *para* hidroxí ainda apresentaram interações polares adicionais com os fragmentos de fitas do DNA, T^{9a} e G^{10a}.

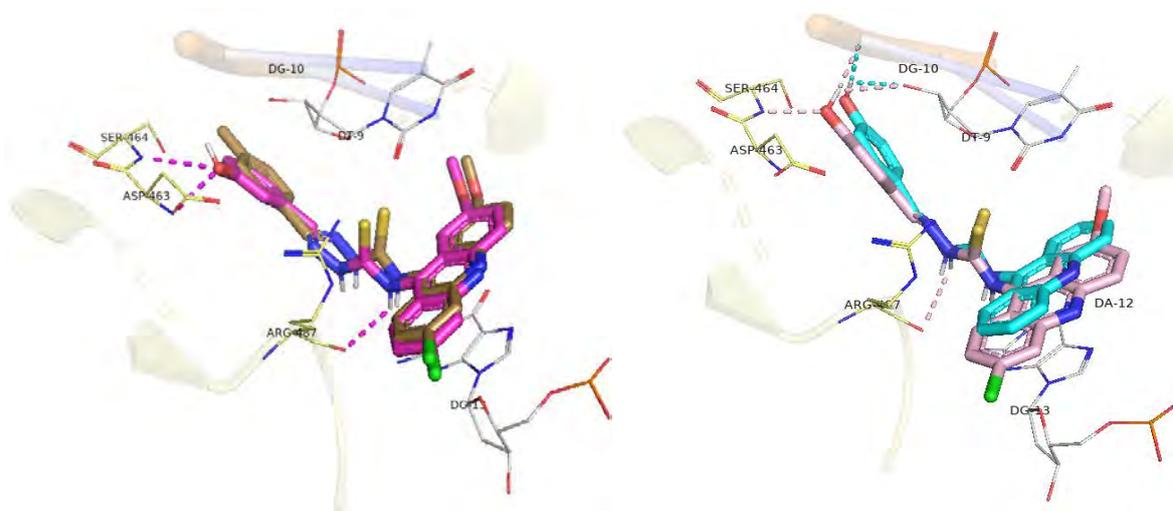


Figura 18. Pose final do ancoramento molecular para derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com DNA-TopoII α . À esquerda, confôrmeros finais do DL-06 (amarelo bronze) e DL-08 (magenta) complexados com DNA-Topo II α humana (PDB ID:5gwk); à direita, uma ilustração detalhada das interações intermoleculares do DL-07 (rosa claro) comparado com o CL-07 (ciano). Os traços indicam as interações polares feitas por cada estrutura com o receptor e seguem suas respectivas cores.

2.5 Estudos de interação com DNA

A partir dos resultados de citotoxicidade apresentados, alguns dos compostos mais ativos (CL-07, DL-01 e DL-08) foram selecionados para estudos espectroscópicos de interação com DNA. Este estudo teve como objetivo compreender a influência da intercalação de DNA na atividade encontrada, bem como as correlações entre as modificações estruturais propostas e sua afinidade com este mecanismo antiproliferativo, que é amplamente estudado para esta classe de compostos (DE OLIVEIRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019). O brometo de etídio é um agente intercalante de DNA e, neste estudo, foi utilizado como controle positivo em todas as análises espectroscópicas.

2.5.1 Ligação ao ctDNA por espectroscopia de absorção no UV-Vis

A espectroscopia de absorção é um método conveniente e simples para avaliar a ligação de micromoléculas ao DNA. A interação dos derivados acridínicos selecionados com ctDNA foi estudada na região de 220-500 nm. As constantes de ligação (K_b) foram calculadas a partir de $[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f) \text{ versus } [DNA]$, em que K_b é dado pela razão da inclinação para o intercepto (ALVES et al., 2021; KUMAR; NAIR, 2021). A Tabela 4 descreve as constantes de ligação intrínseca (K_b) exibidas pelos compostos, bem como as características atreladas ao cálculo e as alterações espectrais identificadas. Para isso, as regiões escolhidas foram as de maior intensidade de absorção acima de 300 nm, devido à menor interferência na absorção do DNA nesta região (MS, Figuras S48-S51).

Tabela 4. Propriedades absorptivas dos derivados e EtdBr na presença do ctDNA.

Compostos	Propriedades Absortivas				
	λ K_b (nm)	$\Delta\lambda$	R^2	Hipocromismo (%)	K_b (10^4) (M^{-1})
CL-07	325	3 ^a	0,9586	25,52	4,51 \pm 0,14
DL-01	320	2 ^b	0,9626	12,89	0,75 \pm 0,07
DL-08	305	3 ^b	0,9708	14,79	1,73 \pm 0,23
EtdBr	489	6 ^b	0,9652	35,15	5,56 \pm 0,19

^a Desvio hipsocrômico; ^b Desvio batocrômico.

O modo de intercalação é caracterizado por hipocromismo e batocromismo devido às interações de empilhamento π - π entre os fragmentos aromáticos e os pares de bases do DNA (ALAGESAN et al., 2014; ALSAEDI et al., 2021; BARRA et al., 2016; KUMAR; NAIR, 2021). Na adição de concentrações crescentes do ctDNA (0 a 60 μ M) foram observados efeitos hipocrômicos na absorção dos compostos (40 μ M), indicando interações com a dupla hélice do ctDNA; sendo os maiores efeitos hipocrômicos observados para os compostos hidroxilados,

CL-07 (25,52%) e DL-08 (14,79%), demonstrando que o grupo *para*-hidroxi pode potencializar as interações entre moléculas e o DNA (ALAGESAN et al., 2014). Leves desvios batocrômicos (DL-01 e DL-08) e hipsocrômicos (CL-07) ainda foram perceptíveis as análises espectroscópicas realizadas. As constantes de ligação dos compostos com o ctDNA (Kb) foram calculadas (Tabela 4), e variaram entre $0,75 \times 10^4$ (DL-01) a $5,56 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (EtdBr), nas quais os valores mais altos significam maior afinidade pelo DNA (KUMAR; NAIR, 2021). Os resultados obtidos para o controle positivo, bem como dados da literatura, sugerem que os compostos estudados se ligam à dupla hélice do DNA com afinidades moderadas e têm preferência pelo modo de intercalação (ALEKSI; KAPETANOVI, 2014; ALVES et al., 2021; JANGIR et al., 2012).

2.5.2 Dicroísmo Circular (DC)

Com base na característica quiral do DNA, avaliou-se a atividade óptica da estrutura secundária do DNA, por dicroísmo circular (DC), na presença dos novos derivados, como uma continuação no entendimento da potência e forma das interações desses compostos com o DNA (ALEKSI; KAPETANOVI, 2014; JANGIR et al., 2012; SATPATHI et al., 2015). Os derivados estudados não apresentaram alterações espectrais consideráveis de DC em solução tampão Tris-HCl (pH 7,4), sendo considerados DC inativos. A conformação helicoidal do ctDNA na forma B mostrou um espectro DC característico com uma banda positiva na região de 275-280 nm, relacionado ao empilhamento π - π entre as bases, e uma banda negativa próxima a 245 nm devido à hélice direita desta macromolécula (Figura 19) (CHATTERJEE et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019).

Quando um composto aquiral e um cromóforo interagem com o DNA, um dicroísmo circular induzido (DCI) pode aparecer dentro da banda de absorção do cromóforo assimetricamente perturbado (ALEKSI; KAPETANOVI, 2014). O DC do DNA na presença de EtdBr (60 μM , Figura 23) gerou um sinal no DC acima de 300nm, associado ao efeito hiper-crômico nas bandas características positivas e negativas. Esse resultado foi usado como padrão de potencialidade e modo de interação para o estudo (SATPATHI et al., 2015). A Figura abaixo apresenta também os espectros de DC do ctDNA (60 μM) na ausência e presença de até 60 μM dos derivados acridínicos. Em geral, nas concentrações avaliadas (20, 40 and 60 μM ; MS, Figuras S52-S55), os espectros de DC mostraram efeitos hiper-crômicos, com predomínio do desvio batocrômico para a série DL tanto nas bandas positivas quanto nas negativas, com maior sensibilidade do DNA ao aumento de [DL-08]. Para o composto CL-07, além do efeito hiper-crômico comum observado neste estudo, surgiu um perfil hipsocrômico característico à

medida que a relação $[CL-07] / [DNA]$ foi aumentada. Esses resultados confirmam a maior afinidade dos compostos DL-08 e CL-07 pelo ctDNA quando comparados ao DL-01. Em relação ao modo de interação, os maiores efeitos hipercromicos encontrados na região negativa estão associados à intercalação (ALEKSI; KAPETANOVI, 2014; ALVES et al., 2021; CHATTERJEE et al., 2015).

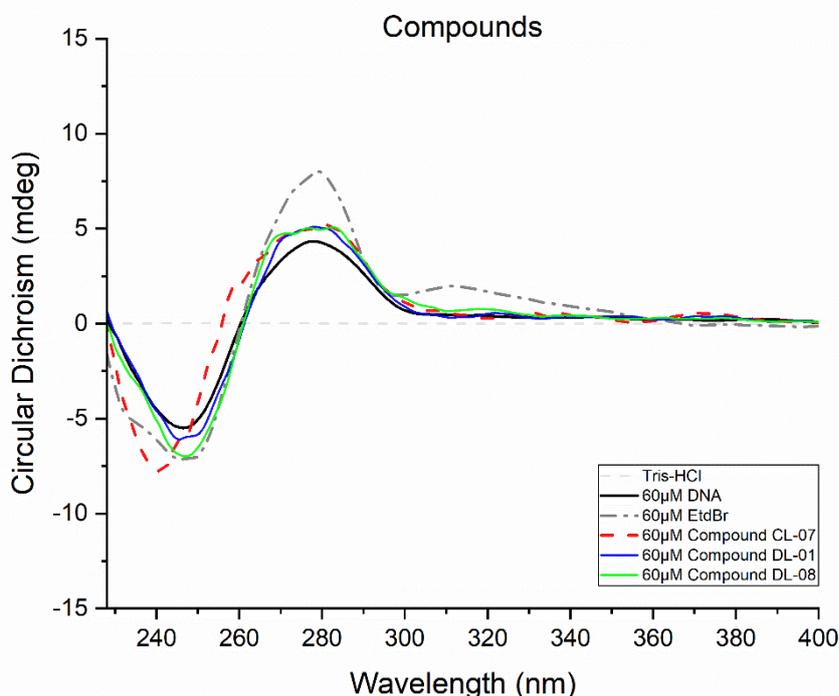


Figura 19. Dicroísmo circular do ctDNA na presença dos derivados acridínicos e EtdBr ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão Tris-HCl.

2.5.3 Estudos de competição com o EtdBr

EtdBr é um fluoróforo fraco em solvente aquoso, entretanto, tem sua fluorescência intensificada quando se liga ao DNA pelo modo intercalativo. O estudo da supressão de fluorescência com EtdBr é comumente usado para avaliar a capacidade dos compostos de interagir com o DNA, interferindo na fluorescência da interação EtdBr-DNA (ALSAEDI et al., 2021; KUMAR; NAIR, 2021). O complexo EtdBr-DNA na presença e ausência do CL-07 é mostrado na Figura 20, e a comparação da extensão de extinção entre os compostos estudados em termos de F/F_0 vs [composto] é ilustrada na Figura 21 (MS, Fig. S51-S52). Os resultados corroboraram com a ordem de grandeza apresentada em experimentos anteriores, indicando CL-07 com a maior afinidade ao DNA com uma extinção de 21,71% na razão máxima estudada de $[CL-07] / [DNA]$ (DE ALMEIDA et al., 2021).

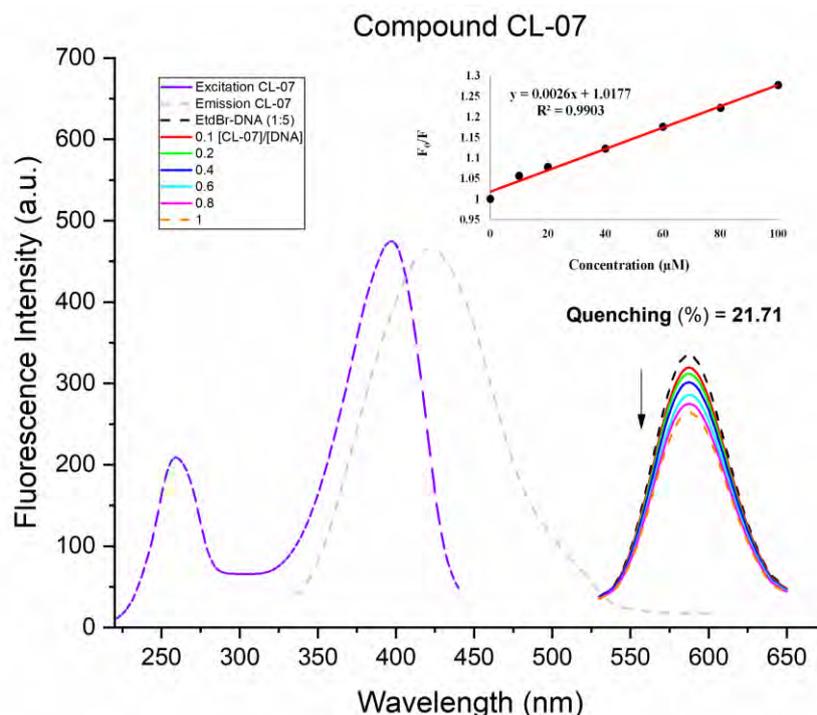


Figura 20. Espectros de emissão (excitação em 320 nm com uma faixa de observação de 330 a 600 nm) e excitação do CL-07 (emissão em 450 nm e faixa de medição de 440 a 220 nm); espectros de extinção de fluorescência do ctDNA-EtdBr após a adição do composto CL-07: [EtdBr] = 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [DNA] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (razão 1:5), [CL-07] = 0 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$).

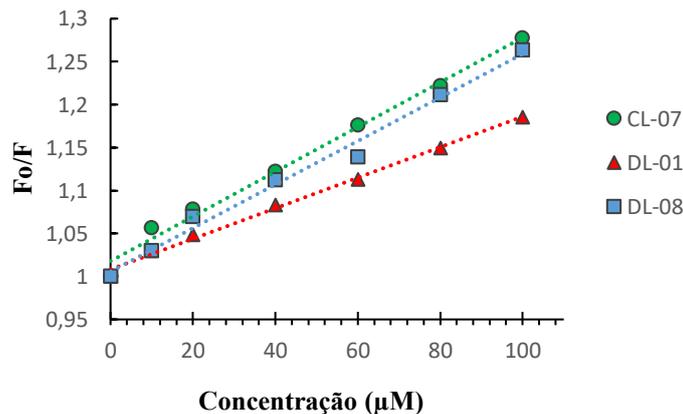


Figura 21. Intensidades de fluorescência do estado estacionário do ctDNA-EtdBr na ausência e presença dos compostos.

As constantes de extinção de Stern-Volmer calculadas (K_{sv}) (equação: $F_0/F = 1 + K_{\text{sv}}[Q]$) para os compostos, obtidos a partir de estudos de emissão competitiva com EtdBr, estão descritos na Tabela 5, na qual apresentaram valores de K_{sv} entre 1,8 e 2,6 $\times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$. Em resumo, os resultados apresentados nos estudos com ctDNA apontaram para uma maior capacidade dos compostos CL-07 e DL-08 de se intercalarem ao DNA (ALMEIDA et al., 2018, 2016), indicando que o perfil de substituição no benzilideno interfere mais na capacidade de interação dos compostos ao DNA, do que o aumento isolado da densidade eletrônica no núcleo

de acridina para as substituições avaliadas. Entretanto, os valores encontrados apontam para potência moderada ao alvo estudado, quando comparados a outros intercaladores descritos na literatura (ALSAEDI et al., 2021; WANG et al., 2013).

Tabela 5. Propriedades emissivas do ctDNA-EtdBr na presença dos derivados acridínicos.

Compostos	Propriedades emissivas		
	R ²	Quenching (%)	K _{sv} (10 ³) (M ⁻¹)
CL-07	0,9903	21,71	2,6
DL-01	0,9954	15,61	1,8
DL-08	0,9886	20,83	2,5

[EtdBr] = 20 µmol L⁻¹, [DNA] = 100 µmol L⁻¹, [Compostos] = 0 - 100 µmol L⁻¹.

2.6 Avaliação da toxicidade não clínica

Com base na baixa seletividade encontrada na citotoxicidade *in vitro*, decidiu-se realizar uma análise toxicológica pré-clínica *in vivo*, em camundongos, para entendimento exploratório sobre os perfis farmacológicos dos derivados relatados (experimento aprovado pela Comissão de ética no uso de animais - CEUA da UEPB, sob protocolo nº 008/2021). Após administração oral de derivados acridínicos em camundongos fêmeas, foram acompanhados possíveis sinais clínicos adversos e mortalidade nos grupos de animais submetidos ao estudo de toxicidade aguda (Tabela 6), bem como: massa corporal absoluta, consumo de ração e água, as massas médias dos órgãos dos animais tratados com os compostos e do grupo controle (MS, Tabelas S2 a S3) (KLASSMANN, 2013).

Tabela 6. Análise toxicológica pré-clínica *in vivo* realizadas para alguns derivados acridínicos.

Compostos	DA/TA	Mortalidade (%)	Sinais de toxicidade
CL-07	0/3	0	Nenhum
DL-01	0/3	0	Consumo de ração reduzido
DL -08	0/3	0	Esteatose hepática
NC	0/3	0	Nenhum

Grupo controle (NC), animais mortos (DA), total de animais (TA).

De acordo com os experimentos, não houve morte após administração oral dos compostos estudados na dose de 2000 mg/kg em camundongos fêmeas, no período avaliado de 14 dias. Também não houve alterações macroscópicas significativas no peso dos pulmões, fígado, rins, coração e baço entre os animais do grupo controle e os expostos aos derivados. No entanto, alterações no consumo de água dos animais tratados com DL-08 e no consumo alimentar dos tratados com DL-01 foram apontados pelas estatísticas do estudo; essa condição pode ser explicada pela possibilidade dos xenobióticos atuarem em vias que envolvem a

indução da saciedade no organismo. Em geral, os compostos apresentaram $DL_{50} > 2.000$ mg/kg, sendo incluídos na categoria V (DL_{50} , dose letal mediana, entre 2.000 e 5.000 mg/kg) pela classificação GHS (*Globally Harmonized System*), conforme a diretriz da OCDE-423. Essa classificação aponta para relativa segurança farmacológica para os novos derivados a partir dos estudos realizados (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; KIFAYATULLAH et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; TANG et al., 2020).

2.7 Ensaio de citotoxicidade em células leucêmicas normais e resistentes.

Assim como a amsacrina, derivados acridínicos e tiossemicarbazônicos também apresentaram potência frente à células leucêmicas (DE ALMEIDA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; LAROCHE-CLARY; LARRUE; ROBERT, 2000). Diante dos relatos, os derivados CL-07, DL-01 e DL-08 foram avaliados neste trabalho quanto ao seu perfil citotóxico contra células K-562 e sua forma resistente, K562-Lucena 1. Os derivados avaliados da série DL (6-cloro-2-metoxiacridina substituída) apresentaram o maior perfil de atividade contra células leucêmicas, inclusive para sua forma resistente. Destaque-se o DL-01, derivado mais potente contra a K-562 ($CI_{50} = 11,45$ μ M) e a K562-Lucena 1 ($CI_{50} = 16,46$ μ M – 2 vezes mais seletivo em comparação com a MRC-5); seguido pelo DL-08 (K-562, $CI_{50} = 17,32$ μ M; K562-Lucena 1, $CI_{50} = 17,12$ μ M). O CL-07 demonstrou um perfil citotóxico mais baixo, com CI_{50} de 45,45 e 43,39 μ M na K-562 e K562-Lucena 1, respectivamente (DE SOUSA PORTILHO et al., 2022; QUARTI et al., 2021). Curiosamente, os derivados DL-01 e DL-08 inibiram Topo II α , enquanto CL-07 não indicou esta capacidade nos estudos *in vitro* realizados, podendo este perfil justificar as diferenças nas potências encontradas entre as séries DL e CL frente aos testes citotóxicos realizados.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em resumo, vinte novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos inéditos foram sintetizados e suas estruturas químicas confirmadas com sucesso. Os novos derivados apresentaram atividade citotóxica moderada com baixa seletividade para células tumorais. Adicionalmente, alguns derivados foram avaliados quanto a capacidade de inibição a Topo II α em uma concentração de 100 μ M; DL-01, DL-07 e DL-08 foram capazes de inibir a atividade enzimática com percentuais acima de 74% quando comparados à atividade de *m*AMSA. DL-06 e CL-07 não mostraram capacidade de inibição frente a TopoII α . Estudos de ancoramento molecular mostraram que restrições estéreo-eletrônicas da cavidade enzimática direcionada a região substituída do benzilideno desses derivados, assim como, alterações no perfil eletrônico do núcleo acridínico justificariam o perfil enzimático apresentado. Três dos compostos mais citotóxicos, CL-07, DL-01 e DL-08 foram estudados por seu potencial de interação com DNA, toxicidade não clínica e citotoxicidade em células leucêmicas. O composto CL-07 apresentou maior afinidade pelo DNA, atingindo o maior valor encontrado de hipocromismo e constante de ligação (K_b) por UV-Vis, alterações mais acentuadas no DC do ctDNA e a maior constante de extinção de fluorescência (K_{sv}) frente ao sistema ctDNA-EtdBr, comparado a outros compostos estudados. Em geral, os compostos estudados não apresentaram toxicidade na concentração de 2000 mg/kg em camundongos e a análise de citotoxicidade contra as células leucêmicas estudadas indicou um perfil ativo aos derivados DL. Associados, esses resultados sugerem que a topoisomerase é um mecanismo mais eficaz para essa classe de compostos, tendo o DNA como mecanismo secundário. Os padrões de substituição explorados nos novos derivados foram fatores intrínsecos para as atividades antiproliferativas encontradas, bem como no perfil de inibição de TopoII α e afinidade com o DNA. Testes em outras linhagens de células tumorais podem ser justificados pela inibição encontrada para DNA-TopoII α (RIBEIRO et al., 2019).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados para a obtenção dos compostos foram: ácido 2-clorobenzóico, ácido 2,4-diclorobenzóico, anilina, 4-metoxianilina, benzaldeído, 4-clorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 2,4-diclorobenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-metilbenzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 3-hidroxibenzaldeído, 4-(dimetilamino)benzaldeído e 4-bromobenzaldeído. Solventes como: etanol absoluto (EtOH), 1,4-dioxano, acetonitrila, ácido acético glacial, metanol, diclorometano, acetato de etila, n-hexano. Todos os reagentes e solventes mencionados foram fornecidos pela *Sigma Aldrich* (Saint Louis, MO, EUA).

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C), realizadas em um espectrômetro da marca Bruker de 500MHz (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), modelo Ultrashield Plus da Central Analítica Multiusuário- PPGQ – UFRRJ, usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solvente e tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

A análise de cromatografia em fase gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) foi realizada em um aparelho da marca Shimadzu (GC-17A) acoplado a um detector de espectrometria de massas QP2010 Plus (Shimadzu), no modo de ionização por elétrons a 70eV e analisador do tipo quadropolo, e a varredura foi feita na faixa de massa de 40 a 400 u.m.a. As análises foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme, Agilent), no modo com divisão de fluxo (split) 30:1, com linha de transferência a 290 $^{\circ}\text{C}$, gás de arraste hélio com vazão de 1 mL.min $^{-1}$. A temperatura inicial do forno cromatográfico foi de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$, permanecendo nesta condição por 15 minutos. Os fragmentos foram descritos como razão de massa atômica por carga (m/z).

Os experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (LCMS), foram realizados em espectrômetro de massas (modelo MS 2020, Shimadzu) equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI); e constituído por duas bombas série LC-20AT, com detector de fotodiodos SPD-M20A e autojeter SIL-10A. O controle e a aquisição dos dados foram realizados através do *software* LabSolution (Shimadzu).

O MS foi operado em modo de ionização positiva, ESI (+) - MS. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (100 mm x 4.6 mm d.i. x 3 µm, Luna, Phenomenex), mantida a 40 °C, no modo isocrático. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (30%, solvente A) e metanol (70%, solvente B), com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi de 10 µL.

Os pontos de fusão foram determinados com um fusiômetro Fisatom modelo 431D (Fisatom, São Paulo, Brasil).

Os espectros UV-Vis, emissão de fluorescência e dicroísmo circular foram obtidos no espectrofotômetro JASCO J-818.

As reações foram acompanhadas através da cromatografia em camada fina (CCD), com placas de sílica gel Merk 60 F254 de 0,25 mm de espessura (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), e analisado na câmara de luz UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, France).

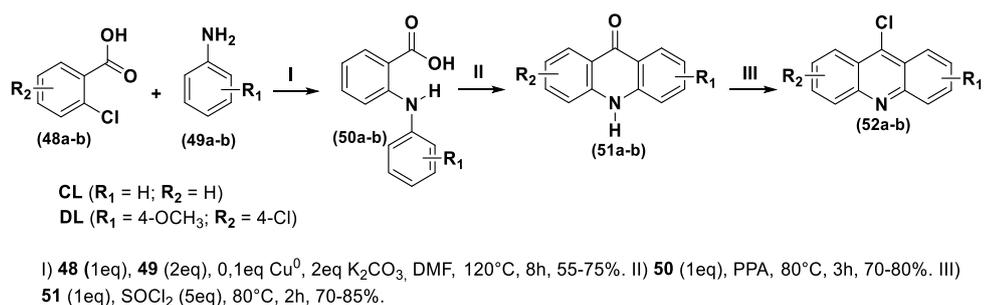
DNA de timo bovino (ctDNA), plasmídeo de DNA (pUC19), topoisomerase II α humana recombinante (p170), amsacrina e brometo de etídio (EtdBr) usados nas análises de interação foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (Saint Louis, MO, EUA). Soluções estoque dos compostos para interação com DNA foram preparadas com metanol como solvente com diluição subsequente em tampão Tris-HCl (0,1 M; pH 7,5).

4.2 Síntese dos novos derivados

4.2.1 Obtenção do núcleo de 9-cloroacridina

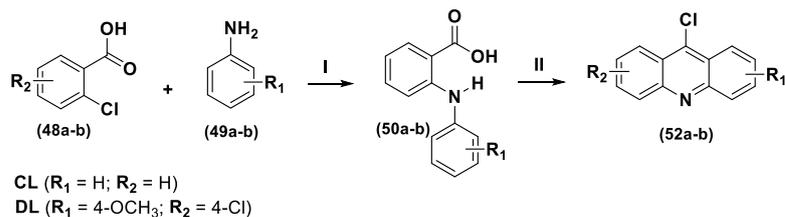
Como apresentado no esquema abaixo, a síntese do núcleo de acridina substituído ou não substituído passou por um acoplamento de Ullmann entre o ácido 2-clorobenzóico e aminas aromáticas, formando os ácidos *N*-fenilantranílicos, que sofreram uma ciclização intramolecular com o ácido polifosfórico (PPA), originando as acridonas e, por fim, o processo de cloração, formando 9-cloro acridinas. Uma solução de ácido *o*-clorobenzóico (6,0 mmol), derivado de anilina (12,0 mmol), cobre metálico (0,6 mmol) e carbonato de potássio (12,0 mmol) em DMF (20 ml) foi aquecida sob refluxo durante 8 h. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD), a mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente, vertida em água quente e fervida na presença de carvão ativado por 15 min. Em seguida, foi filtrado através de celite, e o filtrado foi acidificado com HCl para obter um produto precipitado que foi purificado por recristalização em etanol para obter produtos puros (55-75%). Depois, uma mistura de ácidos *N*-fenilantranílicos (2 mmol) e polifosfórico (20 mmol) foi aquecida a 100°C por 3 h. Após o término da reação, a mistura foi vertida em água quente (100 ml). Após

arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi alcalinizada por solução de amoníaco; os precipitados amarelos obtidos (acridonas) foram filtrados, lavados com água quente e purificados usando recristalização com ácido acético para obter os produtos puros (70-80%) (MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI et al., 2016). Por último, uma suspensão de acridona (5 mmol) em SOCl₂ (6 ml) contendo DMF (duas gotas) foi aquecida ao refluxo durante 2 h. A solução foi evaporada em rotaevaporador e traços residuais de SOCl₂ foram removidos pela adição de CH₂Cl₂ seco e evaporação completa de todos os solventes para dar o produto bruto como um sólido amarelo, sem necessidade de purificação (70-85%) (KUMAR; KUMAR; PRASAD, 2013).



Esquema 3. Obtenção do núcleo acridínico pela rota A.

Na rota alternativa B (Esquema 4), as reações de acilação de Friedel-Crafts foram conduzidas usando cloreto de fosforila (POCl₃), para a síntese do núcleo de acridina correspondente. Os derivados de ácidos *N*-fenilantranílicos (5 mmol) foram ciclizados de forma intramolecular a derivados de 9-cloroacridina por refluxo em 5 mL de POCl₃ por 4 h e a reação foi monitorada por CCD. Após o término, o excesso de POCl₃ foi removido por rotaevaporador sob pressão reduzida, à massa de reação bruta foi adicionado gelo picado, o pH foi ajustado ~ 7,0 pela adição de solução saturada de bicarbonato. O sólido separado foi filtrado, seco e purificado por cromatografia em coluna flash com sílica gel usando CH₂Cl₂:MeOH (95:5) como eluente para obter os derivados de 9-cloroacridina correspondentes (60-65%) (DAI et al., 2020; RUPAR et al., 2020).

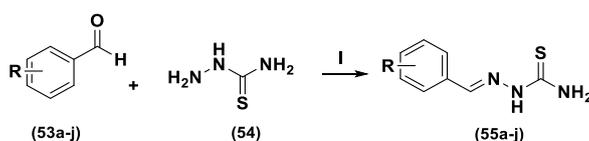


I) **48** (1eq), **49** (2eq), 0,1eq Cu⁰, 2eq K₂CO₃, DMF, 120°C, 8h, 55-75%. II) **50** (1eq), POCl₃ (5eq), 110°C, 3h, 0-65%.

Esquema 4. Obtenção do núcleo acridínico pela rota B.

4.2.2 Obtenção de intermediários de tiossemicarbazona

Os compostos intermediários de tiossemicarbazona foram obtidos por uma reação de condensação (Esquema 5). Em um balão de fundo redondo, quantidades equimolares de tiossemicarbazida (5 mmol) e aldeídos (5 mmol) reagiram em etanol absoluto (20 mL), utilizando uma quantidade catalítica de ácido acético glacial (5 gotas). A reação foi mantida sob agitação, inicialmente sob leve aquecimento (40 °C), por dez minutos, depois à temperatura ambiente por 3 h. Após a conclusão da reação, o precipitado branco resultante de tiossemicarbazona foi filtrado e o produto amorfo esbranquiçado foi obtido e cristalizado em sistema EtOH/H₂O (HOSSEINPOOR et al., 2020).



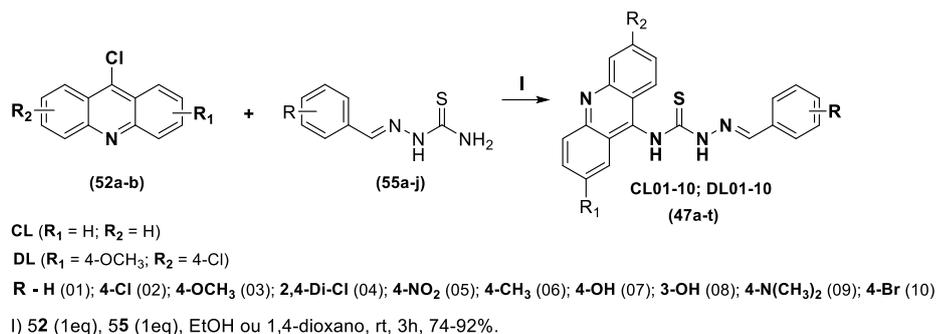
R - H (01); 4-Cl (02); 4-OCH₃ (03); 2,4-Di-Cl (04); 4-NO₂ (05); 4-CH₃ (06); 4-OH (07); 3-OH (08); 4-N(CH₃)₂ (09); 4-Br (10)

I) 53 (1eq), 54 (1eq), EtOH, AcOH, rt, 3h, 70-90%.

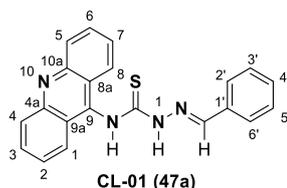
Esquema 5. Obtenção dos intermediários tiossemicarbazônicos.

4.2.3 Obtenção de derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (CL 01-10 e DL 01-10)

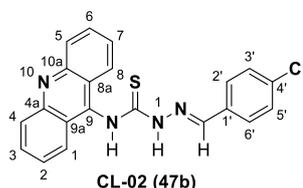
A síntese dos novos derivados de acridina-tiossemicarbazonas foi realizada através de uma reação do tipo S_NAr em proporções equimolares, Esquema 6, utilizando os núcleos de tiossemicarbazonas e acridinas como reagentes obtidos anteriormente. Uma solução de núcleo de acridinas (1,0 mmol) e intermediários de tiossemicarbazonas (1,0 mmol) em etanol (20 mL) foi aquecida sob refluxo durante 1-4 h. Alguns compostos apresentaram melhores rendimentos em 1,4-dioxano, como nos compostos hidroxilados. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD), a mistura de reação foi resfriada até a temperatura ambiente, filtrada e obtido um sólido amorfo (CL01-10 e DL01-10), que foi cristalizado em um sistema EtOH/H₂O (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019).



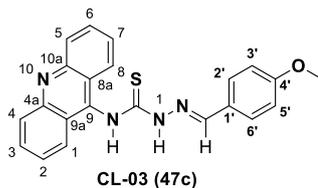
Esquema 6. Obtenção dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.



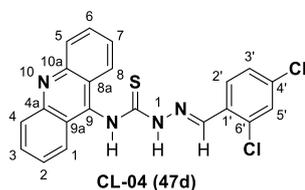
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-benzilidenohidrazina-1-carbotioamida (CL-01). Sólido laranja; rendimento: 86%. PF: 162-163 °C. R_f 0,50 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,39 (s, 1H, NH), 9,28 (s, 1H, NH), 8,58 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-4, H-5), 8,20 – 8,14 (m, 2H, H-3, H-6), 7,84 (d, $J = 4,1$ Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,78 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,40 – 7,28 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 6,98 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm: 180,74 (Cq), 144,87 (Cq), 144,42 (CH), 135,22 (CH) 133,80 (Cq), 131,08 (CH), 129,33 (CH), 128,94 (CH), 128,56 (CH), 124,99 (Cq), 124,54 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₆N₄S: 356,110; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 357 (100%); 358 (50%); 359 (15%).



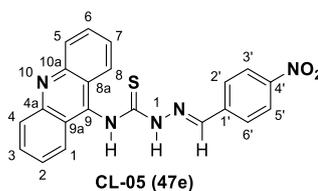
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-clorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (CL-02). Sólido laranja; rendimento: 81%. PF: 176-177 °C. R_f 0,57 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,43 (s, 1H, NH), 9,37 (s, 1H, NH), 8,59 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-4, H-5), 8,18 (dt, $J = 8,5, 4,0$ Hz, 2H, H-1, H-8), 7,90 – 7,81 (m, 6H, H-2, H-3, H-6, H-7, H-3', H-5'), 7,44 – 7,36 (m, 2H, H-2', H-6'), 7,00 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,75 (Cq), 143,18 (CH), 135,59 (Cq), 132,83 (Cq), 130,27 (CH), 129,38 (CH), 129,04 (CH), 124,94 (Cq), 124,52 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₅ClN₄S: 390,071; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 391 (100%); 392 (38%); 393 (60%).



(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-03**). Sólido laranja; rendimento: 91%. PF: 169-170 °C. R_f 0,46 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm: 9,33 (s, 1H, NH), 9,26 (s, 1H, NH), 8,61 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,19 (ddd, J = 8,6, 4,7, 3,4 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,86 (d, J = 3,6 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,74 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6,95 (s, 1H, N=CH), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 3,75 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,46 (Cq), 161,72 (Cq), 144,47 (CH), 135,45 (Cq), 130,38 (CH), 129,35 (CH), 126,39 (Cq), 125,15 (Cq), 124,70 (CH), 114,42 (CH), 55,79 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₈N₄OS: 386,120; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 387 (100%); 388 (40%); 389 (14%).

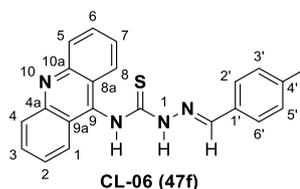


(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(2,4-diclorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-04**). Sólido amarelo mostarda; rendimento: 77%. PF: 172-173 °C. R_f 0,46 (*n*-hexano/acetato de etila, 7:3). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,49 (s, 1H, NH), 9,37 (s, 1H, NH), 8,72 (d, J = 8,72, 1H, H-2'), 8,46 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,08 (ddd, J = 8,72, 5,5, 2,5 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,82 – 7,79 (m, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,51 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,89 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 181,08 (Cq), 147,02 (Cq), 138,19 (CH), 136,18 (Cq), 134,55 (Cq), 133,67 (CH), 130,15 (CH), 129,84 (Cq), 129,59 (CH), 129,14 (CH), 128,27 (CH), 124,13 (Cq), 124,01 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₄Cl₂N₄S: 424,032; **LCMS *m/z* [M]⁺**: 425 (100%); 426 (34%); 427 (83%); 428 (20%).

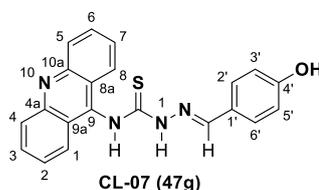


(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-nitrobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-05**). Sólido amarelo mostarda; rendimento: 78%. PF: 189 °C. R_f 0,50 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,53 (s, 1H, NH), 9,46 (s, 1H, NH), 8,53 (d, J = 8,9

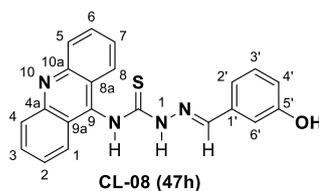
Hz, 2H, H-4, H-5), 8,17 – 8,11 (m, 4H, H-3, H-6, H-3', H-5'), 8,09 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,81 (d, J = 4,0 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,09 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 181,11 (Cq), 148,49 (Cq), 141,79 (CH), 140,20 (Cq), 129,52 (CH), 129,21 (CH), 124,63 (Cq), 124,23 (CH), 124,04 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₅Cl₂N₅O₂S: 401,095; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 402 (100%); 403 (46%).



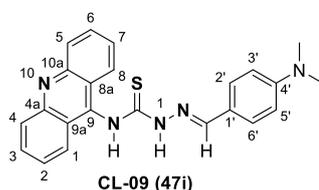
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-06**). Sólido laranja; rendimento: 90%. PF: 170-171 °C. R_f 0,45 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,36 (s, 1H, NH), 9,26 (s, 1H, NH), 8,57 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,17 (dt, J = 8,5, 4,0 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,85 (d, J = 4,0 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,68 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,14 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,94 (s, 1H, N=CH), 2,28 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,63 (Cq), 144,51 (CH), 141,06 (Cq), 135,21 (CH), 131,12 (Cq), 129,56 (CH), 129,31 (CH), 128,58 (CH), 125,04 (Cq), 124,58 (CH), 21,51 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₅Cl₂N₅O₂S: 370,125; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 371 (100%); 372 (60%); 373 (15%).



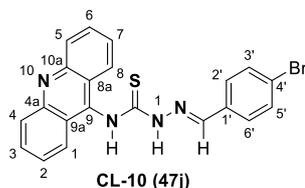
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-07**). Sólido laranja; rendimento: 91%. PF: 183-184 °C. R_f 0,43 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,26 (s, 1H, NH), 9,16 (s, 1H, NH), 8,53 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,15 (dt, 8,5, 4,0 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,83 (d, J = 3,9 Hz, 4H, H-2, H-3, H-6, H-7), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6,85 (s, 1H, N=CH), 6,69 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3', H-5'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,45 (Cq), 160,42 (Cq), 144,66 (CH), 134,93 (CH), 130,48 (CH), 129,16 (CH), 125,09 (Cq), 124,73 (Cq), 124,62 (CH), 115,81 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₆N₄OS: 372,104; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 373 (100%); 374 (26%).



(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(3-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-08**). Sólido laranja ferrugem; rendimento: 92%. PF: 145 °C. R_f 0,54 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,30 (s, 1H, NH), 9,14 (s, 1H, NH), 8,47 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,09 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,83 – 7,77 (m, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,16 (d, J = 9,3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,10 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-3'), 6,82 (s, 1H, N=CH), 6,79 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-4'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,94 (Cq), 157,95 (Cq), 144,30 (CH), 135,07 (Cq), 133,89 (CH), 129,91 (CH), 128,90 (CH), 124,77 (Cq), 124,31 (CH), 119,68 (CH), 118,20 (CH), 114,95 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₆N₄OS: 372,104; **LRMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 373 (100%); 374 (30%).

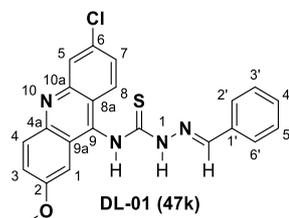


(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-(dimetilamino)benzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-09**). Sólido laranja ferrugem; rendimento: 88%. PF: 158-159 °C. R_f 0,43 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,18 (s, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, NH), 8,50 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8,11 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,85 – 7,77 (m, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,57 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6,80 (s, 1H, N=CH), 6,63 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2,92 (s, 6H, N(CH₃)₂). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,25 (Cq), 144,95 (CH), 134,36 (CH), 130,03 (CH), 128,92 (CH), 125,07 (Cq), 124,61 (CH), 112,03 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₂₁Cl₂N₅S: 399,152; **LRMS *m/z* [M]⁺** found: 400 (100%); 401 (30%).

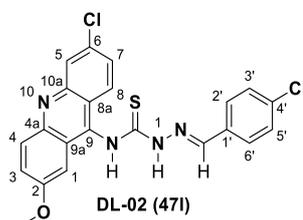


(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(4-bromobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-10**). Sólido laranja; rendimento: 78%. PF: 178-179 °C. R_f 0,43 (*n*-hexano/acetato de etila, 7:3). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,43 (s, 1H, NH), 9,36 (s, 1H, NH), 8,59 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-

4, H-5), 8,18 (dt, J = 8,6, 4,0 Hz, 2H, H-3, H-6), 7,85 (d, J = 4,0 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7,78 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,53 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,98 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,76 (Cq), 143,29 (CH), 135,19 (CH), 133,17 (Cq), 131,95 (CH), 130,47 (CH), 129,37 (CH), 124,93 (Cq), 124,52 (CH). **Pureza CLAE-DAD:** 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₅Cl₂BrN₄S: 434,020; **LRMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 435 (100%); 437 (100%).

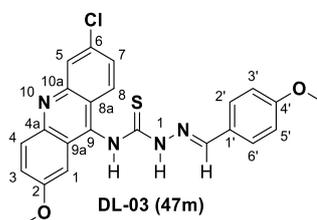


(E)-2-benzilideno-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-01**). Sólido laranja; rendimento: 74%. PF: 154-155 °C. R_f 0,54 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,16 (s, 1H, NH), 9,07 (s, 1H, NH), 8,24 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-5), 8,13 (d, J = 9,4 Hz, 1H, H-4), 7,86 – 7,80 (m, 2H, H-7, H-8), 7,67 – 7,54 (m, 3H, H-3, H-2', H-6'), 7,33 (dd, J = 9,2, 6,9 Hz, 3H, H-3', H-4', H-5'), 6,91 (s, 1H, N=CH), 6,78 (d, J = 2,7 Hz, 1H, H-1), 3,82 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,43 (Cq), 158,30 (Cq), 147,37 (Cq), 147,33 (Cq), 142,85 (CH), 138,76, 134,22, 133,44, 131,45, 130,35, 128,42 (CH), 128,11 (CH), 127,75, 126,27, 125,26, 124,98, 122,51, 122,51, 98,57 (CH), 55,67 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD:** 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄OS: 420,081; **LRMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 421 (100%); 422 (30%); 423 (40%).

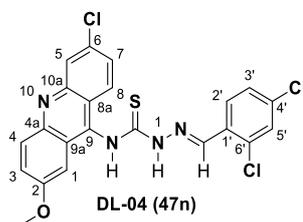


(E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-clorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-02**). Sólido laranja; rendimento: 80%. PF: 144-145 °C. R_f 0,58 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,21 (s, 1H, NH), 9,16 (s, 1H, NH), 8,32 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-5), 8,21 (d, J = 9,6 Hz, 1H, H-4), 7,87 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,72 – 7,56 (m, 3H, H-3, H-7, H-8), 7,37 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,93 (s, 1H, N=CH), 6,78 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H-1), 3,82 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,38 (Cq), 158,44 (Cq), 146,42 (Cq), 146,36 (Cq), 141,89 (CH), 139,78, 134,91, 132,44, 130,49, 129,82

(CH), 128,71, 128,47 (CH), 126,96, 126,81, 125,42, 125,12, 122,63, 98,72 (CH), 55,77 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD:** 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₆Cl₂N₄OS: 454,042; **LRMS *m/z*** [M]⁺ encontrada: 455 (100%); 456 (26%); 457 (54%).

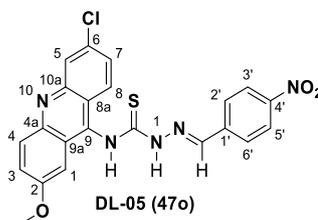


(E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-03**). Sólido laranja; rendimento: 88%. PF: 148 °C. R_f 0,46 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,16 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, NH), 8,39 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-5), 8,28 (d, J = 9,5 Hz, 1H, H-4), 7,79 – 7,69 (m, 4H, H-3, H-7, H-2', H-6'), 7,67 (d, J = 9,1 Hz, 1H, H-8) 6,92 (s, 1H, N=CH), 6,89 – 6,82 (m, 3H, H-1, H-3', H-5'), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,73 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,00 (Cq), 161,15 (Cq), 158,55 (Cq), 145,11, 144,94, 143,39 (CH), 141,68, 135,86, 129,90 (CH), 128,97, 127,89, 125,96, 125,82, 125,43, 122,98, 113,91 (CH), 99,08 (CH), 55,86 (OCH₃), 55,28 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD:** 99%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₁₉ClN₄O₂S: 450,092; **LRMS *m/z*** [M]⁺ encontrada: 451 (100%); 452 (35%); 453 (45%).



(E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(2,4-diclorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-04**). Sólido laranja; rendimento: 80%. PF: 192-193 °C. R_f 0,62 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,35 (s, 1H, NH), 9,24 (s, 1H, NH), 8,60 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-2'), 8,34 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H-5), 8,22 (d, J = 9,5 Hz, 1H, H-4), 7,72 – 7,62 (m, 2H, H-3, H-7), 7,61 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-8), 7,54 – 7,46 (m, 2H, H-3', H-5'), 6,84 (s, 1H, N=CH), 6,76 (d, J = 2,8 Hz, 1H, H-1), 3,84 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 181,07 (Cq), 159,06 (Cq), 147,89 (Cq), 138,42 (Cq), 137,64 (CH), 136,09 (Cq), 134,85 (Cq), 134,57 (Cq), 132,27, 130,02, 129,82 (Cq), 129,56, 129,29, 128,56, 128,25, 126,99, 125,27, 125,23 (Cq), 122,47 (CH), 98,87 (CH), 56,27 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD:** 99%.

Massa exata calculada para $C_{22}H_{15}Cl_3N_4OS$: 488,003; **LRMS** m/z $[M]^+$ encontrada: 489 (100%); 491 (100%); 492 (20%).

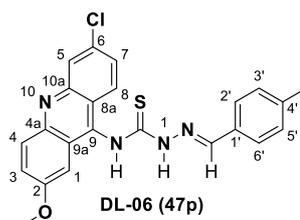


(E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-nitrobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-05**). Sólido laranja; rendimento: 86%. PF: 164-165 °C. R_f 0,61 (*n*-hexano/acetato de etila, 7:3).

RMN 1H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 9,32 (s, 1H, NH), 9,26 (s, 1H, NH), 8,29 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-5), 8,18 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, H-4), 8,13 (s, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,69 – 7,54 (m, 3H, H-3, H-7, H-8), 7,04 (s, 1H, N=CH), 6,75 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, H-1), 3,82 (s, 3H, OCH₃).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 180,67 (Cq), 158,40 (Cq), 147,88 (Cq), 147,36 (Cq), 140,60, 139,87 (CH), 138,45, 138,11, 134,27, 131,52, 129,07 (CH), 128,58, 127,80, 126,36, 125,10, 124,85, 123,47 (CH), 122,35, 98,45 (CH), 55,72 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%.

Massa exata calculada para $C_{22}H_{16}ClN_5O_3S$: 465,066; **LRMS** m/z $[M]^+$ encontrada: 466 (100%); 467 (25%); 468 (42%).

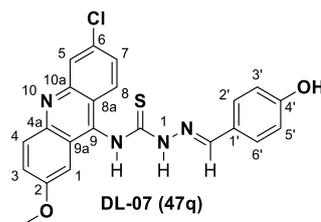


(E)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-06**). Orange solid; Yield: 90%. MP: 157-158 °C. R_f 0,60 (*n*-hexane/ethyl acetate, 7:3).

RMN 1H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 9,22 (s, 1H, NH), 9,11 (s, 1H, NH), 8,40 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-5), 8,30 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7,69 (m, 3H, H-3, H-7, H-8), 7,66 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,92 (s, 1H, N=CH), 6,83 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, H-1), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 2,26 (s, 3H, CH₃).

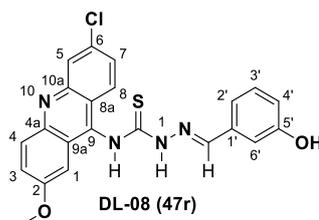
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm 180,14 (Cq), 158,59 (Cq), 145,14 (Cq), 144,99 (CH), 143,52 (Cq), 141,53 (Cq), 140,44 (Cq), 135,86 (Cq), 130,70 (CH), 129,05 (CH), 129,00, 128,14 (CH), 127,91, 125,77 (CH), 125,40, 122,94, 99,01 (CH), 55,88 (OCH₃), 21,01 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%.

Massa exata calculada para $C_{23}H_{19}ClN_4OS$: 434,097; **LRMS** m/z $[M]^+$ encontrada: 435 (100%); 436 (26%); 437 (34%).



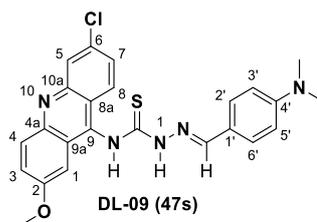
(E)-N-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida

(DL-07). Sólido laranja; rendimento: 82%. PF: 163-164 °C. R_f 0,40 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6)**: δ ppm 9,92 (s, 1H, OH), 9,04 (s, 1H, NH), 8,96 (s, 1H, NH), 8,30 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-5), 8,19 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7,65 – 7,60 (m, 4H, H-3, H-7, H-2', H-6'), 7,58 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-8), 6,76 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, H-1), 6,71 (s, 1H, N=CH), 6,67 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3,82 (s, 3H, OCH₃). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6)**: δ ppm 180,54 (Cq), 160,17 (Cq), 158,70 (Cq), 150,14, 148,05 (Cq), 148,00 (Cq), 143,55 (CH), 139,32 (Cq), 134,58 (Cq), 132,20 (CH), 130,52 (CH), 128,85 (CH), 128,48 (CH), 126,65 (CH), 125,85 (Cq), 125,59 (CH), 124,85 (Cq), 123,10 (Cq), 115,75 (CH), 99,14 (CH), 56,15 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄O₂S: 436,076; **LRMS m/z [M]⁺** encontrada: 437 (100%); 438 (30%); 439 (45%).

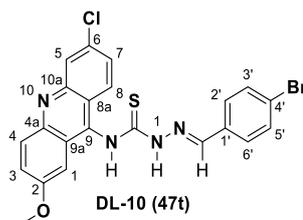


(E)-N-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(3-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida

(DL-08). Sólido laranja ferrugem; rendimento: 81%. PF: 155 °C. R_f 0,44 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6)**: δ ppm 9,21 (s, 1H, NH), 9,04 (s, 1H, NH), 8,38 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-5), 8,28 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, H-4), 7,72 (dd, $J = 9,0, 2,2$ Hz, 2H, H-3, H-7), 7,65 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-8), 7,21 – 7,16 (m, 2H, H-2', H-6'), 7,10 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-3'), 6,85 (s, 1H, N=CH), 6,84 – 6,77 (m, 2H, H-1, H-4'), 3,84 (s, 3H, OCH₃). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6)**: δ ppm 180,82 (Cq), 159,03 (Cq), 157,96 (Cq), 146,16 (Cq), 144,09 (CH), 135,90 (Cq), 135,12 (Cq), 130,29 (CH), 129,89 (CH), 129,34 (CH), 127,94 (CH), 126,64 (CH), 126,11 (Cq), 125,79 (CH), 123,32 (Cq), 119,75 (CH), 118,16 (CH), 114,98 (CH), 99,43 (CH), 56,33 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄O₂S: 436,076; **LRMS m/z [M]⁺** encontrada: 437 (100%); 438 (32%); 439 (42%).



(*E*)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-(4-(dimetilamino)benzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-09**). Sólido laranja ferrugem; rendimento: 89%. PF: 149-150 °C. R_f 0,52 (*n*-hexano/acetato de etila, 7:3). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,00 (s, 1H, NH), 8,93 (s, 1H, NH), 8,30 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-5), 8,20 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7,69 – 7,63 (m, 2H, H-3, H-7), 7,61 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-8), 7,59 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6,79 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-1), 6,73 (s, 1H, N=CH), 6,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 2,92 (s, 6H, N(CH₃)₂). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,30 (Cq), 158,76 (Cq), 151,98 (Cq), 147,54 (Cq), 147,45 (Cq), 144,24 (CH), 140,25 (Cq), 134,98 (Cq), 131,62 (CH), 130,04 (CH), 128,91 (CH), 127,93 (CH), 126,99 (CH), 126,01 (Cq), 125,79 (CH), 123,32 (Cq), 112,10 (CH), 99,40 (CH), 56,20 (OCH₃), 40,44 (N(CH₃)₂). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₄H₂₂ClN₅OS: 463,123; **LRMS m/z [M]⁺** encontrada: 464 (100%); 465 (32%); 466 (44%).



(*E*)-2-(4-bromobenzilideno)-*N*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DL-10**). Sólido laranja; rendimento: 75%. PF: 162-163 °C. R_f 0,65 (*n*-hexano/ acetato de etila, 7:3). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,22 (s, 1H, NH), 9,16 (s, 1H, NH), 8,35 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-5), 8,24 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7,79 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,67 (td, $J = 8,0, 4,4$ Hz, 2H, H-3, H-7), 7,61 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-8), 7,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,88 (s, 1H, N=CH), 6,77 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-1), 3,83 (s, 3H, OCH₃). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,94 (Cq), 158,92 (Cq), 147,25 (Cq), 142,44 (CH), 139,96 (Cq), 135,22 (Cq), 133,28 (Cq), 131,88 (CH), 131,35 (CH), 130,53 (CH), 129,15 (CH), 127,66 (CH), 127,28 (CH), 125,86 (Cq), 125,59 (CH), 124,28 (Cq), 123,11 (Cq), 99,21 (CH), 56,26 (OCH₃), **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₆BrClN₄OS: 497,992; **LCMS m/z [M]⁺** encontrada: 499 (100%); 501 (100%).

4.3 Atividade citotóxica

4.3.1 Linhagens celulares

As linhagens de células cancerosas de diferentes tipos histológicos: HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e foram cultivadas conforme recomendado pelo guia de cultura de células animais ATCC. Todas as linhagens celulares testaram negativo para micoplasma usando um kit de coloração de micoplasma (*Sigma-Aldrich*), com objetivo de validar o uso de células livres de contaminação.

4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade, a viabilidade celular foi quantificada pelo método Alamar blue (COSTA et al., 2021; SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2018). Para todos os experimentos, as células foram adicionadas em placas de 96 poços. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e adicionados a cada poço em oito concentrações seriadas variando de 0,19 a 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$; a doxorrubicina foi usada como controle positivo. Após 72 h de tratamento, 20 μL de resazurina (0,312 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias em 570 nm e 595 nm foram medidas usando um leitor de microplacas SpectraMax 190 (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração semi-inibitória (CI_{50}) foi obtida por regressão não linear com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) usando o software GraphPad Prism (*Intuitive Software for Science*; San Diego, CA, EUA).

4.4 Ensaio de inibição da topoisomerase II α humana

Para testar a capacidade de inibição a Topo II α , os compostos foram avaliados no ensaio de relaxação de plasmídeo de DNA. Este teste consiste em avaliar a atividade da enzima Topo II α na ausência e presença do composto seguido de análise de eletroforese conforme descrito anteriormente por Almeida *et al.* (2016) (ALMEIDA et al., 2016). Resumidamente, 100 ng de plasmídeo de DNA pUC19 e 4 unidades de topoisomerase II α humana recombinante (p170) em tampão de relaxamento sem ou com compostos testados foram incubados por 30 min a 37°C. As concentrações testadas foram de 100 μM e a amsacrina (*mAMSA*) foi usado como controle positivo. As reações foram terminadas com SDS 1% e digeridas com proteinase K. Em seguida, os produtos da reação foram analisados por gel de eletroforese corado com brometo de etídio e fotografados sob luz UV. A avaliação quantitativa (% de inibição enzimática por compostos sobre o controle positivo *mAMSA*) das bandas de gel correspondentes ao DNA superenovelado

foi realizada por densitometria usando software de processamento de imagem (*Scion Image, version Beta 4.0.2.*) de acordo com Gouveia et al. (2018) (GOUVEIA et al., 2018).

4.5 Ancoramento molecular

As estruturas estudadas foram primeiramente tratadas com base na teoria semi-empírica no nível PM6 usando o software Spartan 14. Após otimizados, foram submetidos ao estudo de ancoramento molecular através do programa Gold 5.8.1. A estrutura da topoisomerase humana II α em complexo com DNA (PDB ID: 5gwk) foi usada como um modelo de DNA-TopoII α (WANG et al., 2017). Para validar o estudo, o *redocking* para o alvo 5GWK foi realizado para etoposídeo em complexo com um DNA-TopoII α (RMSD = 0.48). O ancoramento molecular foi realizado considerando o receptor, DNA-TopoII α , como uma molécula rígida, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Os resultados de encaixe foram analisados e as interações intermoleculares utilizadas como parâmetros para medir a energia de afinidade com o alvo (*score*). O confômero com maior pontuação foi investigado pelo programa Pymol 2.3.2, distância e tipo de interação com a biomacromolécula foram preponderantes para análise do ancoramento molecular (DE ALMEIDA et al., 2021; GILAD; SENDEROWITZ, 2014).

4.6. Interação com o DNA

4.6.1 Espectroscopia no UV-Visível

A concentração do ácido desoxirribonucléico de timo bovino, Tipo I (ctDNA) foi determinada com base no coeficiente de extinção do sinal de absorvância a 260 nm ($6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (MANIVEL; SANGEETHA; MURALI, 2020). Todos os compostos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC) a uma concentração de 1 mmol L^{-1} (solução estoque). As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se a solução estoque em tampão Tris-HCl (pH 7,4), com concentração de $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Sob concentração otimizada, os compostos foram expostos a concentrações crescentes de ctDNA ($5 \text{ a } 60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Antes das medições, o sistema foi agitado e incubado à temperatura ambiente por 10 min. As medições foram registradas usando um espectropolarímetro JASCO J818 na faixa de 220 a 500 nm a 298 K. A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida ajustando os dados à equação abaixo (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987):

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

onde, ϵ_a , ϵ_b e ϵ_f são o coeficiente de extinção aparente para os compostos, coeficiente de extinção encontrado em sua forma livre e o coeficiente de extinção do composto quando totalmente ligado ao DNA, respectivamente. O gráfico de $[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ foi utilizado para obter o K_b a partir da razão entre a inclinação e o intercepto, conforme descrito

anteriormente na literatura (ALVES et al., 2021; BARRA et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2021). Os dados de ligação foram obtidos usando o software SigmaPlot 10.0. O estudo da possível desnaturação do DNA usando soluções metanol-tampão foi avaliado até a concentração final máxima de metanol nos ensaios (6%) (MS, 5541 e S42).

4.6.2 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros de DC do DNA na presença dos compostos foram analisados usando uma concentração fixa de DNA em 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e crescentes concentrações dos compostos (0 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As leituras foram realizadas na faixa de 215 a 400 nm, com velocidade de 200 nm/min e banda de 5 nm. Todo o estudo foi acompanhado pelo sinal de alta tensão (HT); este parâmetro indica a confiabilidade dos espectros de DC gerados, limitando o sinal de HT em até 700 volts (CHATTERJEE et al., 2015; DE ALMEIDA et al., 2021; MILES; JANES; WALLACE, 2021). Os dados de ligação foram obtidos usando o software SigmaPlot 10.0.

4.6.3 Competição de fluorescência com EtdBr

Os espectros de fluorescência do EtdBr-ctDNA na presença ou não dos derivados foram obtidos por excitação a 526 nm e varredura da emissão de 530 a 650 nm. Soluções contendo DNA EtdBr-CT (20 μM :100 μM) foram analisadas na presença de várias concentrações de derivados (10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM) em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4). Os resultados da titulação de fluorescência foram analisados usando a equação de Stern-Volmer (KEIZER, 1983) e os valores de K_{sv} do ctDNA-EtdBr na presença dos compostos calcularam a inclinação dos gráficos, onde:

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

F_0 e F representam as intensidades de fluorescência de estado estacionário de ctDNA-EtdBr na ausência e presença dos compostos, respectivamente. $[Q]$ refere-se à concentração de derivados como um supressor; e K_{sv} indica a constante de *quenching* proposta por Stern-Volmer (ALSAEDI et al., 2021; KUMAR; NAIR, 2021).

4.7 Avaliação da toxicidade não clínica

4.7.1 Estudo de toxicidade aguda (14 dias)

Um estudo de toxicidade aguda foi realizado de acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) diretriz 423 (OECD 2001) com modificações (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - BRASIL 2013) (ANVISA, 2013; OECD, 2001). Em princípio, o método não se destina a permitir um cálculo preciso da dose letal (LD_{50}), entretanto, permite uma categorização de acordo com diretrizes do Sistema

Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). Os testes foram realizados com anuência do conselho de ética da Universidade Estadual da Paraíba, sob processo nº 008/2021 aprovado em 09 de novembro de 2021. Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, foram submetidos a doses únicas orais de 2000 mg/kg dos derivados tiosemicarbazônicos acridínicos; e ao grupo controle foi administrado apenas com o veículo utilizado (solução salina de Tween 80). Para rastrear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade no Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração da substância, foi realizada observação cuidadosa para detectar possíveis sinais clínicos de toxicidade (ataxia, tremor vocal, irritabilidade, tônus corporal, tremor, salivação, lacrimejamento, ptose palpebral, convulsões, alterações comportamentais e movimentos anormais) e mortalidade dos animais nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 min e após 4 h; e diariamente por 14 dias (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2018; SALEEM et al., 2017).

4.7.2 Necropsia, análise macroscópica e peso dos órgãos

Após o período proposto para acompanhamento, os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina de 0,2 ml/100 g [8,75 ml cetamina (100 mg/ml) e 1,25 ml xilazina (10 mg/ml)] de acordo com o protocolo descrito por Flecknell (1996) (FLECKNELL, 2009). Após a eutanásia, foi realizada avaliação macroscópica da superfície corporal externa, cavidades (torácica, abdominal e craniana) e órgãos (alteração de posição, forma, tamanho, cor e consistência). O peso relativo de órgãos como o cérebro, pulmão, fígado, coração, baço e rins foram calculados usando a fórmula: $\text{Peso relativo do órgão (\%)} = (\text{peso do órgão} / \text{peso do camundongo}) \times 100$ (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2018).

4.8 Ensaio de citotoxicidade em células leucêmicas

4.8.1 Células

K562 (eritroleucêmico humano) e sua contraparte multirresistente, K562-Lucena 1, foram obtidos do Laboratório de Imunologia Tumoral (Universidade Federal do Rio de Janeiro) (RUMJANEK et al., 2001) e foram cultivadas conforme recomendado por Daflon-Yunes et al. (2013) (DAFLON-YUNES et al., 2013; QUARTI et al., 2021; RUMJANEK et al., 2001).

4.8.2 Ensaio de citotoxicidade

Os compostos CL-07, DL-01 e DL-08 foram avaliados quanto à viabilidade celular em células K562 e K562-Lucena 1 usando o método colorimétrico de tetrazólio (Mosmann, 1983) (MOSMANN, 1983). As células foram distribuídas em placas de 96 poços. Os compostos foram

dissolvidos em 1% (v/v) DMSO e RPMI-1640 *medium* (Sigma-Aldrich) em cinco concentrações seriadas de 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foram posteriormente adicionados a cada poço e incubados por 72 h a 37°C, ambiente umidificado 5% CO_2 . A estaurosporina foi utilizada como um controle positivo, 1 μM . Em seguida, as células foram tratadas com 20 μL de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, 5 mg/mL (Solução MTT em solução tampão fosfato) por 3 h. Ao final do tratamento, as absorbâncias a 562 nm foram medidas usando um iMark™ Microplate Absorbance Reader (iMark™, USA). A concentração semi-inibitória (CI_{50}) foi obtida por regressão não linear com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) usando o software GraphPad Prism (*Intuitive Software for Science*; San Diego, CA, EUA).

CAPÍTULO II

SÍNTESE E PROSPECÇÃO BIOLÓGICA ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS

RESUMO

O câncer é um grave problema de saúde pública mundial. Aspectos dinâmicos que controlam o reconhecimento molecular, considerando as interações químicas existentes, proporcionaram a Química Medicinal avanços para o seu tratamento. Híbridos da tiossemicarbazona-acridina são destacados inibidores de topoisomerases II. Neste estudo, relata-se o planejamento, síntese e avaliação antiproliferativa de dezoito novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos. A inibição da Topo II α foi prevista pelo método de ancoramento molecular, a partir dos resultados antiproliferativos obtidos. Além disso, a toxicidade não clínica (*in vivo*) em camundongos foi avaliada para o DT-3OCH₃-4OH. Em geral, os compostos apresentaram citotoxicidade de moderada a baixa na triagem realizada frente a três linhagens celulares tumorais, com destaque para a série DT-3OCH₃, que indicou atividade em cinco dos seis compostos da série. Adicionalmente, estudos frente a células leucêmicas normais e resistentes indicaram perfil destacado para os derivados DT-3OCH₃-H (CI₅₀ = 8,83 μ M) e DT-3OCH₃-3OH (CI₅₀ = 10,69 μ M) na célula resistente Lucena-1, com índice de resistência relativa (RR) de 0,11 e 0,10, respectivamente. O ancoramento molecular indicou interações com os resíduos enzimáticos Arg⁴⁸⁷ e Asp⁴⁶³ como essenciais para atividade inibitória a Topo II α . Grupos doadores de densidade eletrônica conectados ao núcleo acridínico, e a presença do grupo hidroxila do benzilideno, foram características perceptíveis aos derivados com melhores pontuações no encaixe com a TopoII α -DNA. Por fim, o composto DT-3OCH₃-4OH, selecionado para avaliação não clínica de toxicidade, não apresentou sinais graves de toxicidade na dose de 2000 mg/kg em camundongos.

Palavras-chave: Tiossemicarbazônico-acridínico; Antiproliferativa; Topoisomerase II α .

ABSTRACT

Cancer is a serious public health problem worldwide. Dynamic aspects that control molecular recognition, considering the existing chemical interactions, have provided advances in Medicinal Chemistry for its treatment. Thiosemicarbazone-acridine hybrids are prominent inhibitors of topoisomerases II. In this study, It reports the planning, synthesis and antiproliferative evaluation of eighteen new acridine–thiosemicarbazone derivatives. Inhibition of Topo II α was predicted by the molecular docking method, from the antiproliferative results obtained. In addition, non-clinical (in vivo) toxicity in mice was evaluated for DT-3OCH₃-4OH. In general, compounds showed moderate to low cytotoxicity in the first screening performed on three cell lines, with emphasis on the DT-3OCH₃ series, which indicated activity in five of the six compounds in the series. Additionally, studies against normal and resistant leukemic cells indicated an interesting profile for the derivatives DT-3OCH₃-H (IC₅₀ = 8.83 μ M) and DT-3OCH₃-3OH (IC₅₀ = 10.69 μ M) in the resistant cell Lucena-1, with relative resistance (RR) index of 0.11 and 0.10, respectively. Docking indicated interactions with the enzyme residues Arg⁴⁸⁷ and Asp⁴⁶³ as essential for Topo II α inhibitory activity. Electron density donor groups connected to the acridine nucleus, and the presence of the hydroxyl radical in the benzylidene, were perceptible characteristics of derivatives with better scores in the docking with TopoII α -DNA. Finally, the compound DT-3OCH₃-4OH, selected for non-clinical evaluation of toxicity, did not show serious signs of toxicity at the dose of 2000 mg/kg in mice.

Keywords: Acridine-thiosemicarbazone; Antiproliferative; Topoisomerase II α .

1. INTRODUÇÃO

O controle topológico do DNA é considerado crucial em todos os eventos do metabolismo genético (VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021). As topoisomerases (Topo) constituem uma classe de enzimas nucleares responsáveis pelo enovelar e desenovelar do DNA em processos biológicos, como: replicação, transcrição e segregação cromossômica (BUZUN et al., 2020). Se ligam covalentemente ao grupo fosfórico do DNA, removendo ou introduzindo tensões na sua estrutura helicoidal através de quebras em uma (Topo I) ou duas fitas (Topo II) (MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021). Diversas neoplasias malignas são caracterizadas pela superexpressão das DNAs topoisomerases do tipo II α , quando comparadas com as células de metabolismo normais (FENG et al., 2014; OGINO et al., 2020; TSAVARIS et al., 2009). Os inibidores de topoisomerases são agentes projetados para interferir na sua ação enzimática, e constituem como um importante alvo terapêutico frente ao câncer (MCKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

Os conhecidos venenos de topoisomerases compreendem o principal grupo de inibidores da enzima Topo II, sendo responsável, atualmente, por toda terapia anticâncer envolvida nesse mecanismo de ação, na clínica. Atuam como uma toxina celular ao estabilizar o complexo covalente Topo II-DNA nas células, bloqueando a replicação e transcrição do DNA, e assim, eventualmente, promovendo a apoptose celular (BUZUN et al., 2020; POMMIER et al., 2010; RICCIO; SCHELLENBERG; WILLIAMS, 2020). Os intercaladores de DNA constituem o maior grupo conhecido de inibidores Topo I/II. Derivados de antraciclina, acridinas e antraquinonas, são exemplos de classes químicas que apresentam interações não covalentes ao DNA e inibidores de Topo II, utilizados na clínica, sendo a *m*-amsacrina (*m*AMSA), considerada um padrão farmacofórico na ação citotóxica de ligação ao DNA (HMOUD ALOTAIBI; ABDALLA MOMEN, 2020; KETRON et al., 2012; RESCIFINA et al., 2014; SKOK et al., 2020; VANN; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

A Figura 22 apresenta parte de um complexo DNA-Topo II α e um modo de interação proposto com a *m*AMSA, criado a partir de um modelo disponível no PDB para o etoposídeo, outro fármaco inibidor desta enzima (ID:5gwk). Informações cristalográficas indicam a influência de resíduos como o Asp⁴⁶³ e Arg⁴⁸⁷ no encaixe e perfil enzimático entre os fármacos relatados, que, associado às interações de empilhamento de elétrons π - π entre as bases do DNA, coordenam os modelos propostos para formação de um complexo ternário estável DNA-TopoII α -ligante. Este é responsável por retardar ou impedir o processo de reclinagem natural,

desencadeando a resposta biológica pela inibição enzimática a Topo II (DA SILVA FILHO et al., 2019; DRWAL et al., 2014; MOHAMADI FARSANI et al., 2016; TYLIŃSKA et al., 2021; WENDORFF et al., 2012).

Muitos trabalhos associando anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos têm sido relatados nos últimos anos (ALBINO et al., 2020; GABRIEL, 2020; KOZURKOVA; SABOLOVA; KRISTIAN, 2021; LI et al., 2021b; SILVA et al., 2022). A Figura abaixo apresenta um heterocíclico, inibidor de Topo II α , que demonstrou perfis antiproliferativos destacados dentro da série estudada anteriormente, este foi resultado de um planejamento envolvendo um fragmento planar capaz de empilhar elétrons entre as bases do DNA, núcleo da acridina, e uma subunidade derivada da tiossemicarbazona, que apresenta destacável liberdade conformacional e capaz de realizar interações polares com a enzima (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; RIBEIRO et al., 2019).

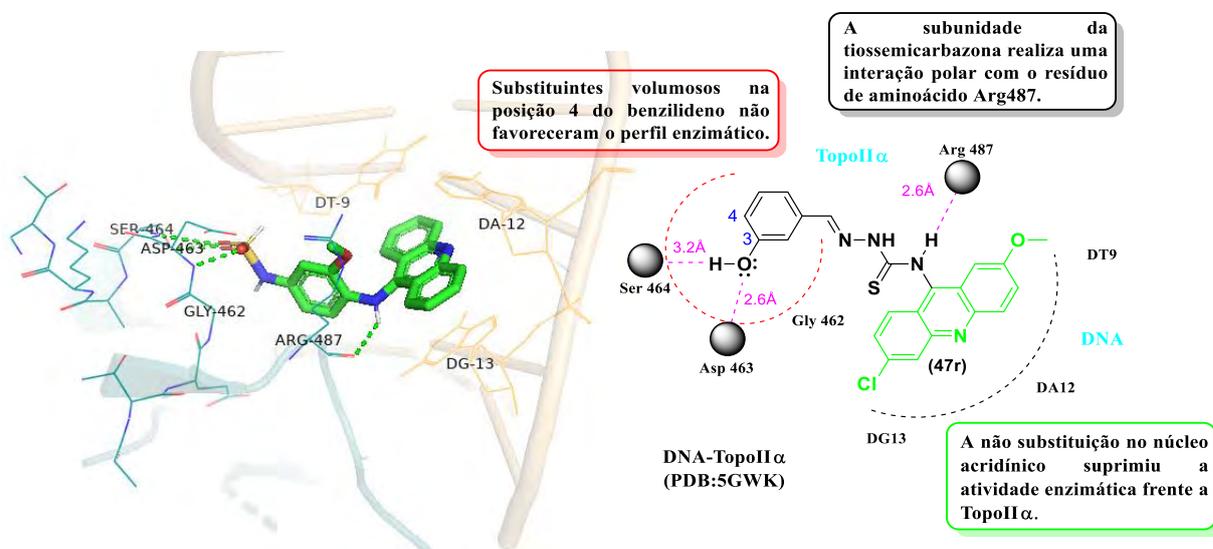


Figura 22. Análise do encaixe molecular proposto a *mAMSA* e o *DL-08* na Topo II α (PDB ID: 5gwk). À esquerda, pose de encaixe proposto para a *mAMSA* com a DNA-Topo II α . Os tracejados em verde apontam para interações polares do tipo ligação de hidrogênio; à direita, modelo farmacofórico 2D para o encaixe do composto *DL-08* na topo II α .

Informações sobre o SARs dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos estudados, fundamentaram o modelo farmacofórico apresentado acima, com propostas estereo-eletrônicas acerca da cavidade enzimática que justificariam a ausência de atividade para alguns compostos avaliados. A partir desses resultados, novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos mono substituídos no núcleo acridínico foram propostos (R₁) (Figura 23) com objetivo de avaliar a interferência desses substituintes na atividade enzimática frente a Topo II α , assim como, no seu perfil antiproliferativo (DAI et al., 2020; SINNOKROT; SHERRILL, 2004; YUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2019). A prioridade de grupos monovalentes em R, com baixo impedimento

estérico foi mantida, assim como, a proposta dos derivados hidroxilados, visto os resultados já alcançados (SOUSA et al., 2022). Estes resultados podem confirmar o modelo de estrutura-atividade criado para essa classe de derivados no capítulo 1, como inibidores da Topo II α , potencializando estudos a cerca de um possível candidato *Lead*.

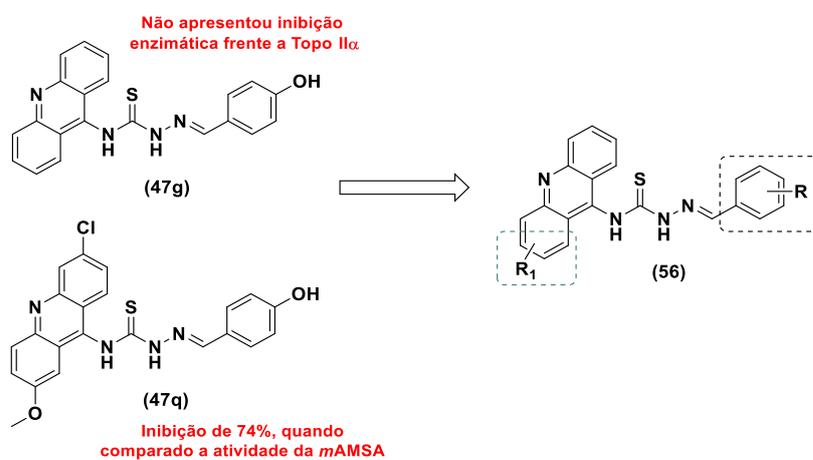
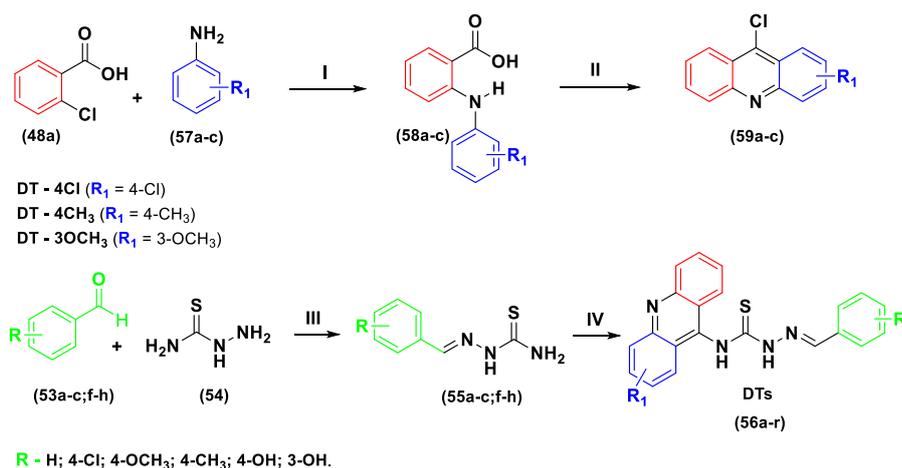


Figura 23. Planejamento estrutural dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Síntese dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos

Os novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (**DTs**) foram sintetizados em quatro etapas (Esquema 7). Primeiro, os intermediários *N*-fenilantranílicos substituídos (**58a-c**) foram obtidos usando ácido 2-clorobenzóico **48a** reagido com derivados de fenilamina **57a-c** via reações de Ullmann. Em seguida, uma acilação de Friedel-Crafts foi conduzida por cloreto de fosforila para produzir os intermediários de acridina correspondentes **59a-c** (DAI et al., 2020; KUMAR; KUMAR; PRASAD, 2013; RUPAR et al., 2020). Adicionalmente, a tiossemicarbazida foi reagida com diferentes aldeídos na presença de uma quantidade catalítica de AcOH, via reação de condensação, formando derivados tiossemicarbazônicos **55a-c;f-h** (HOSSEINPOOR et al., 2020). A preferência pelo perfil mono substituído em **R** foi considerada, dados os resultados anteriormente apresentados. Na última etapa, as tiossemicarbazonas obtidas na etapa anterior foram adicionadas aos núcleos de acridinas sintetizados através de uma substituição nucleofílica do tipo S_NAr gerando os produtos finais (**56a-r**) (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019). Os rendimentos dos novos derivados acridínicos variaram de 62 a 90%.



I) **74** (1eq), **83** (2eq), 0,1eq Cu⁰, 2eq K₂CO₃, DMF, 120°C, 8h, 55-75%. II) **84** (1eq), POCl₃ (5eq), 110°C, 3h, 60-65%. III) **79** (1eq), **80** (1eq), EtOH, AcOH, rt, 3h, 70-90%. IV) **81** (1eq), **85** (1eq), ACN:THF, rt, 1-4h, 62-90%.

Esquema 7. Síntese dos novos derivados acridínicos (**DTs**).

Para elucidar as estruturas químicas dos compostos sintetizados, foram realizadas análises de RMN uni e bidimensional ¹H e ¹³C (MS, Figuras S58-S125). Os espectros de RMN ¹H mostraram simpletos variando de δ 9,42 – 9,04 ppm, associados aos hidrogênios da tiossemicarbazona, que apresentaram variações em seus deslocamentos de acordo com o tipo e força eletrônica dos substituintes em **R** no fragmento de benzilideno, bem como, com as

mudanças de densidade eletrônica no núcleo de acridina devido às substituições em R₁. Sinais entre δ 8,59 – 6,67 ppm foram correlacionados com os hidrogênios aromáticos do núcleo da acridina e benzilideno, seguindo as características de acoplamento esperadas para cada padrão de substituição. Adicionalmente, um simpleto característico nos espectros entre δ 7,06 – 6,74 ppm foi associado ao hidrogênio metilideno da ligação imínica. A possibilidade de isômeros configuracionais nesta região foi descartada pela observação de um único sinal simpleto para cada hidrogênio de compostos no espectro de RMNs ¹H (DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; LIU et al., 2014). A presença de sinais como 2,56 e 4,10 ppm, confirmaram a presença dos grupamentos propostos em R₁ no núcleo para as moléculas da série DT-4CH₃ e DT-3OCH₃, respectivamente. Assim como, o padrão de acoplamento em *meta* (2.1 - 2.65 Hz) para o hidrogênio (H-1) alfa a ligação C-Cl na acridina, para a série DT-4Cl. Por fim, os sinais característicos para os substituintes aromáticos propostos foram encontrados e sinalizados nos respectivos espectros contidos no material suplementar.

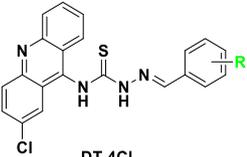
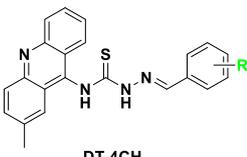
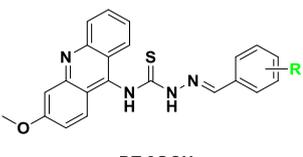
Os espectros de RMNs ¹³C, para os novos derivados, mostraram sinais relacionados aos carbonos do grupo tiocarbonila (C=S) na região entre δ 180,95 - 180,17 ppm e carbonos de imina (HC=N) na região entre δ 145,11 – 142,76 ppm, ambos os sinais confirmam a presença do ligante tiossemicarbazona nos derivados. As substituições propostas em R₁ no núcleo acridínico foram confirmadas por sinais característicos nos espectros de carbonos dos novos derivados; os efeitos eletrônicos dessas substituições acometeram alterações no perfil espectral como o sinal em 22,14, característico de metilas aromáticas, propostas aos derivados DT-4CH₃, ou ainda, sinais entre 57,38 e 57,21 ppm, característico aos derivados da série metoxilada (DT-3OCH₃). Os sinais esperados para o grupo benzilideno, após as substituições propostas, foram encontrados e estão apresentados nas descrições experimentais deste trabalho (MS, Figuras S58-S125).

2.2 Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica *in vitro* dos compostos (Tabela 7) foi avaliada frente as linhagens de células tumorais HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e não tumoral MRC-5 (células normais de pulmão humano), utilizando o ensaio Alamar blue e como controle positivo a doxorrubicina (DOX). Derivados sem substituição, metoxilados, mono halogenados e metilados em **R** foram inativos nas séries DT-4Cl e DT-4CH₃. Notavelmente, os derivados monosubstituídos metoxilados, posição 3 do núcleo acridínico (DT-3OCH₃), apresentaram os melhores perfis de

citotoxicidade. Além disso, os compostos hidroxilados na subunidade benzilidênica indicaram destacável perfil antiproliferativo nos ensaios.

Tabela 7. Atividade citotóxica para os novos derivados acridínicos.

Núcleo	R	CI ₅₀ (μM) ^a			
		HCT116	HepG2	B16-F10	MRC-5
 DT-4Cl	H	> 60	> 60	> 60	> 60
	4-Cl	> 60	> 60	> 60	> 60
	4-OCH ₃	> 60	> 60	> 60	> 60
	4-CH ₃	> 60	> 60	> 60	> 60
	4-OH	48,51	47,94	30,66	53,27
	3-OH	> 60	53,30	27,94	> 60
 DT-4CH ₃	H	> 70	> 70	> 70	> 70
	4-Cl	> 70	> 70	> 70	> 70
	4-OCH ₃	59,98	58,03	37,59	55,91
	4-CH ₃	> 70	> 70	49,77	61,31
	4-OH	33,84	40,09	49,41	50,02
	3-OH	41,08	> 70	39,44	16,65
 DT-3OCH ₃	H	26,57	23,67	38,56	33,33
	4-Cl	30,45	32,02	43,90	28,09
	4-OCH ₃	> 60	> 60	> 60	> 60
	4-CH ₃	32,79	50,81	45,83	37,06
	4-OH	13,70	18,75	46,18	18,78
	3-OH	29,84	15,12	31,26	22,63
5-FU^b		4,1	1,3	3,5	57,9
DOX^c		0,5	0,3	0,2	2,22

^a Os dados apresentam os valores de CI₅₀ em μM, tendo intervalo de confiança de 95%, obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, através do ensaio de azul de Alamar. ^b Citotoxicidade para 5-fluorouracil (5-FU) foi publicado por Silva et al. (2018)(SILVA et al., 2018). ^c Doxorubicina foi usada como controle positivo. N.D.: Não determinado.

Grupos doadores de densidade eletrônica são frequentemente adicionados ao núcleo acridínico e apresentam interessantes perfis antiproliferativos (DAI et al., 2020; YUAN et al., 2017; ZHANG et al., 2019). As relações estrutura-atividade (SAR) descritas para os substituintes avaliados no núcleo de acridina indicaram um aumento considerável na atividade antiproliferativa com a presença de grupos doadores de elétrons, principalmente na posição 3. O DT-3OCH₃-4OH foi o derivado mais citotóxico contra as cepas tumorais HCT116 e HepG2, com CI₅₀ de 13,70 e 18,75 μM, respectivamente. Entretanto, indicou uma baixa ou nenhuma seletividade para atividade antiproliferativa (MRC-5, CI₅₀ = 18,78 μM). O derivado DT-4Cl-3OH apresentou destacado perfil com valor de CI₅₀ = 27,94 μM frente a B16-F10, e não

demonstrou citotoxicidade na célula não tumoral avaliada (MRC-5, $CI_{50} > 60 \mu M$), assim como grande parte das moléculas da série, indicando que substituintes retiradores de elétrons, na acridina, diminuem o perfil citotóxico em células normais para essa classe de compostos.

A interferência eletrônica envolvida no empilhamento de elétrons π - π ainda gera amplo debate na literatura, e os perfis distintos de bioatividades encontrados nos compostos acridínicos mono substituídos podem estar relacionados a distintas forças e/ou interações com os receptores biológicos. Modelos como o de Hunter-Sanders sugerem que o perfil retirador de elétrons de substituintes halogenados seriam favoráveis a empilhamentos envolvendo elétrons, por diminuir o impedimento estérico envolvido na aproximação dos orbitais. Entretanto, outros estudos propõem que o aumento da densidade eletrônica também poderia ser favorável a esse tipo de “sanduíche” de elétrons, propiciando uma maior interação. O fato deste trabalho utilizar ambos os perfis eletrônicos, e estes apresentarem diferentes perfis bioativos, pode servir de fundamento para esses estudos de empilhamento π - π por trás das atividades antitumorais em novos derivados acridínicos-tiossemicarbazônicos (HUNTER; SANDERS, 1990; SINOKROT; SHERRILL, 2004; VILKOVÁ et al., 2022; WHEELER, 2013).

2.3 Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia mieloide crônica.

A severidade da leucemia, principalmente em adultos, é frequentemente associada a elevada taxa de reincidência da doença em formas resistentes após exposição a quimioterápicos, baixos percentuais de sobrevida (25 – 40%) são comuns a esse tipo de câncer (LOMONACO; KOIFMAN; FREIRE, 2021; QUEIROZ et al., 2010). Buscar opções terapêuticas contra essas formas celulares resistentes continuam sendo um desafio, justificado pela grande redução de atividade das terapias existentes. Como exemplo, a linhagem Lucena-1 linha parental da K562, é cerca de 35 vezes mais resistente a DOX ($K562 CI_{50} = 1,16 \mu M$; $Lucena-1 CI_{50} = 40,78 \mu M$) (GONZÁLEZ et al., 2017).

Como forma de varredura do perfil citotóxico para os novos derivados, ensaios biológicos foram realizados frente a linhagens celulares de leucemia mieloide crônica normal (K562) e resistentes (Lucena-1 e FEPS). Estes foram justificados pelo destacado perfil biológico de derivados tiossemicarbazônicos na K562 (DE ALMEIDA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2015, 2017; SOUSA et al., 2022), assim como, pelo perfil de aplicação do fármaco precursor do arcabouço (amsacrina) na clínica (KETRON et al., 2012). A Tabela 8 apresenta os resultados citotóxicos para os derivados testados frente a linhagens leucêmicas. Vislumbrando uma melhor compreensão do perfil da série mais ativa (DT-3OCH₃), todos os

compostos da série seguiram para o teste, como também, os derivados hidroxilados na posição meta (avaliação direta do perfil e posição da substituição no núcleo acridínico).

Tabela 8. Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia mieloide crônica

Compostos	CI ₅₀ (μM) ^a				
	K562	Lucena-1	RR ^b	FEPS	RR ^b
DT-4Cl-3OH	66,46 (±1,27)	> 200	-	36,96 (±1,33)	0,60
DT-4CH ₃ -3OH	104,00 (±1,43)	81,45 (±1,64)	0,78	95,09 (±1,30)	0,91
DT-3OCH ₃ -H	76,55 (±1,47)	8,83 (±1,23)	0,11	55,75 (±1,47)	0,73
DT-3OCH ₃ -4Cl	19,67 (±1,56)	54,75 (±1,25)	2,78	29,42 (±1,33)	1,50
DT-3OCH ₃ -4OCH ₃	46,83 (±1,44)	51,69 (±1,26)	1,10	59,16 (±1,33)	1,26
DT-3OCH ₃ -4CH ₃	45,78 (±1,37)	> 200	-	50,75 (±1,40)	1,11
DT-3OCH ₃ -4OH	81,66 (±1,28)	69,15 (±1,32)	0,85	26,61 (±1,36)	0,33
DT-3OCH ₃ -3OH	110,93 (±1,17)	10,69 (±1,52)	0,10	42,55 (±1,31)	0,38
Imatinibe	0,13 ^c	-	-	9,66 ^c	74,31
Doxorrubicina	1,16 ^d	40,78 ^d	35,15	-	-
Vincristina	0,054 ^e	0,85 ^e	15,74	1,05 ^e	19,44
Cisplatina	2,83 ^f	6,07 ^f	2,15	7,41 ^f	2,62

^aOs dados apresentam os valores de CI₅₀ em μM, tendo intervalo de confiança de 95%, obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, pelo método de redução de MTT; ^bResistência relativa (RR): razão (CI₅₀ célula RMD) / (CI₅₀ célula parental) ^c(DANIEL et al., 2022); ^d(GONZÁLEZ et al., 2017); ^e(PITASSE-SANTOS et al., 2022); ^f(SALUSTIANO et al., 2020).

Os resultados citotóxicos indicaram baixa potência citotóxica dos derivados frente a linhagem K562. Entretanto, a comparação com os padrões de atividades de alguns fármacos (Tabela 8) fornece um interessante panorama acerca dos perfis biológicos apresentados pelos derivados acridínicos frente a células resistentes a múltiplas drogas (RMD). Quando consideramos a linhagem celular resistente Lucena-1, os derivados DT-3OCH₃-H e DT-3OCH₃-3OH se destacaram entre os estudados com CI₅₀ de 8,83 e 10,69 μM, respectivamente. Estes resultados, quando comparados ao encontrado para o fármaco DOX (CI₅₀ = 40,78 μM), indicam ganho de potência em cerca de quatro vezes para os novos derivados citados. Ademais, frente a linhagem resistente FEPS destacou-se o composto DT-3OCH₃-4OH com CI₅₀ = 26,61 μM com maior perfil ativo.

O índice de resistência relativa (RR) foi calculado como a razão entre os perfis biológicos na célula resistente, comparados ao parental (K562). Valores de RR > 2,00 indicam um perfil de resistência a drogas, enquanto RR < 0,50 indica um perfil de sensibilidade colateral (SC). O aumento no perfil de SC pode ser um interessante mecanismo associativo durante regimes quimioterápicos tidos como padrões, sua atuação pode estar relacionada ao controle

(prevenção) e/ou ainda morte seletiva de células RMD em uma população tumoral heterogênea (PITASSE-SANTOS et al., 2022; PLUCHINO et al., 2012). Dado o baixo perfil biológico encontrado frente a linhagem parental (K562), os compostos DT-3OCH₃-H (RR = 0,11, Lucena-1) e DT-3OCH₃-3OH (RR = 0,10, Lucena-1) apresentaram significativos RR para a linhagem celular Lucena-1. Para a FEPS, os resultados foram mais singelos dado o menor perfil de atividade, entretanto, o composto DT-3OCH₃-4OH indicou RR de 0,33. Embora os mecanismos associados a SC não sejam totalmente compreendidos, a comparação com os RR dos padrões farmacológicos apresentados indica baixa probabilidade a resistência celular e apontam destacada seletividade as RMD, principalmente para os compostos ativos frente a Lucena-1 (HOUSMAN et al., 2014; SALUSTIANO et al., 2020).

2.4 Ensaio de inibição a topoisomerase II α humana.

A fim de compreender o impacto das modificações no núcleo acridínico ao perfil enzimático já identificado para outros derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (SOUSA et al., 2022), avaliações enzimáticas frente a topo II α foram realizadas para cinco dos dezoito derivados apresentados neste capítulo, sendo a seleção inicial idealizada com a fixação da subunidade 3-hidroxibenzilideno. Adicionalmente, os derivados DT-3OCH₃-H e DT-3OCH₃-4OH foram incluídos dados os perfis citotóxicos encontrados.

Todos os derivados avaliados (DTs) apontaram capacidade em inibir a atividade enzimática da topo II α , a 100 μ M, Figura 24. As subunidades benzilidênica e 3-hidroxibenzilideno são farmacóforos aceitos na cavidade enzimática, justificado pela reprodutibilidade na inibição enzimática nos derivados avaliados. O perfil estereo-eletrônico ideal para substituição na subunidade acridínica não ficou tão claro, entretanto, é nítido o incremento de atividade nos derivados mono (DTs) ou dissubstituído (DL) quando comparados aos não substituídos (CL). Os compostos DT-4CH₃-3OH e DT-3OCH₃-4OH indicaram uma redução no perfil enzimático, quando comparado a amsacrina. Nesse momento, os resultados inibitórios só foram avaliados de forma qualitativa, exceto o DT-3OCH₃-4OH, que teve o valor médio de intensidade obtido por densitometria (60%), em correlação direta o controle. Resultado este, abaixo aos obtidos para os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, inibidores de Topo II α , apresentados no capítulo 1 (DA SILVA FILHO et al., 2019; RIBEIRO et al., 2019; SOUSA et al., 2022).

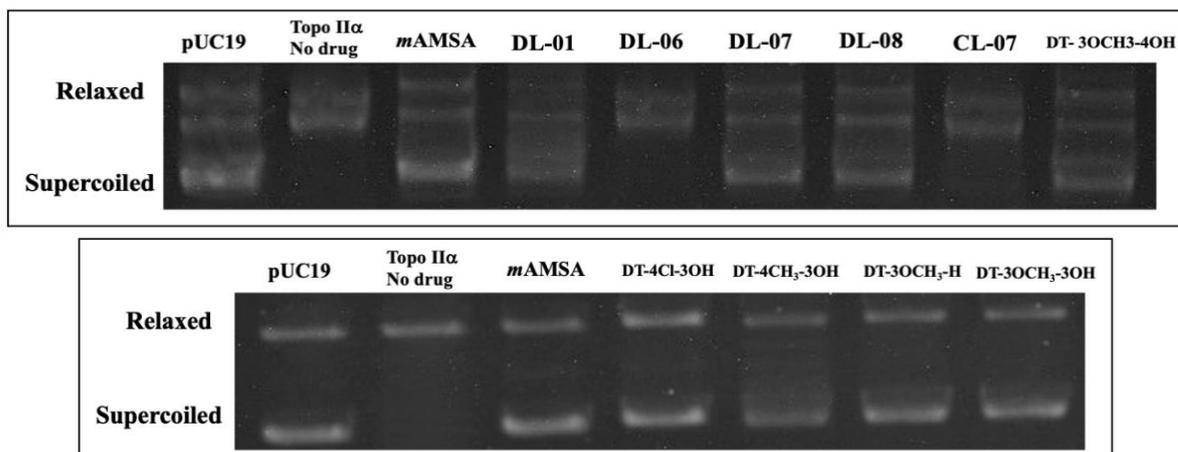


Figura 24. Efeitos da *mAMSA* e os derivados de acridina na atividade da topoisomerase II α . O pUC19 superenovelado nativo foi incubado por 30 min a 37 ° C com 2 unidades de topo II α humano na ausência (pista 2) ou na presença de ligantes a uma concentração de 100 μ M. A inibição da relaxação de DNA induzida pela supressão do papel enzimático da Topo II α pela *mAMSA* (pista 3) foi usada como controle positivo. As amostras de DNA foram executadas em um gel de agarose seguida de coloração com brometo de etídio.

2.5 Ancoramento molecular

De modo a compreender os resultados antiproliferativos e enzimáticos encontrados *in vitro*, estudos *in silico* foram propostos. A partir de um modelo cristalográfico de Topoisomerase II α Humana em complexo com DNA disponível no PDB (ID:5gwk), uma simulação de encaixe para os derivados avaliados no teste enzimático foi realizada (WANG et al., 2017).

A formação de um complexo ternário estável DNA-TopoII α -ligante comumente está associado a resposta biológica antiproliferativa pela inibição enzimática a Topo II α . A amsacrina e o etoposídeo apresentam comportamentos similares nas propostas de encaixe ao sítio de ligação da DNA-TopoII α , interagindo por meio de interações polares que envolvem os resíduos de aminoácidos Ser⁴⁶⁴, Asp⁴⁶³ e Arg⁴⁸⁷ (DRWAL et al., 2014; SADER; WU, 2017). Essas informações acerca do encaixe dos compostos de referência, assim como, propostas teóricas nas interações de híbridos da acridina-tiossemicarbazona com a DNA-TopoII α foram apresentados no capítulo 1, e servem como parâmetro para a discussão estrutura-atividade para os novos derivados (SOUSA et al., 2022). A pontuação de encaixe para cada composto, bem como os tipos de interações entre os ligantes e o complexo DNA-TopoII α estão descritos na Tabela 9.

Todos os derivados hidroxilados em *meta* do benzilideno, avaliados pelo cálculo teórico de ancoramento molecular, demonstraram capacidade em realizar interações polares com a fração enzimática da Topo II α , corroborando com a ideia de fragmento direcional criado no capítulo anterior; este foi validado experimentalmente neste capítulo. Essas interações se deram

principalmente aos resíduos Arg⁴⁸⁷ e Asp⁴⁶³, tendo os compostos DT-4Cl-3OH e DT-3OCH₃-3OH apresentado ainda interações ao Ser⁴⁶⁴, reproduzindo assim, as interações encontradas para *m*AMSA no receptor estudado (KETRON et al., 2012; SADER; WU, 2017). Substituições na posição *para* do arcabouço molecular estudado indicaram uma repulsão estérica dessa região importante da enzima (Arg⁴⁸⁷, Asp⁴⁶³ e Ser⁴⁶⁴), o que poderia justificar a inatividade antiproliferativa dos compostos monovalentes metilados e halogenados das séries DT-4Cl e DT-4CH₃ propostos, a considerar esse mecanismo de ação. No caso do *para* hidroxí (DT-3OCH₃-4OH), interações polares com os fragmentos laterais do DNA foram identificadas, assim como, uma interação com a enzima através da Arg⁴⁸⁷, associado principalmente, ao perfil estereo-eletrônico do substituinte, Figura 25. Entretanto, o perfil não favorável a região enzimática que compreende os resíduos de Asp⁴⁶³ e Ser⁴⁶⁴ poderia justificar a redução no perfil enzimático encontrado experimentalmente.

Tabela 9. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com o DNA-TopoII α .

Compostos	Score	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	
			π -alquil	Empilhamento π - π
DT-4Cl-3OH	80,91	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ G ¹³
DT-4CH ₃ -3OH	80,63	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷ A ¹²	G ¹³
DT-3OCH ₃ -H	92,47	Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³
DT-3OCH ₃ -4OH	96,67	Arg ⁴⁸⁷ G ^{10a} T ^{9a}	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³
DT-3OCH ₃ -3OH	95,33	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ G ¹³
DL-08	98,06	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	T ⁹ G ¹³
CL-08	78,80	Arg ⁴⁸⁷ Asp ⁴⁶³	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³
<i>m</i> AMSA	95,21	Asp ⁴⁶³ Ser ⁴⁶⁴ Arg ⁴⁸⁷	Arg ⁴⁸⁷	C ⁸ T ⁹ G ¹³
Etoposídeo	98,35	Asp ⁴⁶³	T ⁹ Arg ⁴⁸⁷	G ¹³ Arg ⁴⁸⁷

* Os cálculos teóricos foram conduzidos pelo programa Gold, sendo baseado no local de complexação da TopoII α com etoposídeo (RMSD = 0,48). ^a Fragmentos de fitas de DNA.

A Figura 25 apresenta o resultado do ancoramento baseado no modelo cristalográfico da DNA-TopoII α . Os resíduos que compõem a estrutura da TopoII α complexada são destacados em verde e, em laranja, a estrutura helicoidal do DNA. Associado as interações polares encontradas, destacam-se as interações envolvendo elétrons π tanto com as bases nitrogenadas, quanto com os fragmentos laterais da macromolécula do DNA (Tabela 9). Aliás, este parâmetro foi determinante nas pontuações (*score*) apresentadas pelo programa como resultado para o ancoramento teórico dos novos derivados acridínicos. Os resultados indicaram que o aumento da densidade eletrônica ao núcleo acridínico, favoreceria a intensidade do perfil de empilhamento π - π , principalmente à base nitrogenada G¹³, comum a todos os compostos

estudados. Ademais, destaca-se a assertividade do modelo farmacofórico proposto neste trabalho, e sua correlação com os dados relatados anteriormente (SOUSA et al., 2022).

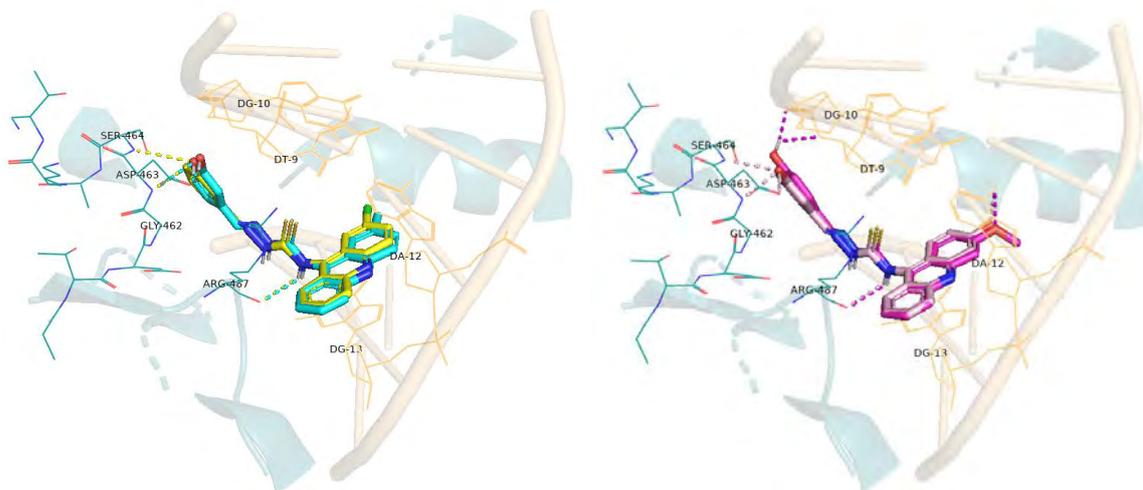


Figura 25. Pose final do ancoramento molecular para alguns derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos com DNA-TopoII α . À esquerda, confôrmeros finais do DT-4Cl-3OH (amarelo) e DT-4CH₃-3OH (ciano) complexados com DNA-Topo II α humana (PDB ID:5gwk); à direita, uma ilustração detalhada das interações intermoleculares do DT-3OCH₃-4OH (magenta) comparado com a DT-3OCH₃-3OH (rosa claro). Os traços indicam as interações polares feitas por cada estrutura com o receptor e seguem suas respectivas cores.

2.6 Avaliação da toxicidade não clínica

Com base na baixa seletividade encontrada na avaliação citotóxica *in vitro*, decidiu-se realizar uma análise toxicológica pré-clínica, *in vivo*, em camundongos, através da escolha de um exemplar dos derivados estudados, o DT-3OCH₃-4OH. A análise foi realizada através de uma administração oral do derivado acridínico (2000 mg/kg) em camundongos fêmeas, sendo acompanhados possíveis sinais clínicos adversos e mortalidade nos grupos de animais submetidos ao estudo de toxicidade aguda (MS, Tabela S4), bem como, massa corporal absoluta, consumo de ração, água, as massas médias dos órgãos dos animais tratados com o composto e o grupo controle (MS, Tabelas S5 a S6).

De acordo com os experimentos, não houve morte após administração oral do DT-3OCH₃-4OH estudado na dose de 2000 mg/kg em camundongos fêmeas, no período avaliado de 14 dias. Também não houve alterações macroscópicas significativas no peso dos pulmões, fígado, rins, coração e baço entre os animais do grupo controle e os expostos ao derivado. No entanto, alterações no consumo alimentar dos animais tratados com o derivado DT-3OCH₃-4OH foram sinalizadas pela estatística aplicada ao estudo; essa condição pode ser explicada pela possibilidade dos xenobióticos atuarem em vias que envolvem a indução da saciedade no organismo. Em geral, o composto apresentou DL₅₀ > 2.000 mg/kg, sendo incluído na categoria

V (DL₅₀, dose letal mediana, entre 2.000 e 5.000 mg/kg) pela classificação GHS (*Globally Harmonized System*), de acordo com a diretriz da OCDE-423. Essa classificação aponta para relativa segurança farmacológica para o DT-3OCH₃-4OH a partir dos estudos realizados (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; KIFAYATULLAH et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018; TANG et al., 2020).

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

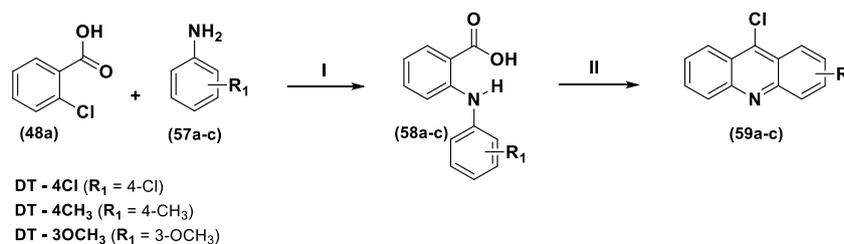
Dezoito novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos foram sintetizados e suas estruturas químicas confirmadas com sucesso. Alguns dos novos derivados apresentaram atividade citotóxica moderada com baixa seletividade para células tumorais, com destaque para a série DT-3OCH₃, que apontou cinco, dos seis compostos da série, com perfis antiproliferativos. Os derivados DT-3OCH₃-H e DT-3OCH₃-3OH indicaram perfis seletivos de atividade frente a Lucena-1, uma linhagem celular leucêmica resistente, quando comparados a sua forma parental (k562). O conhecimento prévio da capacidade de híbridos de acridina na inibição a Topo II α fundamentou a realização de estudos *in vitro* para avaliar a capacidade dos novos derivados em inibir a enzima. Todos os derivados avaliados inibiram a Topo II α , em 100 μ M. Qualitativamente, os derivados DT-4Cl-3OH, DT-3OCH₃-H e DT-3OCH₃-3OH indicaram perfis e intensidades semelhantes na inibição enzimática, quando comparado a amsacrina. Estudos teóricos mimetizaram a formação de um complexo DNA-TopoII α -ligante para os derivados avaliados enzimaticamente. Assim como esperado pelo modelo farmacofórico proposto no capítulo 1, os derivados com a subunidade 3-hidroxibenzilideno apresentaram interessantes encaixes ao modelo cristalográfico, quando comparados aos fármacos de referência. Os estudos teóricos ainda indicaram que o aumento de densidade eletrônica por grupos doadores de elétrons, no núcleo acridínico, favorece as interações envolvendo elétrons π com a subunidade do DNA. Associados, os resultados *in vitro* e os estudos *in silico* realizados sugerem que a Topo II α é um possível mecanismo para essa classe de compostos, tendo em vista os achados para os híbridos da série DT-3OCH₃. Os padrões de substituição estudados foram fatores intrínsecos para as atividades antiproliferativas encontradas. Ademais, o composto DT-3OCH₃-4OH, selecionado para avaliação não clínica de toxicidade, não apresentou sinais graves de toxicidade na dose de 2000 mg/kg em camundongos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Síntese dos novos derivados

4.1.1 Obtenção do núcleo de 9-cloroacridina mono substituído

O esquema 8 apresenta a síntese dos núcleos de acridinas mono substituídas. Esta síntese, composta por duas etapas, iniciou-se com um acoplamento de Ullmann entre o ácido 2-clorobenzóico e aminas aromáticas, formando os ácidos *N*-fenilantranílicos. Uma solução de ácido *o*-clorobenzóico (6,0 mmol), derivado de anilina (12,0 mmol), cobre metálico (0,6 mmol) e carbonato de potássio (12,0 mmol) em DMF (20 ml) foi aquecida sob refluxo durante 8 h. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD), a mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente, vertida em água quente e fervida na presença de carvão ativado por 15 min. Em seguida, foi filtrado através de celite e o filtrado foi acidificado com HCl para obter um produto precipitado que foi purificado por recristalização em etanol para obter produtos puros (55-75%). Posteriormente, reações envolvendo uma acilação de Friedel-Crafts foram conduzidas usando cloreto de fosforila (POCl₃) para a síntese do núcleo de acridina correspondente. Os derivados de ácidos *N*-fenilantranílicos (5 mmol) foram ciclizados de forma intramolecular a derivados de 9-cloroacridina por refluxo em 5 mL de POCl₃ por 4 h e a reação foi monitorada por CCD. Após a conclusão, o excesso de POCl₃ foi removido por rotaevaporador sob pressão reduzida, à massa de reação bruta foi adicionado gelo picado, o pH foi ajustado ~ 7 pela adição de solução saturada de bicarbonato. O sólido separado foi filtrado, seco e purificado por cromatografia em coluna flash com sílica gel usando CH₂Cl₂:MeOH (95:5) como eluente para obter os derivados de 9-cloroacridina mono substituídos correspondentes (60-65%) (DAI et al., 2020; RUPAR et al., 2020).



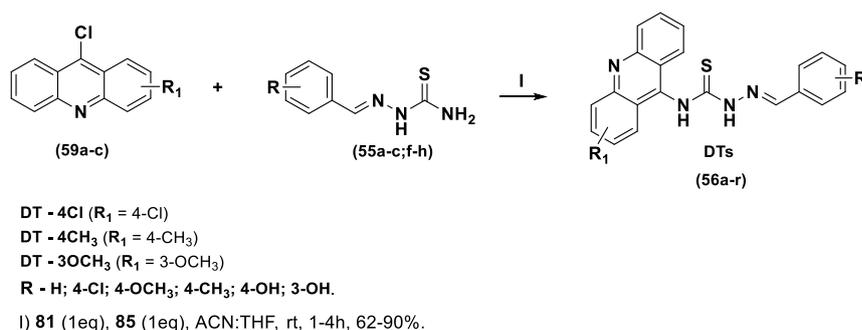
I) 74 (1eq), 83 (2eq), 0,1eq Cu⁰, 2eq K₂CO₃, DMF, 120°C, 8h, 55-75%. II) 84 (1eq), POCl₃ (5eq), 110°C, 3h, 60-65%.

Esquema 8. Obtenção do núcleo de 9-cloroacridina mono substituído.

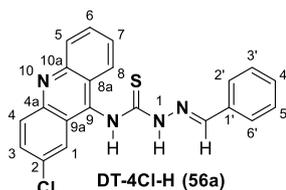
4.1.2 Obtenção de derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (DTs)

A síntese dos novos derivados mono substituídos na acridina foi realizada através de uma reação do tipo S_NAr em proporções equimolares, utilizando os intermediários obtidos

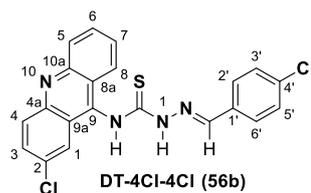
anteriormente. Uma solução do núcleo de acridina (1,0 mmol) e o intermediário de tiossemicarbazona (1,0 mmol) em Acetonitrila:THF (3:1) foi reagido à temperatura ambiente 1 - 5 h. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD), a mistura de reação foi filtrada e obtido um sólido amorfo (DTs), que foi cristalizado em um sistema hexano/diclorometano (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019; SOUSA et al., 2022). Dado as características mais hidrofílicas para os derivados da série DT-3OCH₃, os mesmos foram isolados por cromatografia em coluna flash com sílica gel usando CH₂Cl₂:MeOH.



Esquema 9. Obtenção dos derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (DTs).

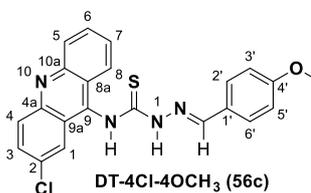


(E)-2-benzilideno-*N*-(2-cloroacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (DT-4Cl-H). Sólido amorfo laranja; rendimento: 70%. PF: 161-162 °C. Rf 0,55 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,30 (s, 1H, NH), 9,19 (s, 1H, NH), 8,44 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,39 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,02 (d, J = 9,5 Hz, 1H, H-3), 7,99 (dd, J = 6,4, 2,7 Hz, 1H, H-6), 7,80 (d, J = 7,6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,75 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-7), 7,73 – 7,67 (m, 2H, H-1, H-8), 7,37 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H-5'), 7,32 (t, J = 7,4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,91 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,95 (Cq), 148,60 (Cq), 146,69 (Cq), 144,00 (CH), 133,83 (Cq), 133,23 (Cq), 133,18 (CH), 132,95 (CH), 131,02 (CH), 129,30 (CH), 128,94 (CH), 128,64 (CH), 125,14 (Cq), 124,79 (Cq), 123,94 (CH), 122,10 (CH).



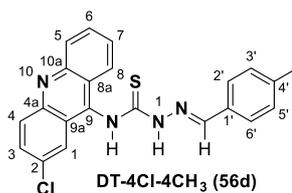
(E)-*N*-(2-cloroacridin-9-il)-2-(4-clorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (DT-4Cl-4Cl).

Sólido amorfo vermelho; rendimento: 81%. PF: 150-151 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,34 (s, 1H, NH), 9,26 (s, 1H, NH), 8,44 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,40 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,02 – 7,99 (m, 1H, H-3), 7,98 (dd, J = 6,6, 2,6 Hz, 1H, H-6), 7,86 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,76 (dd, J = 8,8, 6,4 Hz, 1H, H-7), 7,72 – 7,66 (m, 2H, H-1, H-8), 7,38 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,93 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,91 (Cq), 148,38 (Cq), 146,46 (Cq), 142,84 (CH), 135,51 (Cq), 133,34 (CH), 133,29 (Cq), 133,12 (CH), 132,84 (Cq), 130,82 (CH), 130,34 (CH), 129,38 (CH), 129,00 (CH), 128,45 (CH), 125,12 (Cq), 124,75 (Cq), 123,92 (CH), 122,10 (CH).

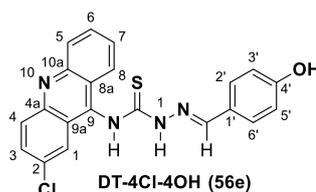


(E)-*N*-(2-cloroacridin-9-il)-2-(4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (DT-4Cl-4OCH₃).

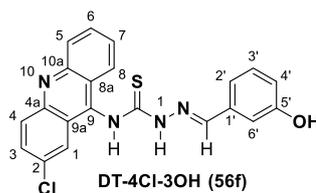
Sólido amorfo vermelho; rendimento: 79%. PF: 165 °C. Rf 0,5 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9,18 (s, 1H, NH), 9,11 (s, 1H, NH), 8,40 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,36 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,00 – 7,97 (m, 1H, H-3), 7,97 – 7,95 (m, 1H, H-6), 7,76 – 7,71 (m, 3H, H-13, H-2', H-6'), 7,68 (dd, J = 8,8, 1,5 Hz, 1H, H-8), 7,66 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-1), 6,87 – 6,85 (m, 2H, H-23, H-5'), 6,83 (s, 1H, N=CH), 3,74 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180,90 (Cq), 161,65 (Cq), 150,28 (Cq), 148,28 (Cq), 143,54 (CH), 140,70 (Cq), 132,85 (CH), 132,75 (Cq), 131,94 (CH), 131,62 (CH), 130,47 (CH), 130,40 (CH), 128,83 (CH), 126,44 (Cq), 124,95 (Cq), 124,62 (Cq), 123,77 (CH), 121,95 (CH), 114,42 (CH), 55,78 (OCH₃). **Pureza CLAE:** 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄OS: 420,081; **LRMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 421 (100%); 422 (28%); 423 (57%).



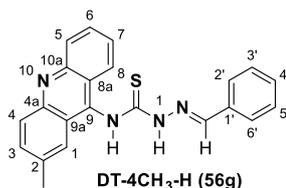
(E)-*N*-(2-cloroacridin-9-il)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4Cl-4CH₃**). Sólido amorfo vermelho-laranja; rendimento: 80%. PF: 160 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,26 (s, 1H, NH), 9,15 (s, 1H, NH), 8,42 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,38 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,02 – 7,99 (m, 1H, H-3), 7,98 (dd, J = 6,8, 2,5 Hz, 1H, H-6), 7,74 (dd, J = 8,8, 6,4 Hz, 1H, H-7), 7,71 – 7,65 (m, 4H, H-1, H-8, H-2', H-6'), 7,13 (d, J = 7,9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,86 (s, 1H, N=CH), 2,27 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,85 (Cq), 148,72 (Cq), 146,78 (Cq), 144,05 (CH), 140,96 (Cq), 133,16 (Cq), 133,07 (CH), 132,84 (CH), 131,21 (CH), 131,12 (Cq), 129,54 (CH), 129,23 (CH), 128,82 (CH), 128,64 (CH), 125,14 (Cq), 124,81 (Cq), 123,95 (CH), 122,11 (CH), 21,49 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄S: 404,086; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 405 (100%); 406 (31%); 407 (46%); 408 (17%).



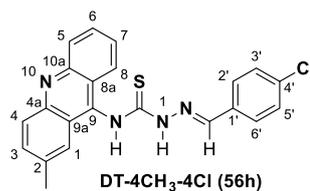
(E)-*N*-(2-cloroacridin-9-il)-2-(4-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4Cl-4OH**). Sólido amorfo vermelho-bordô; rendimento: 83%. PF: 148-149 °C. Rf 0,55 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,13 (s, 1H, NH), 9,04 (s, 1H, NH), 8,36 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,32 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 7,97 – 7,94 (m, 1H, H-3), 7,93 (dd, J = 9,2, 2,4 Hz, 1H, H-6), 7,71 (dd, J = 8,8, 6,3 Hz, 1H, H-7), 7,66 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-8), 7,63 – 7,60 (m, 3H, H-1, H-2', H-6'), 6,74 (s, 1H, N=CH), 6,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3', H-5'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,69 (Cq), 160,31 (Cq), 149,69 (Cq), 147,71 (Cq), 144,00 (CH), 141,48 (Cq), 132,86 (Cq), 132,35 (CH), 132,25 (CH), 132,08 (CH), 130,54 (CH), 129,85 (CH), 128,96 (CH), 125,05 (Cq), 124,76 (Cq), 124,74 (Cq), 123,88 (CH), 122,04 (CH), 115,80 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 96%.



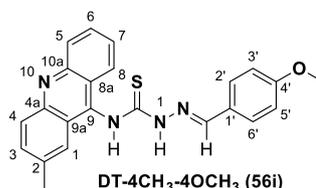
(*E*)-*N*-(2-cloroacridin-9-il)-2-(3-hidroxi benzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4Cl-3OH**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 84%. PF: 154-155 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 9,27 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, NH), 8,42 (d, J = 9,3 Hz, 1H, H-5), 8,38 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 8,03 – 8,00 (m, 1H, H-3), 7,98 (dd, J = 6,7, 2,4 Hz, 1H, H-6), 7,77 – 7,73 (m, 1H, H-7), 7,71 – 7,67 (m, 2H, H-1, H-8), 7,17 (d, J = 6,1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,10 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H-3'), 6,82 (s, 1H, N=CH), 6,80 (dd, J = 8,1, 2,4 Hz, 1H, H-4'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,93 (Cq), 157,95 (Cq), 148,61 (Cq), 146,69 (Cq), 144,29 (CH), 135,05 (Cq), 133,18 (Cq), 133,13 (CH), 132,90 (CH), 131,10 (CH), 129,90 (CH), 129,25 (CH), 128,71 (CH), 125,13 (Cq), 124,78 (Cq), 123,95 (CH), 122,10 (CH), 119,76 (CH), 118,20 (CH), 114,99 (CH). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₁H₁₅ClN₄OS: 406,066; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 407 (100%); 408 (25%); 409 (60%); 410 (10%).



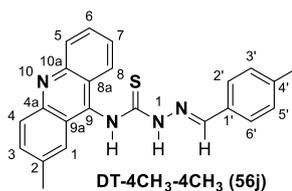
(*E*)-2-benzilideno-*N*-(2-metilacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-H**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 88%. PF: 170-171 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,38 (s, 1H, NH), 9,26 (s, 1H, NH), 8,58 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,52 (d, J = 8,9 Hz, 1H, H-4), 8,15 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H-6), 8,05 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-3), 7,83 (t, J = 7,5 Hz, 1H, H-7), 7,81 – 7,78 (m, 3H, H-8, H-2', H-6'), 7,61 (s, 1H, H-1), 7,37 (t, J = 7,2 Hz, 1H, H-4'), 7,32 (t, J = 7,4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,98 (s, 1H, N=CH), 2,56 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,73 (Cq), 144,29 (CH), 139,59 (Cq), 138,14 (CH), 134,84 (CH), 133,86 (Cq), 131,06 (CH), 129,27 (CH), 128,95 (CH), 128,60 (CH), 125,29 (Cq), 124,97 (Cq), 124,43 (CH), 22,14 (CH₃).



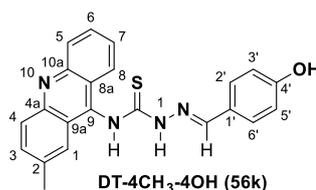
(E)-2-(4-clorobenzilideno)-*N*-(2-metilacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-4Cl**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 78%. PF: 152 °C. Rf 0,52 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,37 (s, 1H, NH), 9,30 (s, 1H, NH), 8,54 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,48 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-4), 8,12 (ddd, J = 8,5, 6,4, 1,5 Hz, 1H, H-6), 8,02 (dd, J = 8,9, 1,9 Hz, 1H, H-3), 7,85 – 7,83 (m, 2H, H-2', H-6'), 7,82 – 7,79 (m, 1H, H-7), 7,79 – 7,76 (m, 1H, H-8), 7,58 (s, 1H, H-1), 7,42 – 7,36 (m, 2H, H-3', H-5'), 6,96 (s, 1H, N=CH), 2,56 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,71 (Cq), 142,96 (CH), 139,55 (Cq), 137,88 (CH), 135,56 (Cq), 134,52 (CH), 132,84 (Cq), 130,28 (CH), 129,26 (CH), 129,03 (CH), 125,17 (Cq), 124,84 (Cq), 124,35 (CH), 122,00 (CH), 22,14 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄S: 404,086; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 405 (100%); 406 (35%); 407 (60%); 408 (10%).



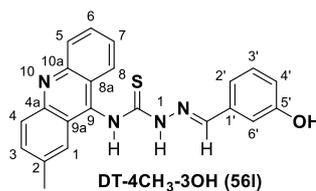
(E)-2-(4-metoxibenzilideno)-*N*-(2-metilacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-4OCH₃**). Sólido amorfo vermelho-laranja; rendimento: 90%. PF: 178 °C. Rf 0,40 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,26 (s, 1H, NH), 9,19 (s, 1H, NH), 8,55 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,49 (d, J = 8,9 Hz, 1H, H-4), 8,14 (ddd, J = 8,4, 6,3, 1,7 Hz, 1H, H-6), 8,03 (dd, J = 9,0, 1,8 Hz, 1H, H-3), 7,83 (dd, J = 8,8, 6,2 Hz, 1H, H-7), 7,79 (dd, J = 8,7, 1,6 Hz, 1H, H-8), 7,75 – 7,71 (m, 2H, H-2', H-6'), 7,59 (s, 1H, H-1), 6,91 (s, 1H, N=CH), 6,88 – 6,85 (m, 2H, H-3', H-5'), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 2,56 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,50 (Cq), 161,74 (Cq), 144,20 (CH), 139,45 (Cq), 137,99 (CH), 134,63 (CH), 130,38 (CH), 129,16 (CH), 126,42 (Cq), 125,35 (Cq), 125,04 (Cq), 124,51 (CH), 122,15 (CH), 114,44 (CH), 55,80 (OCH₃), 22,14 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₂₀N₄OS: 400,136; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 401 (100%); 402 (35%); 403 (15%).



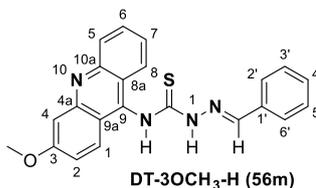
(E)-*N*-(2-metilacridin-9-il)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-4CH₃**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 90%. PF: 161-162 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,32 (s, 1H, NH), 9,21 (s, 1H, NH), 8,56 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,50 (d, J = 8,9 Hz, 1H, H-4), 8,14 (ddd, J = 8,6, 6,3, 1,7 Hz, 1H, H-6), 8,03 (dd, J = 9,0, 1,9 Hz, 1H, H-3), 7,82 (dd, J = 8,8, 6,2 Hz, 1H, H-7), 7,79 (dd, J = 8,8, 1,6 Hz, 1H, H-8), 7,67 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,59 (s, 1H, H-1), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,93 (s, 1H, N=CH), 2,56 (s, 3H, CH₃ Acridina), 2,27 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,57 (Cq), 144,39 (CH), 141,04 (Cq), 139,57 (Cq), 138,01 (CH), 134,85 (CH), 131,14 (Cq), 129,55 (CH), 129,27 (CH), 128,60 (CH), 125,31 (Cq), 125,00 (Cq), 124,47 (CH), 122,11 (CH), 22,14 (CH₃ Acridina), 21,50 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₂₀N₄S: 384,141; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 385 (100%); 386 (35%); 387 (5%).



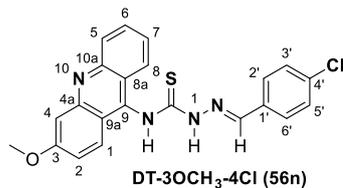
(E)-2-(4-hidroxibenzilideno)-*N*-(2-metilacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-4OH**). Sólido amorfo vermelho-laranja; rendimento: 88%. PF: 171-172 °C. Rf 0,56 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,19 (s, 1H, NH), 9,09 (s, 1H, NH), 8,47 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,41 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-4), 8,07 (t, J = 7,5 Hz, 1H, H-6), 7,97 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-3), 7,78 (t, J = 7,5 Hz, 1H, H-7), 7,75 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-8), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7,55 (s, 1H, H-1), 6,80 (s, 1H, N=CH), 6,69 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 2,55 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,45 (Cq), 160,38 (Cq), 144,26 (CH), 139,09 (Cq), 137,17 (CH), 133,68 (CH) 130,49, 128,90, 125,20 (Cq), 124,91 (Cq), 124,77 (Cq), 124,37 (CH), 122,03 (CH), 115,82 (CH), 22,16 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₈N₄OS: 386,120; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 387 (100%); 388 (34%); 389 (5%).



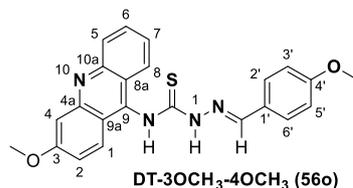
(E)-2-(3-hidroxibenzilideno)-*N*-(2-metilacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-4CH₃-3OH**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 86%. PF: 162-163 °C. Rf 0,60 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,34 (s, 1H, NH), 9,16 (s, 1H, NH), 8,57 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-5), 8,51 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-4), 8,15 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H-6), 8,05 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-3), 7,84 (t, J = 7,6 Hz, 1H, H-7), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-8), 7,60 (s, 1H, H-1), 7,20 – 7,15 (m, 2H, H-2', H-6'), 7,11 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H-3'), 6,90 (s, 1H, H-20), 6,81 (dd, J = 8,0, 2,4 Hz, 1H, H-4'), 2,57 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,70 (Cq), 157,98 (Cq), 144,64 (CH), 139,59 (Cq), 138,11 (CH), 135,08 (Cq), 134,82 (CH), 129,89 (CH), 129,26 (CH), 125,31 (Cq), 125,00 (Cq), 124,47 (CH), 122,11 (CH), 119,65 (CH), 118,26 (CH), 22,14 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₈N₄OS: 386,120; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 387 (100%); 388 (40%); 389 (10%).



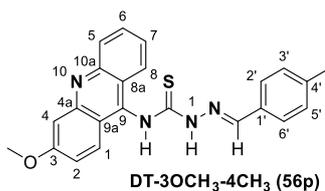
(E)-2-benzilideno-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-3OCH₃-H**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 77%. PF: 173-174 °C. Rf 0,56 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9,41(s, 1H, NH), 9,27 (s, 1H, NH), 8,51 (d, J = 8,7 Hz, 1H, H-5), 8,17 (t, J = 7,8 Hz, 1H, H-6), 7,85 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-4), 7,80 (q, J = 5,1 Hz, 5H, H-1, H-7, H-8, H-2', H-6'), 7,54 (dd, J = 9,5, 2,4 Hz, 1H, H-2), 7,38 (t, J = 7,2 Hz, 1H, H-4'), 7,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,07 (s, 1H, N=CH), 4,10 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180,60 (Cq), 144,74 (CH), 133,80 (Cq), 131,15 (CH), 128,95 (CH), 128,60 (CH), 128,51 (CH), 126,87 (CH), 124,90 (CH), 124,45 (CH), 123,31 (Cq), 122,01 (Cq), 57,21 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 97%.



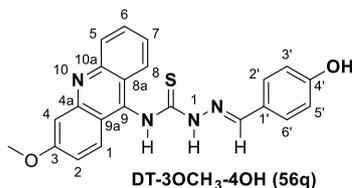
(*E*)-2-(4-clorobenzilideno)-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-3OCH₃-4Cl**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 66%. PF: 180-181 °C Rf 0.60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.45 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, NH), 8.52 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.16 (dt, J = 8.5, 4.0 Hz, 1H, H-6), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 3H, H-8, H-2', H-6'), 7.79 (d, J = 4.2 Hz, 2H, H-4, H-7), 7.78 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 7.54 (dd, J = 9.5, 2.3 Hz, 1H, H-2), 7.40 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.08 (s, 1H, N=CH), 4.10 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.55 (Cq), 143.54 (CH), 135.67 (Cq), 135.58 (CH), 132.78 (Cq), 130.28 (CH), 129.06 (CH), 128.60 (CH), 126.88 (CH), 124.90 (CH), 124.56 (CH), 123.24 (Cq), 121.98 (Cq), 57.25 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₇ClN₄OS: 420.081; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 421 (100%); 422 (38%); 423 (57%).



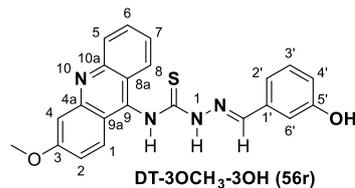
(*E*)-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)-2-(4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-3OCH₃-4OCH₃**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 62%. PF: 181-182 °C Rf 0.52 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.32 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH), 8.49 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.18 (ddd, J = 8.5, 5.0, 3.1 Hz, 1H-6), 7.83 – 7.81 (m, 2H, H-7, H-8), 7.81 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.79 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 7.74 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.54 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.01 (s, 1H, N=CH), 6.88 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 4.11 (s, 3H, OCH₃ Acridina), 3.74 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.31 (Cq), 161.78 (Cq), 144.74 (CH), 135.92 (CH), 130.40 (CH), 128.50 (CH), 127.00 (CH), 126.33 (Cq), 125.01 (CH), 124.43 (CH), 123.40 (Cq), 122.13 (Cq), 114.43 (CH), 99.73 (CH), 57.24 (OCH₃ Acridina), 55.80 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 98%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₂₀N₄O₂S: 416.131; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 417 (100%); 418 (50%); 419 (10%).



(E)-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-3OCH₃-4CH₃**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 80%. PF: 187 °C. Rf 0.60 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.38 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, NH), 8.53 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.18 (ddd, J = 8.5, 5.0, 3.0 Hz, 1H, H-6), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.83 – 7.80 (m, 2H, H-7, H-8), 7.79 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.54 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.04 (s, 1H, N=CH), 4.10 (s, 3H, OCH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.46 (Cq), 165.83 (Cq), 144.91 (CH), 141.14 (Cq), 135.98 (CH), 131.11 (Cq), 129.55 (CH), 128.61 (CH), 128.53 (CH), 126.96 (CH), 124.97 (CH), 124.47 (CH), 123.36 (Cq), 122.10 (Cq), 99.59 (CH), 57.24 (OCH₃), 21.51 (CH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₃H₂₀N₄OS: 400.136; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 401 (100%); 402 (44%); 403 (12%).



(E)-2-(4-hidroxibenzilideno)-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**DT-3OCH₃-4OH**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 76%. PF: 183-184 °C. Rf 0.50 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.30 (s, 1H, NH), 9.17 (s, 1H, NH), 8.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 8.18 (dt, J = 8.5, 4.1 Hz, 1H, H-6), 7.81 (d, J = 3.8 Hz, 3H, H-4, H-7, H-8), 7.78 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H-1), 7.62 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.54 (dd, J = 9.6, 2.4 Hz, 1H, H-2), 6.96 (s, 1H, N=CH), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 4.10 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.17, 160.48, 145.11 (CH), 135.94 (CH), 130.54 (CH), 129.51 (CH), 128.49 (CH), 127.04 (CH), 125.05 (CH), 124.70, 124.41 (CH), 123.44, 122.16, 115.81 (CH), 99.66 (CH), 57.24 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD**: 99%. **Massa exata** calculada para C₂₂H₁₈N₄O₂S: 402.115; **LCMS *m/z* [M]⁺** encontrada: 403 (100%); 404 (38%); 405 (12%).



(*E*)-2-(3-hidroxibenzilideno)-*N*-(3-metoxiacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (DT-3OCH₃-3OH). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 65%. PF: 193-194 °C. R_f 0.55 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9.42 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH), 8.57 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 8.23 (dt, J = 8.5, 4.1 Hz, 1H, H-6), 7.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.85 (d, J = 4.1 Hz, 2H, H-7, H-8), 7.82 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H-1), 7.58 (dd, J = 9.4, 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.21 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-6'), 7.16 (s, 1H, H-2'), 7.12 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-3'), 7.05 (s, 1H, N=CH), 6.82 (dd, J = 8.0, 2.6 Hz, 1H, H-4'), 4.12 (s, 3H, OCH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180.47 (Cq), 166.40 (Cq), 157.96 (Cq), 145.44 (CH), 136.64 (CH), 135.03 (Cq), 129.88 (CH), 128.76 (CH), 127.19 (CH), 125.12 (CH), 124.64 (CH), 123.41 (Cq), 122.31 (Cq), 121.05 (CH), 119.60 (CH), 118.35 (CH), 115.17 (CH), 98.65 (CH), 57.38 (OCH₃). **Pureza CLAE-DAD:** 98%.

4.3 Atividade citotóxica

4.3.1 Linhagens celulares

As linhagens de células HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) foram obtidos da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e foram cultivadas conforme recomendado pelo guia de cultura de células animais ATCC. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de coloração de micoplasma (*Sigma-Aldrich*) para validar o uso de células livres de contaminação.

4.3.2 Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade, a viabilidade celular foi quantificada pelo método Alamar blue (COSTA et al., 2021; SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2018). Para todos os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Os constituintes químicos foram dissolvidos em DMSO e adicionados a cada poço e incubados por 72 h. A doxorubicina foi usada como controle positivo. Ao final do tratamento, 20 µL de uma solução estoque (0,312 mg/mL) de resazurina foram adicionados a cada poço. As absorbâncias em 570 nm e 595 nm foram medidas usando um leitor de microplacas SpectraMax 190 (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração semi-inibitória (CI₅₀) foi obtida por regressão não linear

com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) usando o software GraphPad Prism (*Intuitive Software for Science*; San Diego, CA, EUA).

4.3.3 Ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares de leucemia mieloide crônica.

Foram utilizadas três linhagens celulares de leucemia mieloide crônica: K562, Lucena e FEPS, sendo as duas últimas desenvolvidas no laboratório de Imunologia Tumoral da Universidade Federal do Rio de Janeiro e selecionadas a partir da linhagem K562 utilizando concentrações crescentes dos quimioterápicos vincristinas e daunorrubicina, respectivamente (RUMJANEK et al., 2001; DAFLON-YUNES et al., 2013).

As linhagens K562 e Lucena-1 foram cultivadas utilizando meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina, 5 μ M de β -mercaptoetanol (Daflon-Yunes e colaboradores, 2013). As células da linhagem FEPS foram cultivadas como descrito para K562 e Lucena-1, entretanto, em volume final duas vezes maior quanto ao meio de cultivo. As células foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

O ensaio de citotoxicidade avaliou a viabilidade celular pelo ensaio de redução de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Nesse método, a viabilidade celular é determinada pela capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial reduzir o MTT, formando cristais insolúveis de formazan em mitocôndrias de células viáveis (Mosmann *et al.*, 1983).

Em placas de 96 poços as células foram distribuídas na densidade de 3.0×10^4 células/poço em um volume de 100 μ L. As placas foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 24 h. Na etapa seguinte, com um volume de 100 μ L adicionados em cada poço, as células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras em teste (item 3).

Após o tratamento por 24 e 48 h de incubação, foram adicionados 20 μ L de MTT em PBS pH= 7,4 a uma concentração final de 0,5 mg/mL por poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 3 h. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 12 minutos, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO, gerando uma coloração violeta medida em um leitor de microplacas (*Microplate Absorbance Reader* iMARK em 562 nm), após agitação vigorosa durante 60 segundos.

Para o cálculo da viabilidade celular foi utilizada a equação:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{média absorbância das células sem tratamento}} \times 100$$

Todas as concentrações testadas foram avaliadas em oituplicatas (n = 8). A variação dos resultados foi observada através de análise estatística aplicando ANOVA seguido do Teste de Tukey para comparações múltiplas através GraphPad Prism 5TM com nível de significância de p < 0,05.

Os valores de IC₅₀ (do inglês, *Half Maximal Inhibitory Concentration*) foram calculados a partir das curvas dose resposta, sendo definido como a concentração de cada amostra testada necessária para reduzir o número de células viáveis a 50% em relação ao controle. O programa GraphPad Prism 5TM foi utilizado para os cálculos de IC₅₀.

4.4 Ancoramento molecular

As estruturas estudadas foram primeiramente tratadas com base na teoria semi-empírica no nível PM6 usando o software Spartan 14. Após otimizados, foram submetidos ao estudo de ancoramento molecular através do programa Gold 5.8.1. A estrutura da topoisomerase humana II α em complexo com DNA (PDB ID: 5gwk) foi usada como um modelo de DNA-TopoII α (WANG et al., 2017). Para validar o estudo, o redocking para o alvo 5GWK foi realizado para etoposídeo em complexo com um DNA-TopoII α (RMSD = 0.48). O ancoramento molecular foi realizado considerando o receptor, DNA-TopoII α , como uma molécula rígida, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Os resultados de encaixe foram analisados e as interações intermoleculares utilizadas como parâmetros para medir a energia de afinidade com o alvo (*score*). O confôrmero com maior pontuação foi investigado pelo programa Pymol 2.3.2, distância e tipo de interação com a biomacromolécula foram preponderantes para análise do ancoramento molecular (DE ALMEIDA et al., 2021; GILAD; SENDEROWITZ, 2014).

4.5 Avaliação da toxicidade não clínica

4.5.1 Estudo de toxicidade aguda (14 dias)

Um estudo de toxicidade aguda foi realizado de acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) diretriz 423 (OECD 2001) com modificações (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - BRASIL 2013) (ANVISA, 2013; OECD, 2001). Em princípio, o método não se destina a permitir um cálculo preciso da dose letal (LD₅₀), entretanto, permite uma categorização de acordo com diretrizes do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

Com a aprovação do conselho de ética para o uso de animais da Universidade Estadual da Paraíba, sob nº 008/2021, os testes foram realizados. Camundongos Swiss, três fêmeas por

grupo, foram submetidos a doses únicas orais de 2000 mg/kg dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos; grupo controle foi administrado apenas com o veículo utilizado (solução salina de Tween 80). Para rastrear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade no Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração da substância, foi realizada observação cuidadosa para detectar possíveis sinais clínicos de toxicidade (ataxia, tremor vocal, irritabilidade, tônus corporal, tremor, salivação, lacrimejamento, ptose palpebral, convulsões, alterações comportamentais e movimentos anormais) e mortalidade dos animais nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos e após 4 horas; e diariamente por 14 dias (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2018; SALEEM et al., 2017).

4.5.2 Necropsia, análise macroscópica e peso dos órgãos

Após o período proposto para acompanhamento, os animais foram anestesiados com solução de xilazina-cetamina de 0,2 ml/100 g [8,75 ml cetamina (100 mg/ml) e 1,25 ml xilazina (10 mg/ml)] de acordo com o protocolo descrito por Flecknell (1996) (FLECKNELL, 2009). Após a eutanásia, foi realizada avaliação macroscópica da superfície corporal externa, cavidades (torácica, abdominal e craniana) e órgãos (alteração de posição, forma, tamanho, cor e consistência). O peso relativo de órgãos como o cérebro, pulmão, fígado, coração, baço e rins foram calculados usando a fórmula: $\text{Peso relativo do órgão (\%)} = (\text{peso do órgão} / \text{peso do camundongo}) \times 100$ (DA SILVA OLIVEIRA; DA SILVA, 2021; OLIVEIRA et al., 2018).

CAPÍTULO III

PLANEJAMENTO E PROSPECÇÃO BIOLÓGICA ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência neurodegenerativa, sendo considerada multifatorial e apresentando fisiopatologia muito complexa. O desenvolvimento terapêutico frente à doença é discreto, dada a gravidade, e aponta predominância paliativa. Neste trabalho foi apresentada a avaliação biológica *in vitro* de novos inibidores colinesterásicos, derivados da acridina, como proposta de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDL). Os compostos inicialmente avaliados (presentes no capítulo 1) indicaram que o perfil anticolinesterásicos dos derivados estava ligado às acridinas não substituídas (CL). Todos os derivados desta série (CL-01 a CL-10) foram capazes de inibir a butirilcolinesterase (BChE) com concentrações inibitórias médias (CI_{50}) variando entre 0,71 e 3,18 μM . Quando avaliada frente à acetilcolinesterase (AChE), a série demonstrou menor atividade, com destaque para CL-01 ($CI_{50} = 2,47 \mu\text{M}$) e CL-05 ($CI_{50} = 2,78 \mu\text{M}$). Estudos de cinética enzimática indicaram uma inibição do tipo mista na BChE, e não-competitiva para AChE. Dados os resultados, doze novos derivados foram propostos com modulações em duas regiões do arcabouço CL: primeiro uma modificação do núcleo acridina em CL-01, pelo núcleo tetraidroacridina da tacrina; e segundo, modificações no benzilideno baseados em resultados de modelagem molecular. Os novos derivados indicaram novamente um perfil mais ativo frente a BChE, com destaque para o CL-DiTerc ($CI_{50} = 1,15 \mu\text{M}$) e o CL-F ($CI_{50} = 1,35 \mu\text{M}$). Curiosamente, TA-H, derivado com o núcleo da tacrina, apresentou reduzida inibição colinesterásica (AChE $CI_{50} = 13,60 \mu\text{M}$; BChE $CI_{50} = 5,38 \mu\text{M}$), e modo de inibição distinto na AChE (misto) quando comparado ao CL-01 (não-competitiva), claramente indicando que a acridina em CL-01 não interage com a AChE da mesma forma que a tetraidroacridina. Estudos adicionais indicaram CL-DiTerc como promissora candidata à MTDL por esta também apresentar atividades antioxidante (DPPH $EC_{50} = 47,01 \mu\text{M}$), ter capacidade de complexar com íons metálicos (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+}) e não apresentar qualquer neurotoxicidade à 50 μM em células SH-SY5Y.

Palavras-chave: Tiossemicarbazônico-acridínico; Inibidores colinérgicos; Múltiplos alvos.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegenerative dementia; considered multifactorial, it presents a very complex pathophysiology. The therapeutic development in the face of the disease is discreet, given its severity, and indicates palliative predominance. In this work, we describe the *in vitro* biological evaluation of new cholinergic inhibitors, derived from acridine, as a proposal for multi-targeted ligands (MTDL). In general, the compounds initially evaluated (chapter 1) indicated anticholinergic profiles to unsubstituted acridine derivatives (CL), with reproduction of the butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory capacity for all derivatives of the series (CL-01 to CL-10), these, had their mean inhibitory concentrations (IC_{50}) calculated, with results ranging from 0.71 to 3.18 μM . When evaluated in acetylcholinesterase (AChE) they showed lower activities, especially CL-01, $IC_{50} = 2.47 \mu\text{M}$, and CL-05 ($IC_{50} = 2.78 \mu\text{M}$). Enzyme kinetics studies were performed and indicated a mixed-type inhibition in BChE, and non-competitive for AChE. Given the results, twelve new derivatives were proposed with modulations in two regions of the CL framework; one of the proposals presented a molecular hybridization of the tacrine nucleus to the thiosemicarbazone fragment of CL-01, as an interpretative way of evaluating the results presented initially. The new derivatives again indicated a BChE profile, with emphasis on CL-DiTerc ($IC_{50} = 1.15 \mu\text{M}$) and CL-F ($IC_{50} = 1.35 \mu\text{M}$); TA-H, a tacrine hybrid, indicated low anticholinergic profiles (AChE $IC_{50} = 13.60 \mu\text{M}$; BChE $IC_{50} = 5.38 \mu\text{M}$). Enzymatic kinetics showed different modes of action in AChE for CL-01 and TA-H, indicating a mixed-type activity for TA-H. Docking studies showed poses associating the inhibition capacity of the new derivatives with the hydrophobic interactions performed with the biological receptors studied. As a proposal of double therapeutic benefit, studies indicated an antioxidant profile to CL-DiTerc (DPPH $EC_{50} = 47.01 \mu\text{M}$), as well as some evaluated compounds indicated the ability to complex with metallic ions (Zn^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+}).

Keywords: Thiosemicarbazone-acridine; Cholinergic inhibitors; Multiple targets.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva irreversível, responsável pela perda de memória, demência e comprometimento das funções cognitivas do cérebro humano (ABUBAKAR et al., 2022). Segundo estimativas da *Alzheimer's Disease International*, 50 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com alguma forma de demência; projeções indicam que estes números podem triplicar até 2050, sendo a DA a principal causa dessa síndrome (CHUFAROVA et al., 2018; TSENG et al., 2020).

Associada ao envelhecimento populacional, com etiologia não totalmente esclarecida, mas considerada multifatorial, a DA demonstra indícios sinápticos envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, agregados filamentosos da proteína β -amiloide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares formadas principalmente pela proteína tau (FALCO et al., 2015). Embora esses eventos possam ser perceptíveis no cérebro de um idoso saudável, não são frequentemente observados conjuntamente e com a mesma intensidade das pessoas acometidas pela doença (DE STROOPER; KARRAN, 2016; XIA et al., 2018).

O sistema colinérgico marca o início da pesquisa voltada ao tratamento da DA, justificado principalmente pelo severo comprometimento neste sistema neurotransmissor (HAMPEL et al., 2018). Estratégias terapêuticas envolvendo inibidores de colinesterases (ChEIs) representam a primeira classe de abordagens farmacológicas eficazes para o tratamento da DA (S. SCHNEIDER, 2022). Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são enzimas serina hidrolases, responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Em um cérebro normal, a AChE é responsável por aproximadamente 95% da atividade das colinesterases sendo capaz de hidrolisar 6×10^5 moléculas de ACh por minuto, mostrando assim, alta especificidade pela acetilcolina (DO N. GOULART et al., 2021; S. SCHNEIDER, 2022; STANCIU et al., 2019). A butirilcolinesterase (BChE) apresenta taxas de hidrólise mais lentas, participando na hidrólise de outros ésteres como a butirilcolina (BCh), sendo menos específica a ACh (POPE; BRIMIJOIN, 2018). Entretanto, em pacientes com a doença de Alzheimer avançada, o aumento em mais de 120% nos percentuais de BChE, correlacionados com a drástica redução dos níveis de AChE (55-67%), tornam-na um interessante alvo, tanto na proposta de biomarcador para doença, quanto ao planejamento de potenciais inibidores (LI et al., 2021c).

A AChE e BChE apresentam relativa homologia estrutural, com cerca de 65% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos. Ambas dispõem de uma região aniônica

periférica, denominada PAS, e outra composta por uma tríade catalítica, conhecida por CAS, separados por um canal com aproximadamente 20 Å. O sítio periférico nas colinesterases (PAS) são revestidos por resíduos aromáticos que desempenham um papel fundamental na ligação e orientação de substratos aromáticos e/ou catiônicos em seu caminho, através do canal, até as regiões do CAS. Esta última, ainda é composta por dois subsítios, um com propriedades iônicas e outro esterásicas, onde se ligam à ACh. Portanto, um potencial composto ChEI pode atuar em qualquer uma dessas regiões mimetizando um ligante colinérgico. Evidências apontam que a ligação simultânea ao CAS e PAS pode ter ação antiagregante indireta (CHALUPOVA et al., 2019; FRANJESEVIC et al., 2019; ROSENBERRY et al., 2017).

A patogênese da DA envolve um conjunto de eventos bioquímicos e vários biorreceptores operando simultaneamente. Esta característica multifatorial dificulta a eficácia das terapias direcionadas a um único alvo. Nesse contexto, surge a proposta de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDLs), apresentando-se como uma ferramenta potencial frente a doenças, como as neurodegenerativas (ROSSI et al., 2021). A AChE é o alvo biológico mais procurado nas estratégias MTDLs para a DA, seguido pela agregação do peptídeo β -amilóide, estresse oxidativo, BChE e homeostase metálica. Estes constituem os cinco principais alvos terapêuticos encontrados em projetos anti-DA, tanto de forma individualizada, como no princípio de MTL (OSET-GASQUE; MARCO-CONTELLES, 2018; ROSSI et al., 2021; SAMPIETRO et al., 2022).

A acridina é um arcabouço químico-biológico versátil, sendo comumente utilizado como base no planejamento de derivados anti-DA, principalmente em híbridos da 9-aminotetrahydroacridina (tacrina) (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2021; CHALUPOVA et al., 2019; HAMULAKOVA et al., 2017; TSENG et al., 2020).

Neste trabalho, diferentemente de grande parte dos trabalhos encontrados na literatura, propusemos a avaliação e desenvolvimento de derivados tiossemicarbazonas ligadas ao núcleo acridina, em substituição ao núcleo tetraidroacridina da tacrina, como inibidores de colinesterases. Esta troca objetivou verificar se estes núcleos poderiam ser considerados semelhantes do ponto de vista de interação com as enzimas alvo. Adicionalmente investigou-se os melhores compostos como potenciais MTLD através de avaliações quanto as propriedades antioxidantes e complexantes frente a metais (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{3+}) (ALFADLY et al., 2019; CHALUPOVA et al., 2019; ROSSI et al., 2021).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Inibição enzimática da AChE e BChE.

Perfis anticolinesterásicos de anéis tricíclicos derivados da acridina, já discutidos anteriormente, justificaram a realização de um *screening* de inibição enzimática, *in vitro*, para os derivados acridínicos apresentados no capítulo 1 (Figura 25). O experimento foi realizado em enzimas AChE de enguia elétrica (*ee*AChE) e BChE de soro equino (*eq*BChE), utilizando o método de Ellman, em que a atividade na enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática (tiocolina) com um reagente pró-cromóforo, o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). Um composto referência, o CATF-5C (AChE $CI_{50} = 4,79 \mu\text{M}$; BChE $CI_{50} = 3,54 \mu\text{M}$) foi usado como controle positivo no *screening*, por apresentar atividade moderada diante das colinesterases estudadas. Os respectivos resultados nos ensaios de inibição frente às colinesterases, em uma concentração fixada de $10 \mu\text{M}$, encontram-se nas Figuras 27 e 28.

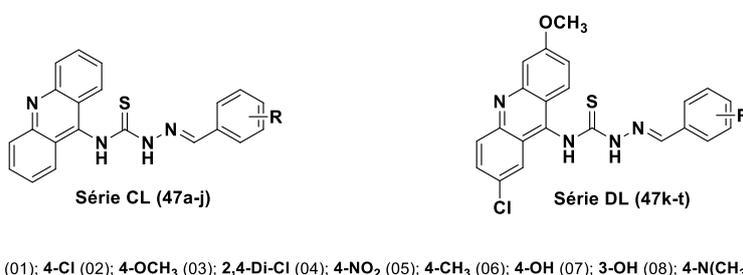


Figura 26. Derivados acridínicos avaliados frente ao perfil anticolinesterásico.

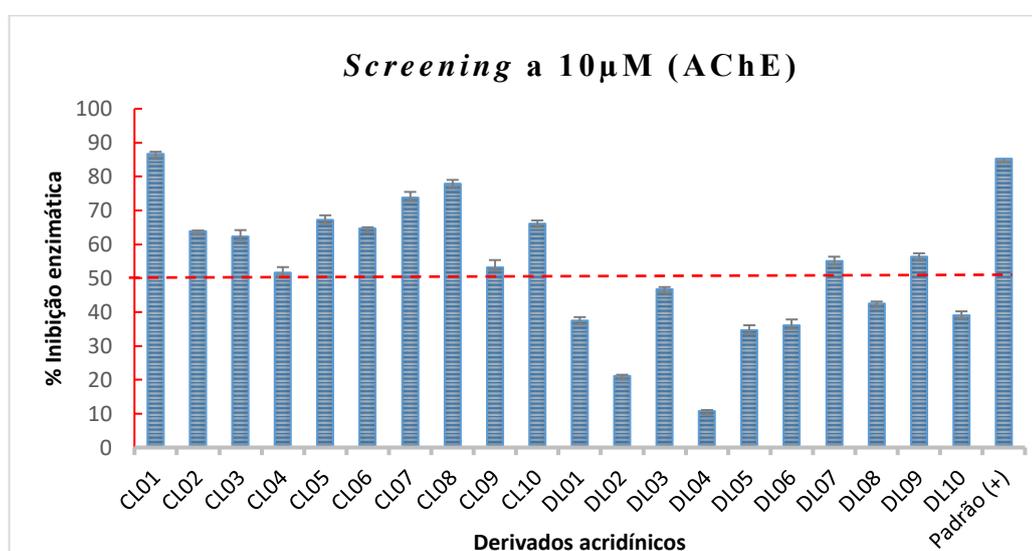


Figura 27. Inibição dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos frente à AChE.

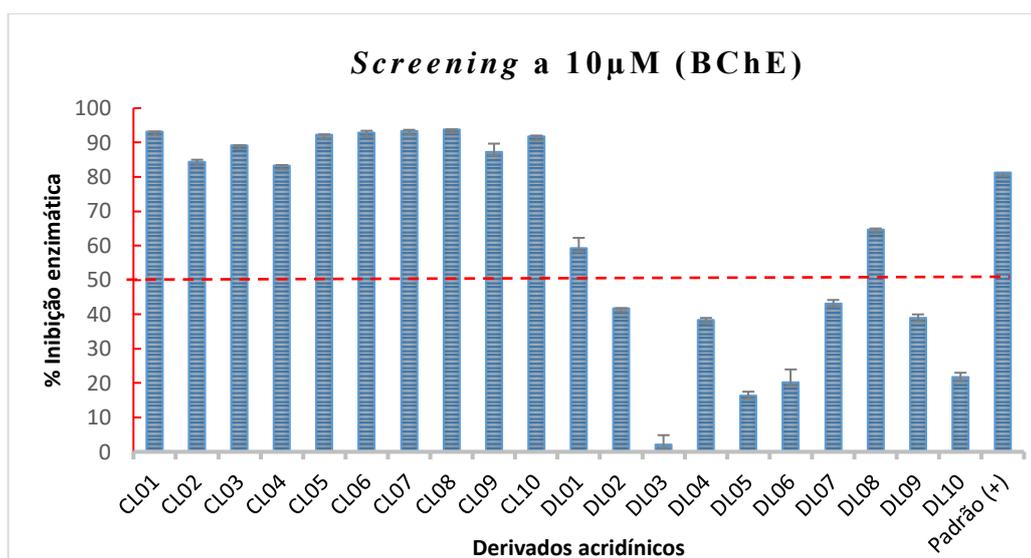
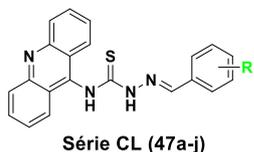


Figura 28. Inibição dos novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos frente à BChE.

Notavelmente, os derivados dissustituídos (série DL), em sua maioria, apontaram inibição abaixo de 50% na concentração avaliada, sendo por isso, considerados ineficientes frente à inibição colinesterásica. Em contrapartida, todos os derivados sem substituição (CL) foram ativos, principalmente diante da BChE, demonstrando um perfil inibitório de 83 a 94% (10 µM). Com potência reduzida, os compostos da série CL também inibiram a AChE, com destaque para CL-01 que apresentou inibição de 87%. Com objetivo de entender um pouco mais sobre a capacidade anticolinesterásicas dos derivados acridínicos (CL) cálculos de CI_{50} foram realizados e são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 10. Avaliação das potências de inibição da série CL frente as colinesterases.

R	Composto	CI ₅₀ in μM ^a			
		AChE ^b (DP)	BChE ^c (DP)	IS AChE	IS BChE
H	CL-01	2,47 (0,11)	0,71 (0,04)	0,29	3,48
4-Cl	CL-02	10,13 (0,52)	2,19 (0,15)	0,22	4,62
4-OCH ₃	CL-03	6,20 (0,20)	1,04 (0,02)	0,17	5,96
2,4-Cl	CL-04	6,11 (0,23)	1,06 (0,04)	0,17	5,76
4-NO ₂	CL-05	8,64 (0,33)	0,89 (0,02)	0,10	9,71
4-CH ₃	CL-06	2,78 (0,22)	1,54 (0,05)	0,55	1,80
4-OH	CL-07	11,48 (0,14)	1,73 (0,11)	0,15	6,63
3-OH	CL-08	22,01 (0,96)	2,28 (0,12)	0,10	9,65
4-N(CH ₃) ₂	CL-09	7,60 (0,49)	1,77 (0,08)	0,23	4,29
4-Br	CL-10	9,79 (0,35)	3,18 (0,24)	0,32	3,07
Donepezila		0,007 (0,01)	2,39 (0,10)	341,43	0,003



^a Concentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos \pm desvio padrão (DP) em triplicatas de ensaios independentes; ^b AChE de enguia elétrica; ^c BChE de soro equino; Índice de seletividade (IS) é dado como BChE CI₅₀/AChE CI₅₀.

Os derivados acridínicos avaliados apresentaram potência de inibição moderada na AChE, com CI₅₀ entre 2,47 e 22,01 μM. Com exceção do derivado CL-06 (R= 4-CH₃) que se mostrou equipotente (CI₅₀ = 2,78 μM) ao derivado não substituído CL-01 (CI₅₀ = 2,47 μM), os outros substituintes avaliados levaram a redução da atividade inibitória. Por outro lado, de maneira geral, todos os compostos avaliados na BChE mostraram destacados perfis inibitórios, com pouca influência estérica e/ou eletrônica dos substituintes na posição **R**, sendo o composto CL-01 o mais ativo (CI₅₀ = 0,71 μM) e o CL-10 menos ativo (CI₅₀ = 3,18 μM) (REHUMAN et al., 2021; WU et al., 2020b).

Como descrito, o perfil de substituição em **R** mostrou uma maior influência na AChE quando comparada a BChE. Estes resultados se correlacionam com as propriedades estruturais das colinesterases discutidas anteriormente, que apontam uma maior restrição estéreo-eletrônica no acesso aos sítios da interação com a AChE, principalmente na região do CAS. Enquanto os compostos não substituído (CL-01) e com o grupo metila (CL-06) apresentaram baixos índices de seletividade, um considerável aumento de seletividade pela BChE foi perceptível aos derivados com substituintes mais volumosos (4-OCH₃, 2,4-Cl e 4-NO₂), assim como, os hidroxilados que podem atuar como doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, diferentemente do derivado CL-06.

2.2 Avaliação da cinética enzimática

Os inibidores enzimáticos são compostos capazes de diminuir ou interromper a catálise enzimática e diferem quanto ao modo de ligação com a enzima. O modo de ligação irreversível é caracterizado pela inativação total da enzima, comumente associado a existência de ligações covalentes com o complexo enzima-substrato. O outro modo de ligação possível, a reversível, leva a formação de um complexo dinâmico com a enzima, sendo classificada de acordo com seu mecanismo de inibição: competitivo, incompetitivo, não-competitivo e misto (PATADIYA; PANCHAL; VAGHELA, 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017). A avaliação do mecanismo de inibição pode ser feita quantitativamente pela cinética do estado estacionário, a partir do efeito que o inibidor produz nas constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$, facilmente reveladas no gráfico de duplo recíproco, também denominado gráfico de Lineweaver-Burk (LAMBA; PESARESI, 2022; NAJAFI et al., 2016; ZAWADA et al., 2021).

Dados os distintos perfis inibitórios acima apresentados, tanto no que se diz respeito a diferença de atividades entre as séries substituídas e não substituídas na acridina, como ao perfil mais ativo da série CL diante à BChE, estudos de cinética enzimática foram propostos para ajudar na compreensão e prospecção de novos derivados anticolinesterásicos, tendo como base as interações dos compostos CL-01 e CL-05 com as enzimas estudadas (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados da cinética enzimática para os compostos CL-01 e CL-05 nas colinesterases.

Concentração (μM)	$V_{máx} \pm DP$ (μM/min)	$K_m \pm DP$ (μM)	K_i (μM) $\pm DP^a$	K_i' (μM) $\pm DP^b$
CL-01 em BChE				
0	13,84 \pm 0,587	123,10 \pm 8,344		
0,5	6,97 \pm 0,021	214,65 \pm 3,889	0,72 \pm 0,007	1,68 \pm 0,020
0,9	5,02 \pm 0,013	319,80 \pm 7,495		
CL-01 em AChE				
0	20,47 \pm 0,445	71,59 \pm 1,762		
1,5	9,33 \pm 0,804	67,57 \pm 2,560	-	1,35 \pm 0,056
4	5,38 \pm 0,503	68,24 \pm 2,746		
CL-05 em BChE				
0	14,83 \pm 1,155	96,21 \pm 5,034		
0,7	9,95 \pm 0,805	206,8 \pm 13,789	0,20 \pm 0,008	0,53 \pm 0,019
1,1	9,078 \pm 0,389	341,3 \pm 23,193		
CL-05 em AChE				
0	21,11 \pm 0,736	77,50 \pm 0,671		
7	6,75 \pm 0,364	78,39 \pm 0,685	-	2,97 \pm 0,091
10	4,41 \pm 0,029	78,31 \pm 0,566		

^aConstante de afinidade para inibição competitiva; ^bConstante de afinidade para inibição não-competitiva; dados obtidos \pm desvio padrão (DP) em triplicatas de ensaios independentes.

A partir dos valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 11) e dos gráficos de Lineweaver-Burk (Figuras 29 e 30), perfis distintos de inibiao as colinesterases promovidas pelos compostos testados foram observadas. A inibiao não-competitiva ($V_{m\acute{a}x}$ diminuindo, K_m invariável e interseao das retas no eixo X), com proposta de interaao alostérica com a região do PAS nas colinesterases, foi característica aos inibidores na AChE (YANG et al., 2013). Especificamente para a enzima BChE, os parâmetros acompanhados indicaram uma inibiao do tipo mista ($V_{m\acute{a}x}$ diminuindo, K_m aumentando, interseao das retas no 2o quadrante do sistema cartesiano). Desse modo, a possibilidade de interaao intermolecular simultânea aos sítios CAS, alterando a atividade catalítica da BChE, e/ou PAS da enzima, inibindo uma possível agregaao do peptídeo β -amilóide nessa região, sugerem um perfil multialvo aos sítios de ligaao da BChE para os novos derivados acridínicos-tiossemicarbazônicos (SANTOS et al., 2019).

As constantes de inibioes para os perfis competitivos (K_i) e não-competitivos (K_i') na BChE indicaram uma melhor interaao dos derivados  região CAS da enzima. Adicionalmente, o menor caráter inibitório para os derivados acridínicos estudados na AChE pode estar associado  incapacidade de interaao destes com a região catalítica da enzima, muito provavelmente devido aos resíduos aromáticos presentes no seu sítio periférico (PAS) que acarretam um impedimento estérico na passagem dos derivados pelo canal. Como resultado dessa interaao somente no PAS, a constante K_i' calculada para os derivados estudados frente a AChE retratou a atividade inibitória encontrada com valores de 1,35 μ M para o CL-01 e 2,97 μ M, para o CL-05.

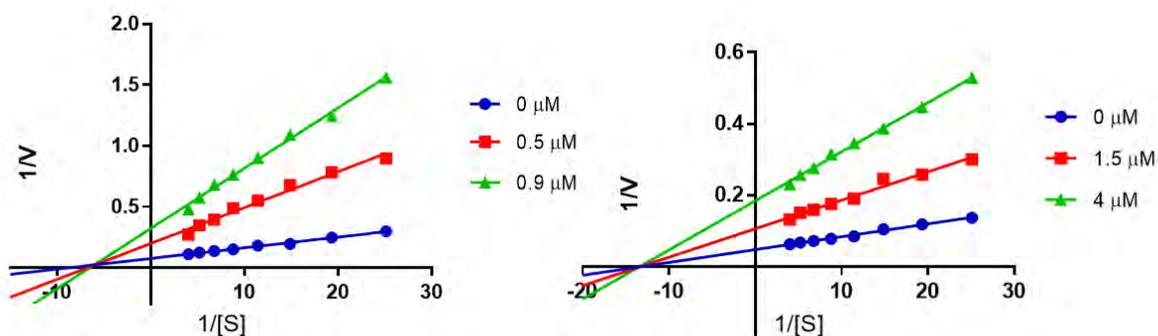


Figura 29. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibiao em *eq*BChE ( esquerda) e em *ee*AChE ( direita) para o composto CL-01.

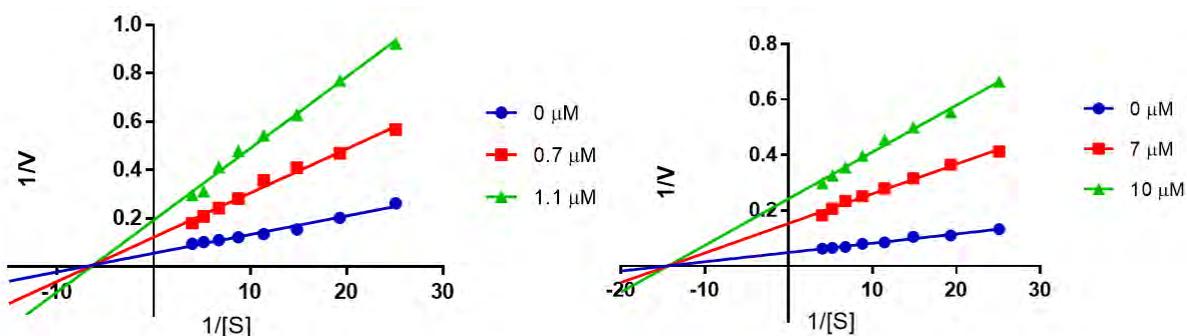


Figura 30. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *eqBChE* (à esquerda) e em *eeAChE* (à direita) para o composto CL-05.

2.3 Planejamento e avaliação anticolinesterásica de novos derivados acridínicos

A partir dos resultados de inibição enzimática apresentados acima, informações intrínsecas a proposta de atividade anticolinesterásica para os derivados acridínicos foram obtidas, indicando que modificações estereo-eletrônicas poderiam modular seus perfis. Com objetivo de otimizar as potências e seletividades dentro dessa classe de compostos, além de adicionar novas atividades como complexante de metais e/ou antioxidante, novos compostos foram propostos conforme Figura 31: 1- diferentes isómeros da fenila, variando o volume e propriedades eletrônicas, visaram avaliar se grupos menos volumosos poderiam aumentar a atividade frente a AChE enquanto os de maior volume poderiam potencializar a seletividade pela BChE; 2- substituintes *orto*-hidroxila visando a criação de um ponto de complexação com a imina; 3- dois fragmentos com descrições antioxidantes foram incorporados ao arcabouço da série CL vislumbrando uma atividade biológica adicional (Figura 31).

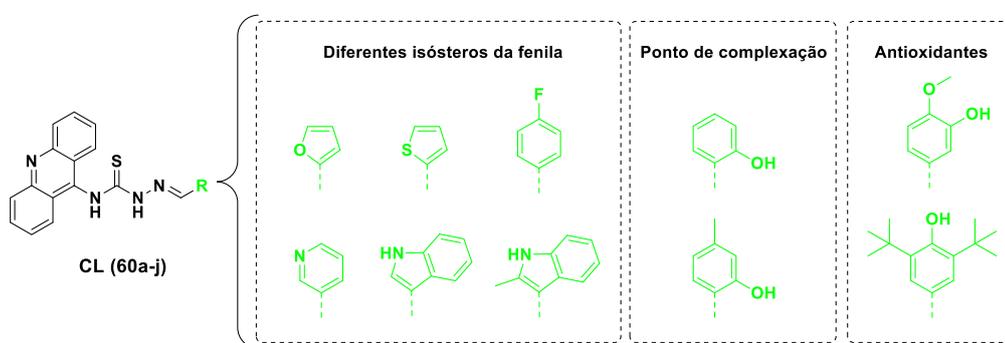


Figura 31. Novos derivados acridínicos planejados para atividade anticolinérgica.

Os novos compostos planejados foram sintetizados seguindo as rotas descritas nos capítulos 1 e 2 e a Tabela 12 apresenta os resultados de atividade anticolinesterásica (CI_{50}). Os derivados acridínicos avaliados não apresentaram melhora nos perfis inibitórios na AChE, com

CI₅₀ entre 8,57 e 43,35 µM, embora tenham sido novamente interessantes frente a BChE com CI₅₀ entre 1,15 e 8,16 µM.

Substituintes isósteros clássicos do CL-01 como o CL-Tio e o CL-Fur apontaram considerável redução no perfil inibitório da AChE. Apesar de ambos apresentarem menor volume comparado à fenila, provavelmente a densidade eletrônica do S e O de certa forma não é bem tolerada. Vale o destaque que o composto CL-Tio apresentou razoável atividade inibitória da BChE (CI₅₀ = 2,45 µM) e a melhor seletividade dentre todos os compostos (IS = 14,13). Já os isósteros indólicos (CL-Indol e CL-InM) foram ligeiramente melhores, apontando os melhores perfis inibitórios em AChE dentro da nova série, mantendo também boas potências de inibição da BChE (CI₅₀ = 1,68 µM e CI₅₀ = 2,01 µM, respectivamente).

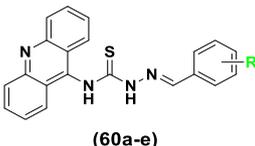
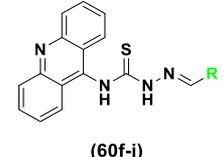
Quanto ao CL-F, a presença do átomo de flúor na posição *para*, como proposta isostérica ao CL-01, apontou perda de 5 vezes na potência de inibição sobre a AChE com destacado perfil BChE (CI₅₀ = 1,35 µM), próximo ao CL-01, e interessante seletividade com IS de 9,44. Quando comparado aos outros compostos halogenados da série, mostrou-se equipotente na inibição da AChE, mais potente frente a BChE e com melhor IS: CL-02 (cloro, AChE CI₅₀ = 10,13 µM; BChE CI₅₀ = 2,19 µM; IS = 4,62) e CL-10 (bromo, AChE CI₅₀ = 9,79 µM; BChE CI₅₀ = 3,18 µM; IS = 3,07). A característica mais potente e seletiva do CL-F em BChE pode estar relacionada ao seu perfil peculiar eletrostático, como resultado de sua alta eletronegatividade e baixa polarizabilidade em relação aos outros haletos de arila, essa característica pode ser intrinsecamente importante considerando o universo das interações intermoleculares disponíveis no sítio de ligação da enzima em discussão (BOUZID MENAA, 2013; SHARBER; MULLIN; THOMAS, 2021; VARADWAJ et al., 2018).

Derivado monovalente hidroxilado em *orto*, o CL-2OH reproduziu baixo perfil inibitório (AChE CI₅₀ = 10,84 µM e BChE CI₅₀ = 3,13 µM); destaca-se ainda que a presença da hidroxila também influenciou negativamente em ambas as atividades anticolinesterásicas quando presente em um composto dissustituído (CL-2OH,4-CH₃; AChE CI₅₀ = 11,25 µM, BChE CI₅₀ = 3,19 µM), visto que o derivado CL-06 (4-metilbenzilideno, AChE CI₅₀ = 2,78 µM, BChE CI₅₀ = 1,54 µM) tinha apontado um dos melhores perfis inibidores da primeira classe avaliada.

Já proposta de um fragmento antioxidante que associou dois grupos nas posições *meta* e *para* (CL-3OH,4OCH₃) indicou o pior perfil inibitório avaliado frente a AChE, CI₅₀ = 43,35 µM, também muito distinto de um de seus correlatos, o CL-03 (4-metoxibenzilideno, AChE CI₅₀ = 6,20 µM). Por outro lado, o derivado CL-DiTerc indicou o melhor perfil de atividade

dos novos derivados frente a BChE com $CI_{50} = 1,15 \mu M$, muito semelhante ao CL-01, mas levando a uma perda de potência em torno de 4 vezes frente a AChE ($CI_{50} = 10,53 \mu M$), o que levou a este composto a se destacar por apresentar um IS de 9,16.

Tabela 12. Atividade inibitória frente as colinesterases para os novos derivados acridínicos.

	R	Composto	$CI_{50} (\mu M^a)$			
			AChE ^b (DP)	BChE ^c (DP)	IS AChE	IS BChE
 <p>(60a-e)</p>	H (47a)	CL-01	2,47 (0,11)	0,71 (0,04)	0,29	3,48
	4-F	CL-F	12,75 (0,31)	1,35 (0,12)	0,11	9,44
	3-OH, 4-OCH ₃	CL-3OH,4OCH ₃	43,35 (3,78)	3,30 (0,30)	0,08	13,14
	3,5-DiTerc, 4-OH	CL-DiTerc	10,53 (0,70)	1,15 (0,11)	0,11	9,16
	2-OH	CL-2OH	10,84 (0,37)	3,13 (0,15)	0,29	3,46
	2-OH, 4-CH ₃	CL-2OH,4CH ₃	11,25 (0,41)	3,19 (0,13)	0,28	3,53
 <p>(60f-j)</p>	3-Piridina	CL-3PIRI	ND	ND	-	-
	2-Furfural	CL-Fur	28,03 (0,96)	4,40 (0,20)	0,16	6,37
	2-Tiofeno	CL-Tio	34,63 (3,21)	2,45 (0,17)	0,07	14,13
	3-Indol	CL-Indol	9,39 (0,29)	1,68 (0,06)	0,18	5,59
	2-Metil-3-Indol	CL-InM	8,57 (0,34)	2,01 (0,14)	0,23	4,26
	Donepezila			0,007 (0,01)	2,39 (0,10)	341,43

^a Concentração necessária para inibir 50% da atividade anticolinérgica, dados obtidos \pm desvio padrão (DP) em triplicatas de ensaios independentes; ^b AChE de enguia elétrica; ^c BChE de soro equino; Índice de seletividade (IS) é dado como $BChE CI_{50}/AChE CI_{50}$. ND (não determinado) - derivado apresentou baixo ou nenhum perfil de atividade em concentração fixada à $10 \mu M$ (baixa solubilidade em MeOH).

2.4 Avaliação da troca da acridina pela tetraidroacridina na atividade anticolinesterásica

As características anticolinesterásicas encontradas para a tacrina e derivados comumente são justificadas pela estabilização do fragmento da tetraidroacridina ao sítio catalítico das colinesterases através de interações hidrofóbicas (NAJAFI et al., 2016; ROSSI et al., 2021). A fim de compreender um pouco mais sobre o modo de ligação dos novos derivados acridínicos com as colinesterases, principalmente no que diz respeito a capacidade do núcleo acridínico em acessar o sítio catalítico das colinesterases, uma troca da acridina pelo núcleo tetraidroacridina da tacrina foi avaliada (Figura 32).

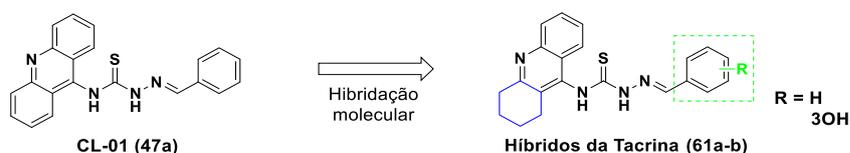
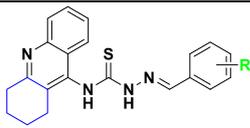
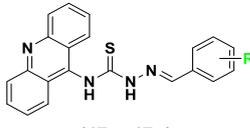


Figura 32. Novos derivados da tetraidroacridina planejados em comparação aos derivados acridínicos como agentes anticolinesterásicos.

Os derivados tetraidroacridinas (TAs), quando comparados aos seus correspondentes acridinas, apresentaram atividades anticolinesterásicas reduzidas (Tabela 13). A principal diferença entre os compostos da série CL e TA consiste no perfil eletrônico do núcleo tricíclico, que pode influenciar em modos de ligações distintos com as enzimas, coordenados principalmente pelas delimitações estéreo-eletrônicas de cada bolsão enzimático e as possíveis interações hidrofóbicas com eles realizados.

Tabela 13. Atividade inibitória frente as colinesterases para os novos derivados tetraidroacridinas.

R	Composto	CI ₅₀ (μM ^a)				
		AChE ^b (DP)	BChE ^c (DP)	IS AChE	IS BChE	
 (61a-b)	H	TA-H	13,60 (0,70)	5,38 (0,18)	0,40	2,53
	3-OH	TA-3OH	ND	3,03 (0,01)	-	-
 (47a; 47g)	H	CL-01 (47a)	2,47 (0,11)	0,71 (0,04)	0,29	3,48
	3-OH	CL-08 (47h)	22,01 (0,96)	2,28 (0,12)	0,10	9,65
		Donepezila	0,007 (0,01)	2,39 (0,10)	341,43	0,003
		Tacrina	0,069 ^d	0,011 ^d	0,16	6,27

^a Concentração necessária para inibir 50% da atividade anticolinérgica, dados obtidos ± desvio padrão (DP) em triplicatas de ensaios independentes; ^b AChE de enguia elétrica; ^c BChE de soro equino; Índice de seletividade (IS) é dado como BChE CI₅₀/AChE CI₅₀. ^d (XU et al., 2020). ND (não determinado) - derivado apresentou baixo perfil de atividade em concentração fixada à 10 μM.

Relatos científicos apontam alguns exemplos de hibridações da tiossemicarbazona a núcleos tetraidroacridinas da tacrina que mimetizariam sistemas próximos aos propostos neste trabalho (Figura 33) (ALFADLY et al., 2019; ZAIB et al., 2021). Esses achados apontam para algumas discussões como: i) a proposta retroisostérica da tiossemicarbazona (TA-H) poderia gerar mais restrições estéricas, proximidade da ligação C=S ao núcleo da tetraidroacridina (comparação com o composto **63**), o que poderia dificultar o melhor ajuste na cavidade hidrofóbica do sítio catalítico da enzima, considerando os resultados apresentados por Alfadly et al. (2019) que discutem uma inibição mista envolvendo o núcleo da tetraidroacridina; ii) incrementos na labilidade da tiossemicarbazona (adição de espaçadores alquílicos) com adição de fragmentos direcionais ao sítio catalítico (morfolina) favoreceram a atividade anticolinérgica frente a AChE, enfatizando a restrição estérica característica ao canal presente no sítio de ligação da enzima; iii) a adição do núcleo acridínico aos compostos **62** e **63** provavelmente acometeria maior perfil biológico principalmente frente a BChE. Todos esses achados, em associação com as diferenças na atividade encontradas para o CL-01 e TA-H, assim como o

resultado da cinética para o CL-01, que indicou um perfil não-competitivo em AChE, sugerem a possibilidade de diferenças nos modos de ligação desses compostos na AChE (HAMULAKOVA et al., 2021; XU et al., 2020). Considerando a BChE e as peculiaridades do seu bolsão, a diferença no perfil anticolinérgico possivelmente é explicado pelo aumento das interações envolvendo empilhamento de elétrons com o sítio catalítico da enzima (JIANG et al., 2019).

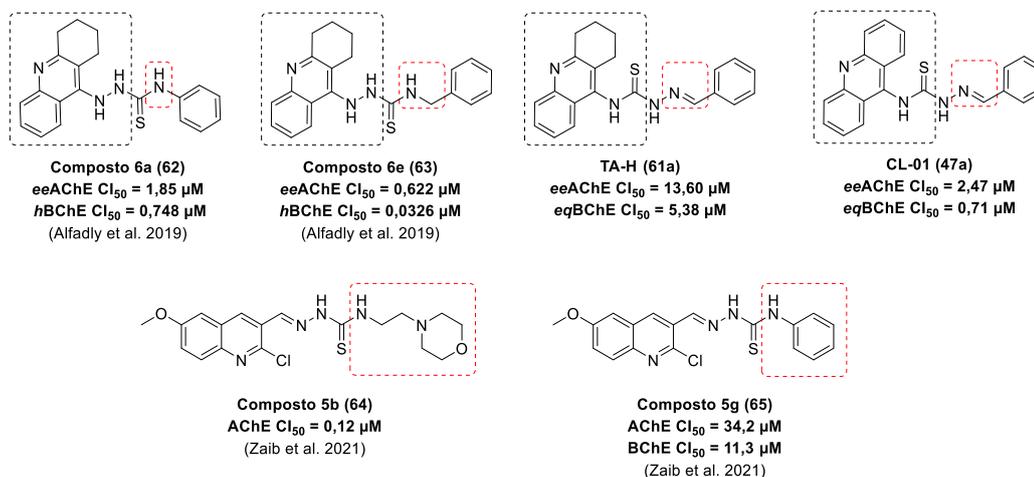


Figura 33. Híbridos tiossemicarbazônicos descritos com atividade anticolinérgica.

A partir dos valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 14) e dos gráficos de Lineweaver-Burk (Figuras 34) o perfil anticolinérgico da TA-H foi elucidado, sugerindo inibições do tipo mista em ambas as colinesterases ($V_{m\acute{a}x}$ diminuindo, K_m aumentando, interseção das retas no 2º quadrante do sistema cartesiano). Desse modo, a forma de interação desse derivado se dá aos sítios CAS e/ou PAS da enzima com competição ao sítio do substrato, ou ainda, estabilização de um complexo ternário entre o substrato, a AChE e o derivado tetraidroacridínico. As constantes de inibições competitiva (K_i) e não-competitiva (K_i') na AChE indicaram uma maior interação do TA-H à região CAS da enzima. Foi apontada uma diferença de quase cinco vezes entre as constantes inibitórias, indicando uma atuação enfática do derivado a esta região, perfil este distinto do encontrado para o CL-01 (derivado acridínico direto).

De Aquino et al. (DE AQUINO et al., 2013) apresentou resultados correlacionando a distância ideal entre os anéis tetraidroacridina em dímeros da tacrina (14,5 a 16 Å), conectados por espaçadores flexíveis, na qual a atividade inibidora de colinesterases seria otimizada pela maior complementaridade dos anéis aromáticos com resíduos hidrofóbicos dos sítios CAS e PAS da AChE nesta distância. Esses achados, em associação com as discussões e comparações apresentadas no tópico anterior, poderiam justificar a baixa inibição dos híbridos da tacrina

deste trabalho, tendo em vista que a distância encontrada entre os sítios hidrofóbicos do TA-H foi de 12,4 Å (átomo de nitrogênio da quinolina ao C-4 do benzilideno)(XU et al., 2020).

Tabela 14. Resultados da cinética enzimática para o derivado TA-H nas colinesterases.

Concentração (μM)	$V_{\max} \pm DP$ (μM/min)	$K_m \pm DP$ (μM)	K_i (μM) $\pm DP^a$	$K_{i'}$ (μM) $\pm DP^b$
TA-H em BChE				
0	5,51 \pm 0,516	102,98 \pm 6,050		
3	3,58 \pm 0,081	154,30 \pm 1,121	1,41 \pm 0,025	3,63 \pm 0,062
6,5	2,60 \pm 0,021	169,93 \pm 2,122		
TA-H em AChE				
0	2,77 \pm 0,167	34,88 \pm 2,503		
11	1,47 \pm 0,085	43,37 \pm 3,279	1,66 \pm 0,048	9,82 \pm 0,288
16	1,07 \pm 0,056	46,47 \pm 1,351		

^aConstante de afinidade para inibição competitiva; ^bConstante de afinidade para inibição não-competitiva; dados obtidos \pm desvio padrão (DP) em triplicatas de ensaios independentes.

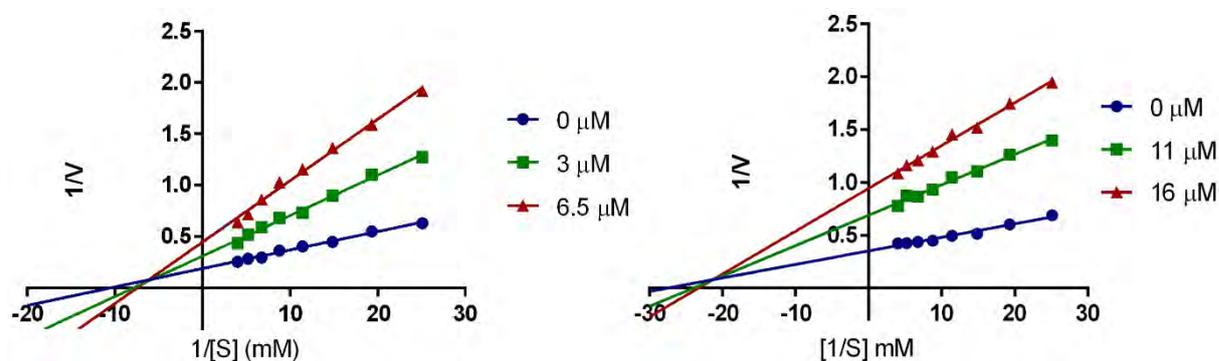


Figura 34. Gráfico de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *eq*BChE (à esquerda) e em *ee*AChE (à direita) para o composto TA-H.

2.5 Ancoramento molecular

Como forma de complementação aos resultados apresentados pelos ensaios de inibição *in vitro* e as cinéticas enzimáticas, o estudo de ancoramento molecular foi proposto visando compreender um pouco mais sobre o perfil estrutura-atividade dos derivados estudados. Um modelo cristalográfico disponível no PDB para a AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) com código 1c2b foi utilizado para o encaixe (SANTOS et al., 2019).

Todos os estudos teóricos foram conduzidos pelo programa GOLD, através da função de pontuação *gold score*. Dada a característica do modelo em não ter ligante co-cristalizado, todos os encaixes tiveram como definição do sítio de ligação uma lista de resíduos de aminoácidos que comumente são encontrados nos modelos cristalográficos de AChE co-cristalizados com a donepezila, destacado inibidor da AChE (CHEUNG et al., 2012; GERLITS et al., 2019; GUO et al., 2020). A Tabela 15 apresenta os parâmetros obtidos após o

ancoramento de alguns dos novos derivados que foram escolhidos pelas variações estruturais e perfis biológicos identificados experimentalmente (CL-01, CL-06, CL-F, CL-DiTerc, CL-InM, TA-H).

Em um perfil de interação muito conhecido, a donepezila, reproduziu as interações intermoleculares com o modelo cristalográfico utilizado com interações na região CAS através da benzilpiperidina, assim como a fração indanona apresentou interações com o PAS da AChE via empilhamento π - π (WANG et al., 2016). O canal que liga as duas principais cavidades das colinesterases (CAS e PAS) concentra a maior diferença estrutural entre os sítios ativos das AChE e BChE, e este pode ser determinante no perfil de inibição enzimática identificado neste trabalho.

Os resultados de encaixe obtidos para os derivados acridínicos na AChE (Figura 34) em consonância com os apresentados da cinética, sugerem que nessa enzima as interações desses derivados estão concentradas na região do PAS e no canal, não sendo identificadas interações diretas com os resíduos do CAS. Em um perfil de ancoramento peculiar quando comparado aos demais derivados acridínicos, o derivado CL-01 indicou múltiplas interações hidrofóbicas, polares e eletrostáticas com os resíduos de Trp²⁸⁶ e Asp⁷⁴, o que aparentemente foi determinante no modo de encaixe, principalmente pelo perfil não substituído no benzilideno. Adicionalmente, há alguma restrição estérica nesta região de interação a qualquer padrão de substituição. Destaca-se ainda, que as interações polares com o resíduo Asp⁷⁴ comumente estão associadas a modulações indiretas do sítio de ligação da colina na AChE, podendo ser correlacionadas ao maior perfil inibidor encontrado para CL-01 (JANG et al., 2018; ROSENBERRY et al., 2017).

Tabela 15. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular dos novos derivados em um modelo cristalográfico de acetilcolinesterase enguia elétrica (PDB ID: 1c2b).

Compostos	CI ₅₀ AChE (μM)	Score	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	
				π -alquil	Empilhamento π - π
CL-01	2,47	67,11	Asp ⁷⁴ Trp ²⁸⁶	Tyr ⁷²	Trp ²⁸⁶
CL-06	2,78	64,16	Tyr ¹²⁴	Leu ²⁸⁹	Tyr ⁷² Tyr ¹²⁴ Trp ²⁸⁶
CL-F	12,75	62,46	-	Leu ²⁸⁹	Tyr ⁷² Trp ²⁸⁶ Phe ³³⁸
CL-DiTerc	10,53	62,05	Tyr ¹²⁴	His ⁴⁴⁷ Leu ²⁸⁹ Phe ³³⁸	Tyr ⁷² Trp ²⁸⁶ Tyr ³³⁷
CL-InM	8,57	66,61	-	Leu ²⁸⁹	Tyr ¹²⁴ Trp ²⁸⁶ Tyr ³³⁷
TA-H	13,60	73,42	Tyr ³³⁷	Trp ⁸⁶ Tyr ³³⁷ His ⁴⁴⁷	Trp ⁸⁶ Tyr ³⁴¹
Donepezila	0,007	86,74	Phe ²⁹⁵	Phe ³³⁸ Tyr ³³⁷	Trp ⁸⁶ Trp ²⁸⁶
Tacrina	0,069	50,46	His ⁴⁴⁷	Trp ⁸⁶ Tyr ³³⁷	Trp ⁸⁶

* Os cálculos teóricos foram conduzidos pelo programa Gold, sendo o encaixe baseado nos resíduos descritos como essenciais para o ancoramento molecular da donepezila; modelo cristalográfico PDB ID: 1c2b.

O estudo teórico aplicado não conseguiu pontuar diferenças significativas no modo de encaixe que justificassem a redução da potência frente a AChE em quase cinco vezes do composto CL-F ($CI_{50} = 12,75 \mu M$) quando comparado ao derivado CL-06 ($CI_{50} = 2,78 \mu M$). Entretanto, interações intermoleculares distintas com os resíduos de Tyr¹²⁴ e Phe³³⁸ justificariam a diferença na pontuação de encaixe apontada no estudo para os dois compostos. Ademais, o composto CL-DiTerc teve um deslocamento considerável no modo de encaixe na AChE quando comparado ao CL-06, justificado principalmente pelo grande volume estérico do substituinte em **R**, tendo essa característica impactado as interações de empilhamento com o Trp²⁸⁶, e consequentemente sua pontuação de afinidade ao receptor e sua atividade inibitória.

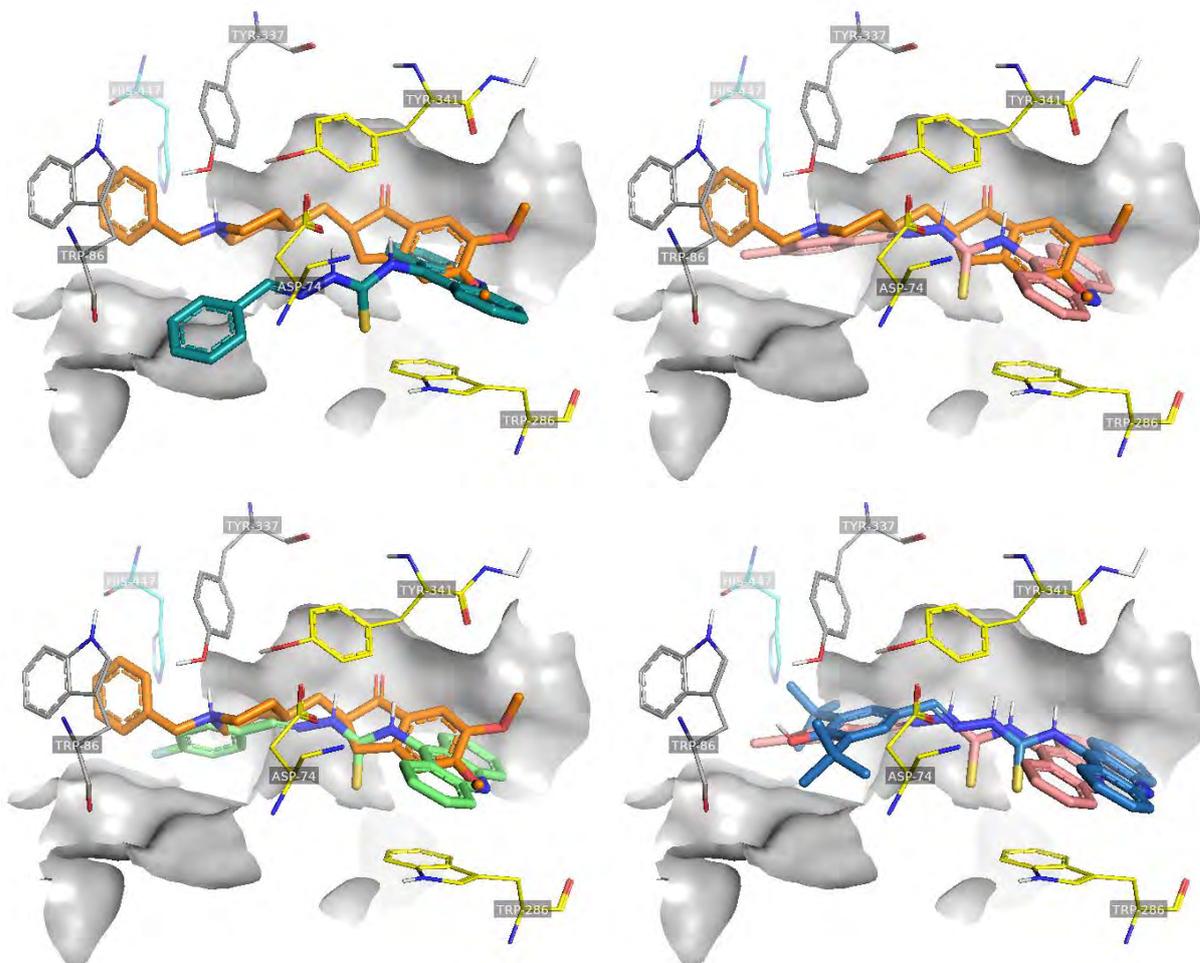


Figura 35. Ancoramento molecular do CL-01 (verde-petróleo), CL-06 (bege), CL-F (verde-claro) e CL-DiTerc (azul) na *eeAChE* (PDB ID: 1c2b) em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja). Os resíduos de aminoácidos destacados nas cores cinza e amarela constituem, respectivamente, os principais sítios hidrofóbicos presentes no CAS e PAS da colinesterase estudada. Adicionalmente, alguns resíduos que constituem o canal foram representados em um gráfico de superfície indicando parcialmente as restrições estéricas do canal; na cor ciano destaca-se o resíduo de His⁴⁴⁷ como representante da tríade catalítica do sítio.

A Figura 36 apresenta os resultados de ancoramento molecular para os derivados CL-InM e TA-H. Destaca-se a capacidade do CL-InM, a partir da proposta da inserção de núcleos condensados em **R**, em interagir com os resíduos de Tyr³³⁷ e Trp⁸⁶, resíduos estes envolvidos na ligação a colina (CAS). Este perfil de interação é um ponto interessante de discussão e que já foi previamente inserido neste trabalho, a distância promovida pela tiossemicarbazona acaba sendo insuficiente a nível de acomodação do arcabouço base da série CL proposto com as principais regiões hidrofóbicas da AChE (DE AQUINO et al., 2013). Toda essa discussão é confrontada com o modelo 2D de encaixe do CL-InM com a AChE, onde principalmente para o resíduo de Trp⁸⁶, o derivado se encontra distante para o tipo de interação intermolecular proposta, essa característica afetaria a formação do complexo composto-AChE e gerando menor estabilidade nessa região de interação com o receptor (VERNON et al., 2018).

Paralelamente, os estudos teóricos indicaram dois modos possíveis de interação para o TA-H com a enzima. O modo apresentado abaixo, com a tetraidroacridina inserida no CAS, ilustra a forma mais reprodutível e com maior pontuação encontrada pelo programa, enquanto a menos reprodutível apresentou o perfil descrito para os derivados acridínicos anteriormente. Em concordância com os dados experimentais de cinética que indicaram um modo de inibição misto (com $K_i > K_i'$), o estudo de modelagem conseguiu mimetizar a capacidade do núcleo tetraidroacridina em acessar o canal com principal ponto de interação à região do CAS. Esses dados estão em conformidade com os descritos literários para os derivados da tacrina (ALFADLY et al., 2019; MAKHAEVA et al., 2023). Novamente, a imagem em 2D da interação TA-H com a enzima descreve um perfil interessante de encaixe aos principais resíduos do CAS (Tyr³³⁷ e Trp⁸⁶), com interações adicionais a His⁴⁴⁷ (aminoácido da tríade catalítica). Entretanto, o estudo também revelou um baixo perfil de interações com a região do PAS e possível perda da interação ao Trp²⁸⁶, o que poderia estar associado à redução do perfil de inibição da AChE desse arcabouço, assim como justificaria a observação de um $K_i > K_i'$.

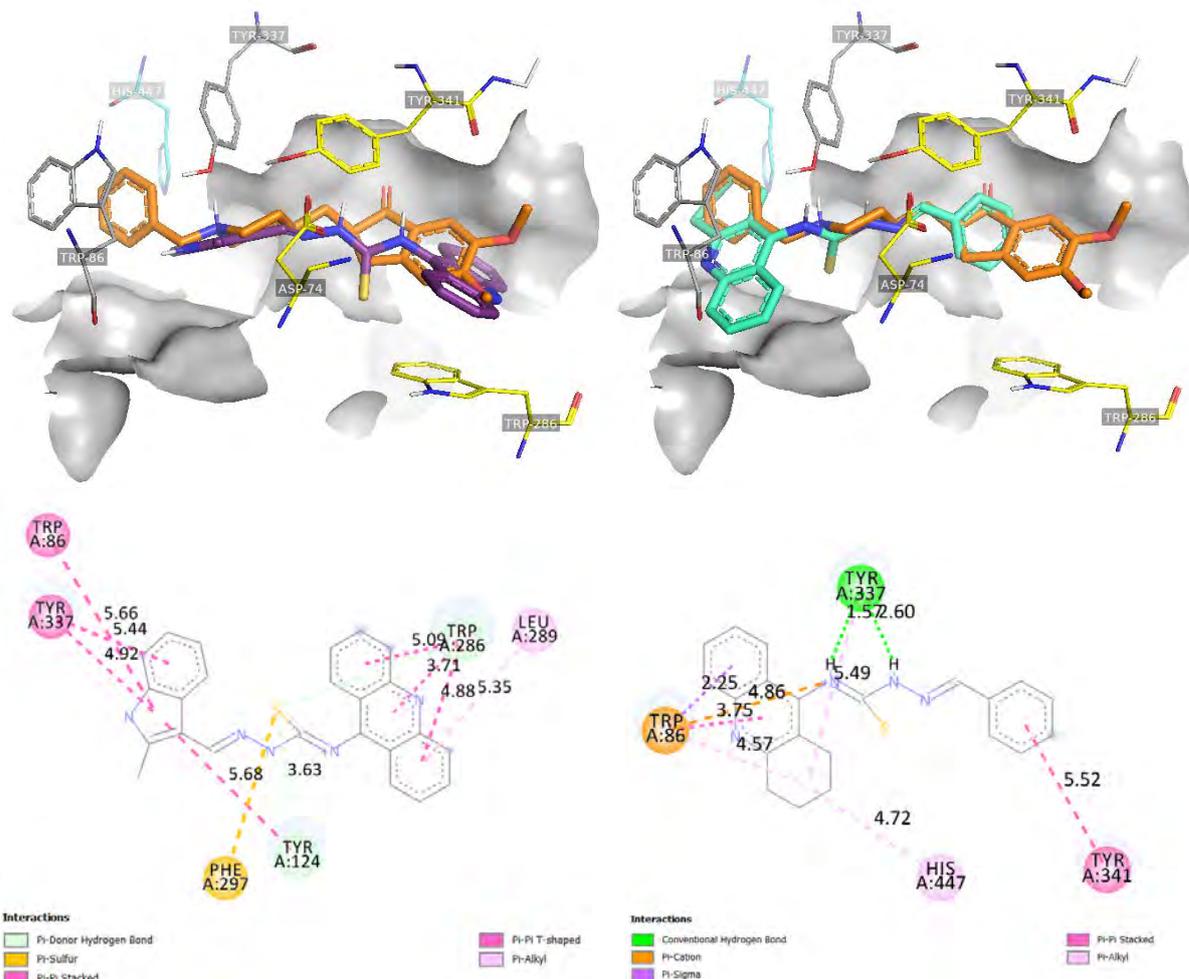


Figura 36. Ancoramento molecular do CL-InM (lilás) e TA-H (verde) na *eeAChE* (PDB ID: 1c2b) em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja). Os resíduos de aminoácidos destacados nas cores cinza e amarela constituem, respectivamente, os principais sítios hidrofóbicos presentes no CAS e PAS da colinesterase estudada. Adicionalmente, alguns resíduos que constituem o canal foram representados em um gráfico de superfície indicando parcialmente as restrições estéricas do canal; na cor ciano destaca-se o resíduo de His⁴⁴⁷ como representante da tríade catalítica do sítio.

Como importante artifício para a otimização estrutural racional dos novos derivados frente ao perfil biológico de inibição das colinesterases, os modos de ligações com os sítios da BChE de soro equino (modelo disponível no UniProt / Swiss-model) foram explorados usando o método do ancoramento molecular. Conforme ilustrado nas Figuras 37 e 38, e na Tabela 16, os compostos estudados, assim como os padrões positivos utilizados, acomodaram-se facilmente ao CAS da BChE, região na qual o fragmento acridínico foi direcionado. Adicionalmente, a cadeia lateral do arcabouço foi orientada ao sítio aniônico periférico (PAS) da BChE através de interações hidrofóbicas com o resíduo Tyr³⁶⁰. A subunidade acridínica indicou ainda a formação de interações hidrofóbicas adicionais, incluindo empilhamentos π - π com o Trp⁴⁵⁸ e His⁴⁶⁶, que em associação com o resíduo chave Trp¹¹⁰ do CAS, contribuíram para a estabilização do complexo com a enzima nos derivados estudados (CHENG et al., 2019;

JIANG et al., 2019). Estes resultados vão ao encontro das avaliações de cinética para esses compostos que indicaram uma inibição mista para a série. No geral, o perfil do ancoramento nos derivados estudados se manteve constante, com leves alterações no fragmento do benzilideno para os derivados com substituintes estericamente volumosos em **R** (CL-DiTerc e CL-InM).

Tabela 16. Pontuação de encaixe e resíduos envolvidos no ancoramento molecular com BChE de soro equino obtida no banco de dados do UniProtKB/Swiss-Prot pela modelagem por homologia.

Compostos	CI ₅₀ AChE (μM)	Score	Interações eletrostáticas	Interações hidrofóbicas	
				π-alquil	Empilhamento π-π
CL-01	0,71	72,56	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Leu ³¹³ Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
CL-06	1,54	73,00	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Leu ³¹³ Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
CL-F	1,35	73,09	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Leu ³¹³ Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
CL-DiTerc	1,15	82,12	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Leu ³¹³ Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
CL-InM	2,01	76,07	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
TA-H	5,38	72,42	Asp ⁹⁸ Trp ¹¹⁰	Trp ¹¹⁰ Leu ³¹³ Ala ³⁵⁶	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰ Trp ⁴⁵⁸ His ⁴⁶⁶
Donepezila	2,39	81,76	Trp ¹¹⁰	Ala ³⁵⁶ Phe ³⁵⁷	Trp ¹¹⁰ Tyr ³⁶⁰
Tacrina	0,011	53,62	-	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Trp ⁴⁵⁸	Trp ¹¹⁰ His ⁴⁶⁶

* Os cálculos teóricos foram conduzidos pelo programa Gold, sendo o encaixe baseado no sítio de ligação da tacrina a região do CAS.

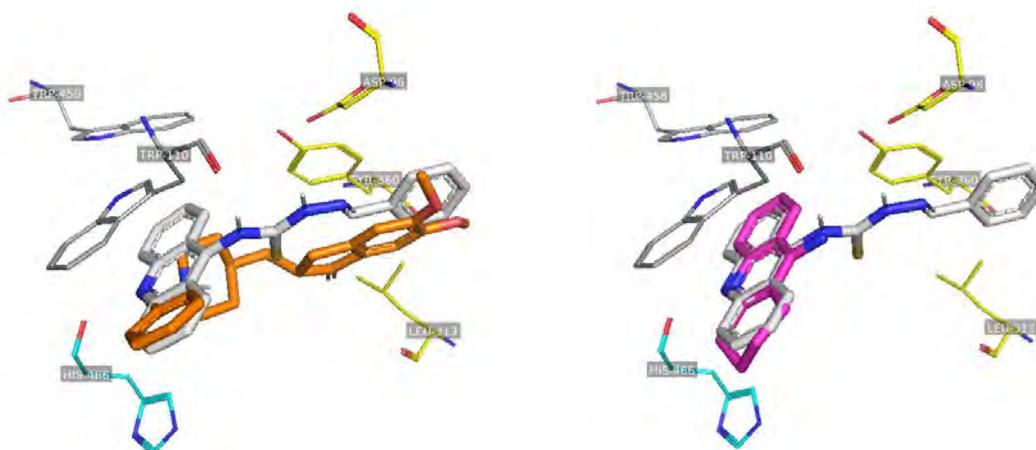


Figura 37. Ancoramento molecular do CL-01 na *eq*BChE em comparação ao encaixe encontrado para donepezila (laranja) e a tacrina (magenta). Os resíduos de aminoácidos destacados nas cores cinza e amarela constituem, respectivamente, os principais sítios hidrofóbicos presentes no CAS e PAS da colinesterase estudada; na cor ciano destaca-se o resíduo de His⁴⁶⁶ como representante da tríade catalítica do sítio.

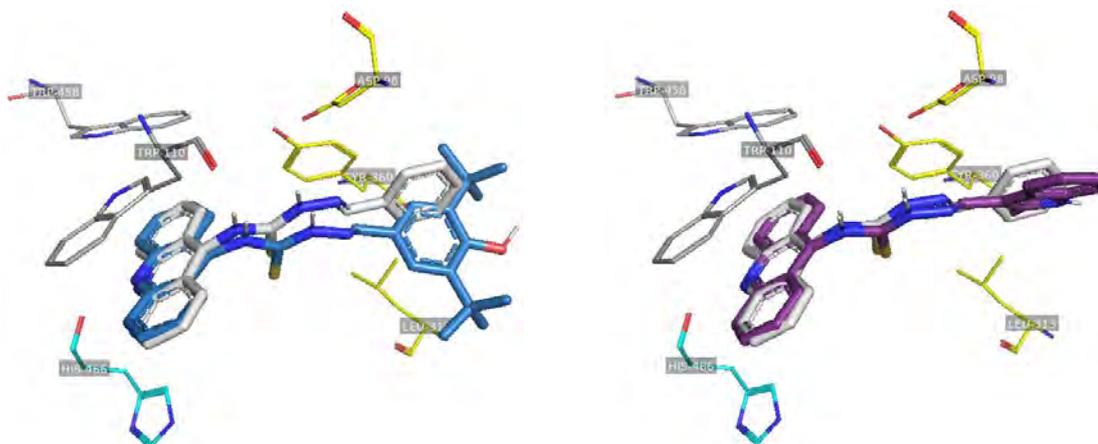


Figura 38. Ancoramento molecular do CL-01 na *eqBChE* em comparação ao encaixe encontrado para CL-DiTerc (azul) e a CL-InM (lilás). Os resíduos de aminoácidos destacados nas cores cinza e amarela constituem, respectivamente, os principais sítios hidrofóbicos presentes no CAS e PAS da colinesterase estudada; na cor ciano destaca-se o resíduo de His⁴⁴⁶ como representante da tríade catalítica do sítio.

Como já discutido, os sítios de ligação das colinesterases estudadas indicam destacadas diferenças estéricas e eletrônicas, sendo a maior parte delas na região periférica e do canal. Essas diferenças propiciaram ao arcabouço da série CL mais afinidade e ajuste farmacodinâmico à cavidade da BChE, perceptível pela reprodutibilidade nos resultados de atividade *in vitro*, assim como nos ensaios teóricos. Com base no modelo proposto para o ancoramento dos derivados acridínicos nesta enzima, **R** representa região favorável à prospecção sintética, onde substituições são preferenciais na posição *para*, explicado pela proximidade a alguns resíduos do PAS (Tyr³⁶⁰, Asp⁹⁸ e Leu³¹³).

2.6 Avaliação da atividade antioxidante

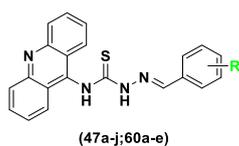
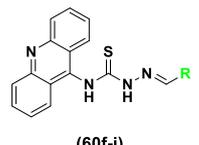
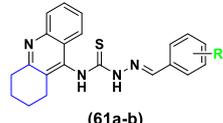
Inúmeros eventos provenientes de disfunções oxidativas foram identificados em pacientes com DA. Caracterizado por um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema de defesa antioxidante endógeno, o estresse oxidativo, apresenta importante papel no processo de senescência, neurodegeneração e declínio cognitivo (FENG; WANG, 2012; SINYOR; MINEO; OCHNER, 2020). Levando em consideração a patogênese e os mecanismos relacionados ao dano oxidativo subjacentes à DA, assim como, a relevância de compostos exógenos antioxidantes em pesquisas frente a doença (PRITAM et al., 2022; SINYOR; MINEO; OCHNER, 2020), a avaliação do perfil antioxidante para os derivados estudados neste capítulo foi realizada através do método de DPPH apresentados nas Tabelas 17 e 18 (CASTRO; SALGUEIRO, 2016). Este, baseia-se em uma reação de oxirredução através da captura do radical DPPH por compostos antioxidantes, e subsequente formação da difenil-

picril-hidrazina. As alterações colorimétricas e espectroscópicas possibilitam a avaliação quanto ao perfil antioxidante.

Derivados tiossemicarbazônicos são frequentemente descritos na literatura como potenciais antioxidantes. A possibilidade de conjugação na tioamida, associado a rica densidade eletrônica e múltiplos sítios, tornam-no um potencial fragmento para neutralização de radicais livres (SAZELI et al., 2021). A Tabela 17 descreve os percentuais antioxidantes dos derivados estudados em uma concentração fixada de 100 μM . A quercetina, um derivado flavonoide polifenólico, foi utilizado como controle positivo (concentração fixada de 10 μM) dado seus destacados relatos bioativos (BRIGHENTE et al., 2007).

Os resultados indicaram uma maior atividade antioxidante aos derivados CL-DiTerc (69,05%) e CL-InM (60,99%). O perfil eletrônico e posição dos substituintes no anel aromático apontaram destacada influência nos resultados bioativos dos derivados. No geral, substituintes na posição *para* apresentaram resultados mais promissores quando comparados a compostos substituídos nas posições *orto* e *meta*, e ainda, grupos doadores de elétrons (OH, CH₃, OCH₃ e N(CH₃)₂) presentes na porção subunidade **R** também se destacaram no perfil biológico avaliado (HAWASH et al., 2022; LEE et al., 2023; MERMER; ALYAR, 2022). O CL-F indicou o resultado mais promissor, considerando o grupo de moléculas com substituintes de características eletronegativas (EWG), justificado principalmente possivelmente pelo efeito mesomérico desse átomo em um sistema aromático, que proporciona um aumento de densidade eletrônica no benzeno, sendo esse perfil mais efetivo que em outros halogenados (TOK et al., 2022).

Tabela 17. Atividade antioxidante para os novos derivados pela metodologia DPPH.

	R	Composto^a	Atividade antioxidante (%) ± Dp
 <p>(47a-j;60a-e)</p>	H	CL-01	37,92 ± 0,0198
	4-F	CL-F	44,28 ± 0,0040
	4-Cl	CL-02	33,37 ± 0,0109
	4-Br	CL-10	25,41 ± 0,0176
	4-OCH₃	CL-03	39,22 ± 0,0112
	4-CH₃	CL-06	33,89 ± 0,0084
	4-N(CH₃)₂	CL-09	41,95 ± 0,0290
	4-NO₂	CL-05	29,11 ± 0,0029
	4-OH	CL-07	44,71 ± 0,0133
	3-OH	CL-08	11,60 ± 0,0095
	2-OH	CL-2OH	15,81 ± 0,0185
	2,4-Cl	CL-04	1,03 ± 0,0310
	3-OH, 4-OCH₃	CL-3OH,4OCH ₃	41,25 ± 0,0116
	3,5-DiTerç, 4-OH	CL-DiTerç	69,05 ± 0,0021
	2-OH, 4-CH₃	CL-2OH,4CH ₃	28,73 ± 0,0121
 <p>(60f-j)</p>	3-Piridina	CL-3PIRI	15,53 ± 0,0184
	2-Furfural	CL-Fur	43,90 ± 0,0072
	2-Tiofeno	CL-Tio	41,53 ± 0,0159
	3-Indol	CL-Indol	23,77 ± 0,0089
	2-Metil-3-indol	CL-InM	60,99 ± 0,0081
 <p>(61a-b)</p>	H	TA-H	32,21 ± 0,0042
	3-OH	TA-3OH	12,06 ± 0,0146
Quercetina^b			51,67 ± 0,080

^a Os novos derivados foram avaliados em uma concentração fixada de 100 µM. ^b A quercetina foi utilizada como controle positivo na concentração de 10 µM.

A presença de heteroarômáticos em **R** apontou perfis distintos na atividade antioxidante, com o CL-Tio, CL-Fur e o CL-InM demonstrando perfis moderados dentro da série, e a CL-3PIRI e CL-Indol com baixos perfis antioxidantes. Estudos teóricos já discutiram sobre semelhanças eletrônicas e de orientação entre grupos tiofeno (CL-Tio) e furano (CL-Fur), quando comparados ao benzeno (CL-01). O deslocamento de densidade eletrônica gerado nos compostos nitrogenados em **R** (CL-In e CL-3PIRI) desfavoreceu a atividade estudada (HUBER et al., 2014). Com um perfil estereo-eletrônico distinto de seu precursor, o derivado indólico CL-InM indicou propriedades antioxidantes destacadas dentro da série estudada,

possivelmente, o grupamento metila favorece a estabilização do radical formado na subunidade indólica durante o processo antioxidante. Adicionalmente, quando comparados os derivados com núcleos da acridina (CL-01) e tetraidroacridina (TA-H) não foram identificadas diferenças significativas no perfil antioxidante, indicando que esta região dos derivados não deve possuir influência sobre as ações antioxidantes da série.

Os polifenóis estão entre as principais classes antioxidantes conhecidas (LEE et al., 2023; PARCHETA et al., 2021). Esse perfil, frequentemente é associado a capacidade de inativação de espécies reativas pela hidroxila, seguida da estabilização por ressonância do radical livre formado. Como dito anteriormente, fragmentos antioxidantes conhecidos foram incorporados ao arcabouço acridínico (série CL) vislumbrando um perfil bioativo adicional, com expectativa de manutenção principalmente do perfil inibitório frente a BChE. O derivado CL-DiTerc apresenta em **R** um fragmento antioxidante conhecido como hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês butylated hydroxytoluene) (ALNEYADI et al., 2020; SAZELI et al., 2021). Este composto apresentou o melhor perfil antioxidante entre os derivados estudados, provavelmente pela presença do BHT no arcabouço tiossemicarbazônico-acridínico. A importância da hidroxila em *para* nesta série foi corroborada pelo resultado do derivado CL-07 (hidroxilado na posição *para*) que apresentou incremento na atividade antioxidante quando comparado aos hidroxilados nas posições *orto* e *meta*. Possivelmente esse efeito é explicado por uma maior estabilização de cargas parciais desde a região aromática até a extensão por conjugação com a tiossemicarbazona.

Ademais, a partir do interessante perfil antioxidante identificado para o CL-DiTerc e o CL-InM no *screening* em concentração única, a concentração de eficiência (CE₅₀) foi calculada sendo apresentada na Tabela abaixo. Como é perceptível, o derivado CL-DiTerc se mostrou o melhor derivado antioxidante, assim como já tinha apresentado o melhor perfil de inibição das colinesterases.

Tabela 18. Concentração de eficiência (CE₅₀) antioxidante para o CL-DiTerc e o CL-InM.

Composto	CE ₅₀ (µM)
CL-DiTerc	47,01 ± 0,66
CL-InM	64,89 ± 0,97
Quercetina	7,98 ± 0,14

2.7 Estudo da complexação dos derivados frente a Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺

A homeostase metálica possui grande influência na DA. Danos neuropatológicos causados pelo acúmulo do peptídeo β-amilóide carregado com íons metálicos de Cu²⁺, Fe³⁺ ou

Zn^{2+} são relatados como um tipo de dishomeostase. Uma das estratégias frente a DA, a capacidade de quelação objetiva atenuar interações anormais das proteínas β -amilóide a metais, sem causar uma perturbação em níveis sistêmicos (CUKIERMAN; REY, 2022; EJAZ; WANG; LANG, 2020). A espectrofotometria UV-VIS é um dos métodos usados para avaliar qualitativamente os perfis quelantes de compostos orgânicos. Alterações espectrais indicam modificações no estado fundamental da estrutura após estímulo e consequente transição para um estado excitado; as propriedades absorptivas são quantificadas através de um gráfico de radiação absorvida. Vislumbrando a avaliação dos novos derivados quanto a capacidade quelante frente a metais envolvidos com a DA (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}), estudos espectroscópicos foram realizados e são apresentados abaixo. A seleção dos derivados partiu dos perfis anticolinesterásicos encontrados, com ênfase nos mais ativos em BChE.

Os espectros de absorção UV-vis dos derivados estudados em meio aquoso (MeOH:H₂O = 5:5 v/v, tampão Tris-HCl, pH = 7.5) apresentaram curvas de absorção características a núcleos como o da acridina (Figuras 39 e S152). Uma banda primária de intensidade máxima em 252 nm, comum a todos os derivados estudados, e uma banda secundária com intensidade reduzida e deslocamentos entre 350 e 400 nm atribuída a conjugação estendida no nitrogênio da tiossemicarbazona com núcleo acridínico, de acordo com a proposta de formação do cromóforo 9-aminoacridina (MANIVANNAN et al., 2017; MITRA et al., 2018). Adicionalmente, uma terceira banda foi identificada e apresentou correlação direta a subunidade tiossemicarbazônica, com deslocamentos no espectro correlacionados ao perfil eletrônico em **R** das estruturas (306 – 349 nm). Os perfis encontrados para os derivados representam as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ possíveis no arcabouço (KUMAR; NATH, 2019; LAPASAM et al., 2020).

Posteriormente, os compostos foram avaliados na presença dos íons metálicos na razão molar 1:1, Figura 38 (FU et al., 2016; KUMAR; KUMAR; CHAE, 2022). Os derivados CL-F e CL-DiTerc apontaram alterações mais perceptíveis nos espectros de UV-Vis na presença dos íons metálicos; quando observadas, essas alterações foram reprodutíveis frente a todos os íons avaliados. A possibilidade de transferência de carga interna (intramolecular) (ICT) nos derivados propostos neste trabalho, com grupos doadores e aceitadores de elétrons dentro de um sistema π conjugado, poderia explicar os perfis encontrados. A característica de supressão na absorção do CL-DiTerc e o desvio hipsocrômico no CL-F frente aos íons metálicos sugerem redução na conjugação do analito, assim como, um perfil desestabilizante de seus estados excitados quando comparados aos estados fundamentais. Os mecanismos que envolvem as transferências de cargas são extremamente sensíveis a polaridade do solvente, tendo em vista

uma possível estabilização nos dipolos formados, essa característica poderia estar associada aos distintos perfis encontrados nessa avaliação (CHOWDHURY et al., 2018; MAHAPATRA et al., 2015; MITRA et al., 2018). Destaca-se ainda, que nem sempre a formação de um complexo leva a alterações ríspidas na geometria ou distribuição eletrônica que sejam perceptíveis pela técnica aplicada (UV-Vis), característica esta que impossibilita afirmar a não capacidade dos outros derivados na complexação frente aos íons metálicos estudados (DESWAL et al., 2022).

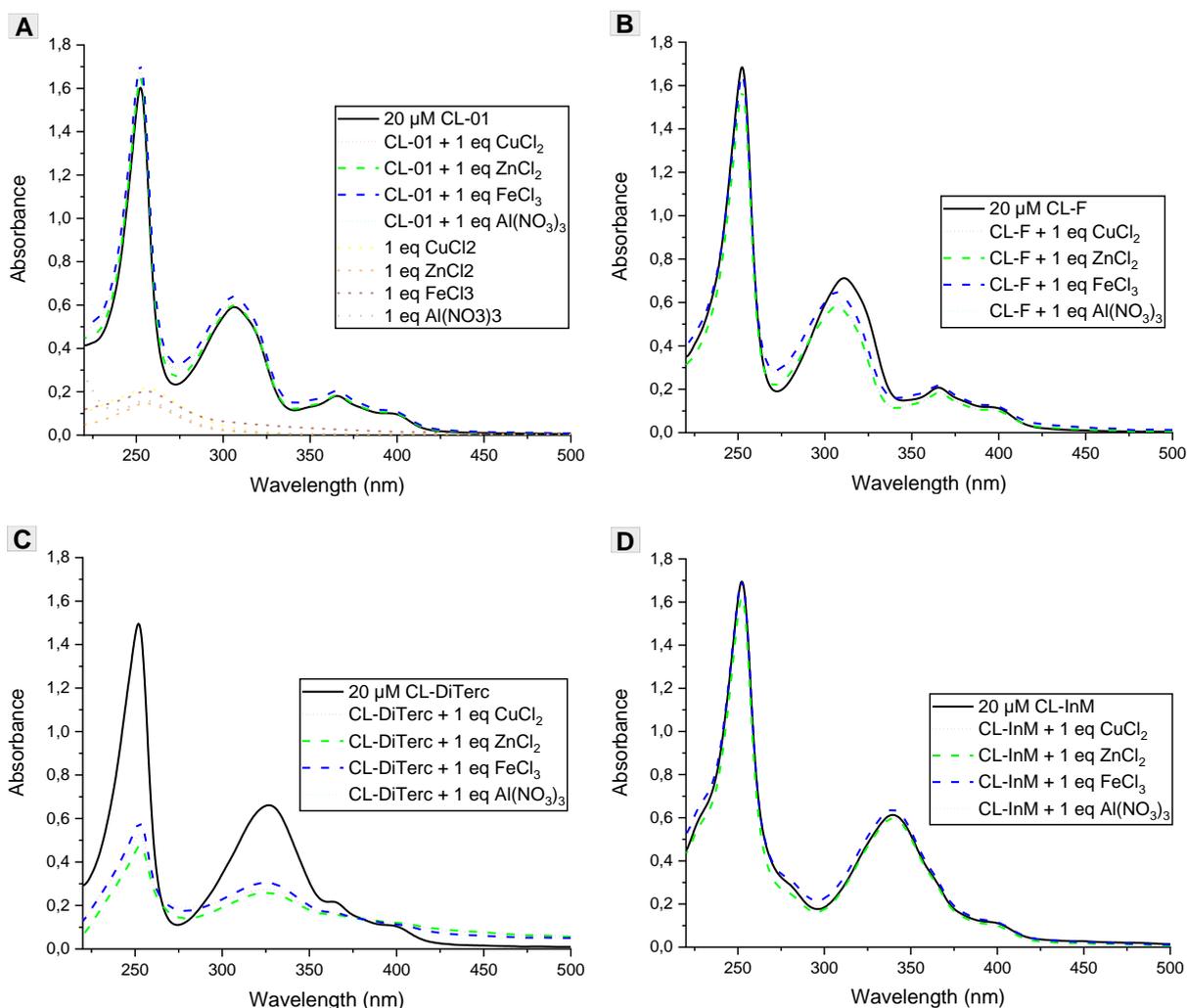


Figura 39. Espectro de absorvância dos derivados avaliados (20 μM) em MeOH/H₂O (50/50, v/v, Tris-HCl pH= 7,5) antes e após adição de Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺.

Como visto acima, as principais bandas do CL-DiTerc foram suprimidas intensamente já na razão 1:1 na presença dos íons metálicos. O aumento da concentração além dessa razão indicou poucas alterações no espectro do composto frente ao Cu²⁺, sugerindo total saturação do receptor, Figura 40A. Em outro ensaio, Figura 40B, agora com adições reduzidas de [Cu²⁺] (0,1 eq por adição), foi perceptível a crescente supressão do perfil absorvivo do composto frente ao aumento da [Cu²⁺]. A existência de pontos isobésticos em três regiões confirmam a formação de duas espécies em equilíbrio (KAMEL et al., 2019). Relatos indicam a capacidade da

tiossemicarbazona atuar como quelantes bidentados frente a diferentes íons metálicos, sendo que as interações com os metais geralmente acontecem através do átomo de enxofre e do nitrogênio imínico (KUMAR; NATH, 2019; LAPASAM et al., 2020; PETRASHEUSKAYA et al., 2021; SAGHATFOROUSH et al., 2021).

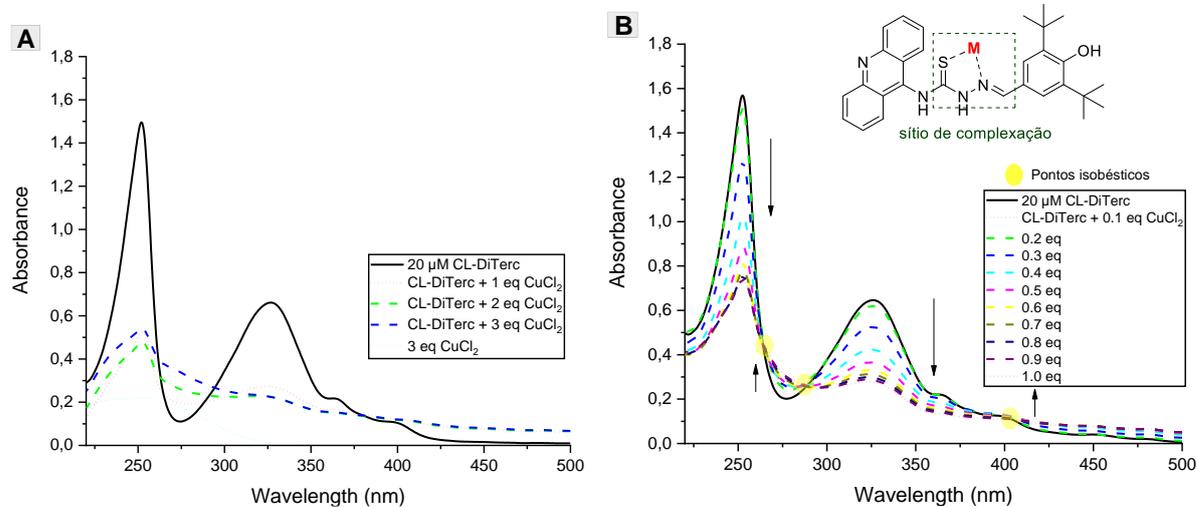


Figura 40. Espectro de absorvância do CL-DiTerc (20 μM) em MeOH/H₂O (50/50, v/v, Tris-HCl pH= 7,5) antes e após adição de concentrações crescentes de CuCl₂.

2.7 Citotoxicidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y

Parâmetros como eficiência e segurança farmacológica são indispensáveis no desenvolvimento de novos compostos bioativo. Grande parte do insucesso no processo de descoberta de novos fármacos (ensaios clínicos) estaria correlacionado a ineficiência nesses aspectos (DE CONTO et al., 2021). Um perfil preliminar de neurotoxicidade para os compostos mais ativos em BChE (CL-01, CL-03, CL-04, CL-05, CL-F e CL-DiTerc) foi estudado frente a linhagem imortalizada SH-SY5Y, Figura 41. De acordo com o protocolo descrito pela ISO 10993-5 (ISO, 2009), compostos considerados citotóxicos indicam redução na viabilidade celular em percentuais acima de 30%. Dados os resultados apresentados abaixo, os derivados avaliados indicaram baixo (CL-F) ou nenhum perfil neurotóxico frente a linhagem SH-SY5Y. O derivado CL-F, na maior concentração avaliada (50 μM), indicou um perfil de redução da viabilidade celular próximo dos 30%. Ademais, os demais derivados apresentaram viabilidade celular acima de 90% à 50 μM , perfil este comparável a padrões farmacológicos como a donepezila (80%) e a tacrina (97%) (DAS; TIZABI, 2009; PRZYBYŁOWSKA et al., 2022; QUEDA et al., 2021).

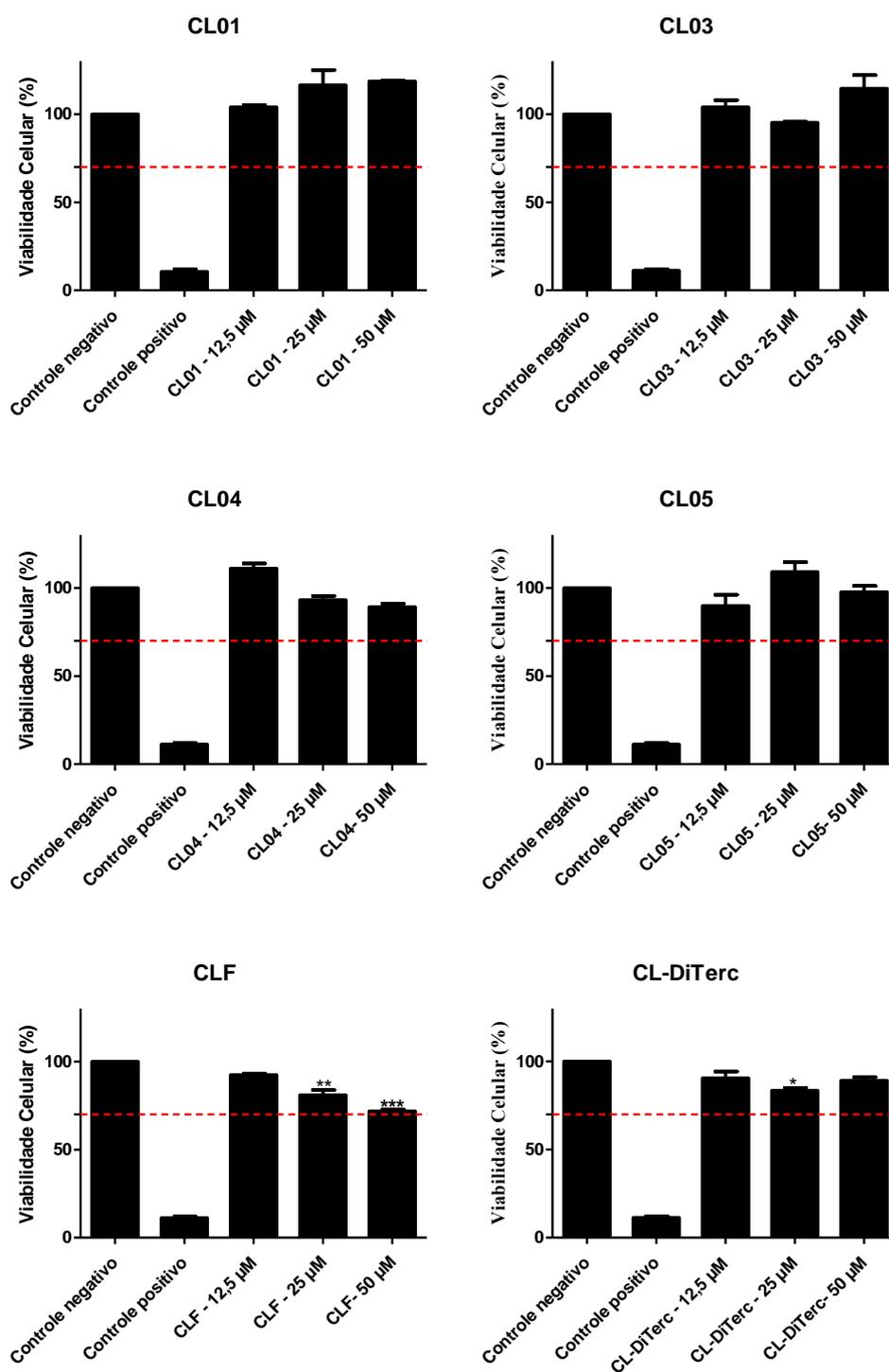


Figura 41. Viabilidade celular (%) de células SH-SY5Y: Controle negativo (Veículo), Controle positivo (DMSO puro), e Amostras CL-01, CL-03, CL-04, CL-05, CL-F e CL-DiTerc nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µM. Resultados representam a média de triplicatas (n=3). $p < 0,05$ (CL-DiTerc - 25 µM), $p < 0,001$ (CLF - 25 µM) e $p < 0,0001$ (CLF - 50 µM) na comparação entre as condições estabelecidas.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, este estudo realizou uma prospecção biológica colinesterásica dos derivados apresentados no capítulo 1, com proposta de dupla interação aos sítios CAS e PAS, na qual os derivados da série CL apresentaram destacados CI_{50} para atividade. Os compostos CL-01 e CL-05 indicaram os melhores perfis inibitórios e foram estudados cineticamente para confirmar a dupla interação aos sítios de ligação das enzimas, proposta inicialmente. Para AChE, os derivados apontaram inibições do tipo não-competitiva, em contrapartida, na BChE, identificaram-se inibições do tipo mista, com atuações no CAS e PAS da enzima. Esses achados experimentais fundamentaram o planejamento de novos derivados acridínicos, com intuito de explorar fragmentos químicos que pudessem apresentar uma melhor complementariedade no encaixe as cavidades enzimáticas, acometendo ao arcabouço uma maior potência na inibição colinesterásica.

Doze novos derivados foram sintetizados com maiores alterações no benzilideno, além de uma troca da acridina pela tetraidroacridina. Os resultados inibitórios indicaram maior sensibilidade as alterações propostas, com manutenção do perfil mais ativo em BChE. Características como a manutenção do benzilideno, substituições em **R** preferencialmente na posição *para* e o perfil aromático no anel tricíclico foram intrínsecos ao perfil de seletividade pela BChE. A troca da acridina pela tetraidroacridina (TA-H) indicou redução do perfil biológico, além de distintos modos de atuação do TA-H (inibição mista em AChE e BChE) ao seu correlato acridínico CL-01 (inibição não-competitiva em AChE e mista em BChE). Os estudos teóricos realizados reproduziram o perfil identificado na cinética, sugerindo que na AChE as interações dos derivados CLs estão concentradas na região do PAS e no canal, não sendo identificadas interações diretas com os resíduos do CAS, modo distinto ao encontrado para o derivado TA-H. Ademais, seis derivados avaliados, estes com perfis destacados frente a BChE, não apresentaram perfil citotóxico frente as células de neuroblastoma SH-SY5Y, na concentração máxima avaliada (50 μ M). Estudos adicionais indicaram o CL-DiTerc como um promissor anti-DA, dado o perfil antioxidante, não citotóxico e a capacidade de complexar íons metálicos (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+}).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 *Screening* de inibição enzimática as AChE e BChE

A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (5 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionadas soluções de tratamento com o composto inibidor em concentração final de 10 μ M. O controle veículo (DMSO - concentração final 0,2% v/v para AChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Foram adicionados ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) à acetilcolinesterase de enguia elétrica (EeAChE) ou à butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) na presença de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, iodeto de acetiltocolina (ACTI) ou iodeto de butiriltocolina (BCTI) foi adicionado e a absorbância foi registrada à temperatura ambiente a $\lambda = 415$ nm por 10 vezes com intervalos de 30 segundos a cada leitura. A atividade enzimática foi calculada como percentagem da média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada da média dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Os valores de inibição foram calculados com auxílio do programa Excel.

4.2 Concentração inibitória média dos derivados acridínicos as colinesterases

A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em MeOH (5 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionadas soluções de tratamento com o composto inibidor nas concentrações finais variando entre 200 μ M e 0,19531 μ M. O controle veículo (MeOH) foi utilizado como referência (controle negativo). Foram adicionados ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) à acetilcolinesterase de enguia elétrica (EeAChE) ou à butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) na presença de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, iodeto de acetiltocolina (ACTI) ou iodeto de butiriltocolina (BCTI) foi adicionado e a absorbância foi registrada à temperatura

ambiente a $\lambda = 415$ nm por 10 vezes com intervalos de 30 segundos a cada leitura. A atividade enzimática foi calculada como percentagem da média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com MeOH, descontada da média dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Os valores de IC50 foram calculados no programa Graphpad Prism 7.0 usando o modelo de regressão não-linear para inibição dose-resposta.

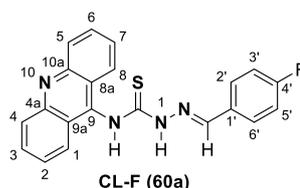
4.3 Avaliação da cinética enzimática

Para se realizar o estudo cinético foi utilizado o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). O tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5) foi usado para realizar o preparo de todas as soluções utilizadas nos ensaios e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em MeOH (5 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foi adicionada a solução com o composto inibidor em duas concentrações diferentes, em oito conjuntos de triplicatas cada. Como controle negativo foram utilizados oito conjuntos de triplicatas tratados com MeOH. Em seguida, foram adicionados o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) e acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) na presença de albumina sérica bovina (BSA). Um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm foi utilizado para registrar a absorbância e esta medida foi então usada como uma referência em branco. Após 10 minutos de incubação a 25°C, uma solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiriltiocolina (BCTI) em oito concentrações diluídas em série (fator = 1,3) de 2,75 - 0,44 mM (concentração final: 0,25 - 0,04 mM) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25°C a $\lambda = 415$ nm. Os respectivos gráficos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de $1 / \text{velocidade}$ versus $1 / [\text{substrato}]$ para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

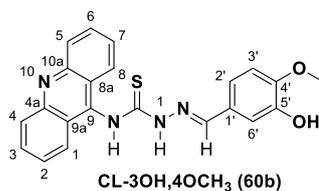
4.4 Obtenção de derivados de tiossemicarbazônicos-acridínicos (CLs)

A síntese dos novos derivados foi realizada através de uma reação do tipo SN_{Ar} em proporções equimolares, utilizando os núcleos de tiossemicarbazonas e acridinas obtidos

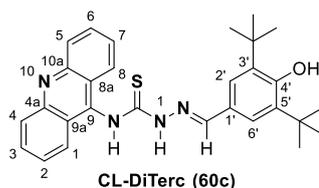
anteriormente. Uma solução de núcleo de acridinas (1,0 mmol) e intermediários tiossemicarbazônicos (1,0 mmol) em acetonitrila foi reagida à temperatura ambiente 1 - 5 h. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD), a mistura de reação foi filtrada e obtido um sólido amorfo (CLs), que foi cristalizado em um sistema hexano/diclorometano (DA SILVA FILHO et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2019; SOUSA et al., 2022) Para elucidar as estruturas químicas dos compostos sintetizados, foram realizadas análises de RMN unidimensional ^1H e ^{13}C (MS, Figuras S126-S151).



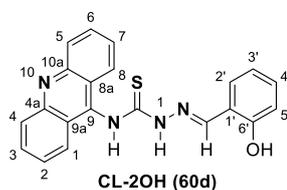
(E)-N-(acridin-9-il)-2-(4-fluorobenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (CL-F). Sólido amorfo laranja; rendimento: 54%. PF: 170 °C. Rf 0.44 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):** δ ppm 9.38 (s, 1H, NH), 9.32 (s, 1H, NH), 8.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-4, H-5), 8.18 (dt, $J = 8.5, 4.0$ Hz, 2H, H-3, H-6), 7.89 – 7.86 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.85 (d, $J = 3.8$ Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.16 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.00 (s, 1H, N=CH). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):** δ ppm 180.73 (Cq), 164.88 (Cq), 162.90 (Cq), 144.62 (Cq), 143.43 (CH), 135.44 (CH), 130.97 (CH), 130.90 (CH), 130.46 (Cq), 130.44 (CH), 129.41 (CH), 125.03 (Cq), 124.58 (CH), 124.45 (CH), 116.12 (CH), 115.95 (CH).



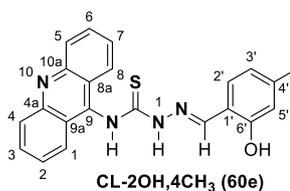
(E)-N-(acridin-9-il)-2-(3-hidroxi-4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (CL-3OH,4OCH₃). Sólido amorfo laranja; rendimento: 51%. PF: 167-169 °C. Rf 0.40 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):** δ ppm 9.25 (s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, NH), 8.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-4, H-5), 8.13 (dt, $J = 8.5, 4.0$ Hz, 2H, H-3, H-6), 7.82 (d, $J = 3.9$ Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.36 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.98 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, H-6'), 6.83 – 6.78 (m, 2H, N=CH, H-3'), 3.75 (s, 3H, OCH₃). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):** δ ppm 180.54 (Cq), 150.62 (Cq), 146.95 (Cq), 144.71 (CH), 134.75 (CH), 129.11, 126.61 (Cq), 125.41 (CH), 125.01 (Cq), 124.56 (CH), 121.85 (CH), 114.29 (CH), 111.79 (CH), 56.10 (OCH₃).



(*E*)-*N*-(acridin-9-il)-2-(3,5-di-*tert*-butilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-DiTerc**). Sólido amorfo laranja-avermelhado; rendimento: 61%. PF: 162-163 °C. Rf 0.55 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.22 (s, 1H, NH), 8.93 (s, 1H, NH), 8.48 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8.11 (ddd, J = 8.5, 5.5, 2.5 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.84 – 7.78 (m, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.42 (d, J = 13.2 Hz, 1H, H-4'), 7.38 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.91 (s, 1H, N=CH), 1.31 (s, 18H, Di-*tert*-butil). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.54 (Cq), 157.14 (Cq), 145.86 (CH), 139.46 (Cq), 134.36 (CH), 128.97 (CH), 125.96 (CH), 125.37 (CH), 125.06 (Cq), 125.02 (Cq), 124.54 (CH), 34.96 (Cq), 30.61 (CH).

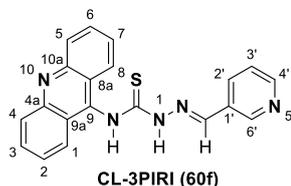


(*E*)-*N*-(acridin-9-il)-2-(2-hidroxibenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-2OH**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 65%. PF: 170-171 °C. Rf 0.45 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.55 (s, 1H, OH), 9.15 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 8.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-4, H-5, H-2'), 7.96 – 7.87 (m, 2H, H-3, H-6), 7.68 (d, J = 3.8 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.21 – 7.14 (m, 1H, H-4'), 6.89 (s, 1H, N=CH), 6.83 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-3'), 6.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.95 (Cq), 156.91 (Cq), 149.80 (Cq), 141.38 (Cq), 138.86 (CH), 132.38 (CH), 131.50 (CH), 130.18 (CH), 128.30 (CH), 127.21 (CH), 124.11 (Cq), 123.79 (CH), 119.86 (Cq), 119.79 (CH), 116.39 (CH).

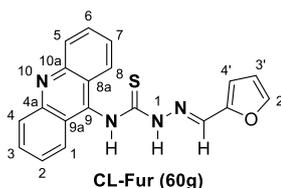


(*E*)-*N*-(acridin-9-il)-2-(2-hidroxi-4-metilbenzilideno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-2OH,4CH₃**). Sólido amorfo vermelho; rendimento: 59%. PF: 155-156 °C. Rf 0.45 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.49 – 9.45 (m, 1H, OH), 9.16 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 8.35 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-2'), 7.98 (dt, J = 8.5, 4.0 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.72 (d, J = 3.9 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7,

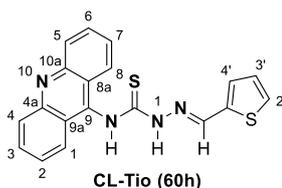
H-8), 6.89 (s, 1H, N=CH), 6.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-3'), 6.49 (s, 1H, H-5'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180.75 (Cq), 156.96 (Cq), 148.54 (Cq), 142.64 (Cq), 139.45 (CH), 132.46 (CH), 128.87 (CH), 128.56 (CH), 127.18 (CH), 124.34 (Cq), 124.04 (CH), 120.88 (CH), 117.21 (Cq), 116.73 (CH), 21.63 (CH).



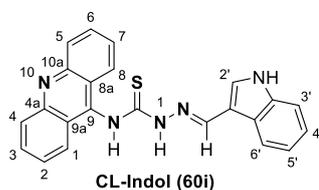
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-3PIRI**). Sólido amorfo esverdeado; rendimento: 45%. PF: 185-186 °C. Rf 0.50 (acetato de etila). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm δ 9.24 (s, 2H, NH), 8.84 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-6'), 8.51 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H-4'), 8.35 (dt, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H-2'), 8.30 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 7.90 (dt, J = 8.4, 4.0 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.66 (d, J = 4.0 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.35 (dd, J = 8.1, 4.8 Hz, 1H, H-3'), 6.86 (s, 1H, N=CH). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 181.29 (Cq), 151.20 (CH), 150.03 (Cq), 149.96 (CH), 140.72 (Cq), 140.45 (CH), 135.09 (CH), 131.20 (CH), 130.37 (CH), 130.00 (Cq), 128.18 (CH), 124.16 (Cq), 124.03 (CH), 123.65 (CH).



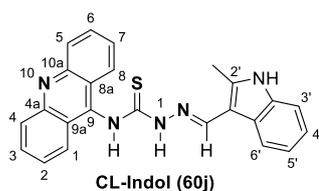
(E)-*N*-(acridin-9-il)-2-(furan-2-ilmetileno)hidrazina-1-carbotioamida (**CL-Fur**). Sólido amorfo laranja; rendimento: 45%. PF: 184-185 °C. Rf 0.54 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9.41 (s, 1H, NH), 8.91 (s, 1H, NH), 8.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8.17 (ddd, J = 8.4, 5.0, 2.9 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.86 – 7.84 (m, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.81 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-2'), 6.91 (s, 1H, N=CH), 6.90 (d, J = 3.4 Hz, 1H, H-4'), 6.56 (dd, J = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-3'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180.54 (Cq), 149.14 (Cq), 146.16 (CH), 135.19 (CH), 134.54 (CH), 129.40 (CH), 124.93 (Cq), 124.46 (CH), 115.58 (CH), 112.91 (CH).



(*E*)-*N*-(acridin-9-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)hidrazina-1-carbotioamida (CL-Tio). Sólido amorfo laranja-avermelhado; rendimento: 53%. PF: 188 °C. Rf 0.44 (*n*-hexano/acetato de etila, 6:4). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 9.28 (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, NH), 8.40 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8.06 (ddd, J = 8.6, 4.6, 3.2 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.78 (d, J = 3.9 Hz, 4H, H-1, H-2, H-7, H-8), 7.67 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H-2'), 7.21 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-4'), 7.13 (s, 1H, N=CH), 6.99 (dd, J = 5.0, 3.7 Hz, 1H, H-3'). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 180.49 (Cq), 146.99 (Cq), 139.43 (CH), 138.11 (Cq), 133.70 (CH), 132.84 (CH), 130.50 (CH), 128.96 (CH), 128.43 (CH), 127.08 (CH), 124.60 (Cq), 124.15 (CH).

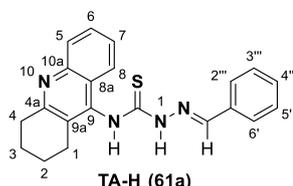


(*E*)-2-((1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(acridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (CL-Indol). Sólido amorfo vermelho; rendimento: 65%. PF: 164-165 °C. Rf 0.58 (*n*-hexano/acetato de etila, 3:7). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 11.64 (d, J = 2.9 Hz, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, NH), 8.50 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-5), 8.32 – 8.27 (m, 1H, H-6'), 8.11 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-3, H-6), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-1, H-8), 7.81 (dd, J = 8.7, 6.6 Hz, 2H, H-2, H-7), 7.50 (d, J = 2.9 Hz, 1H, H-2'), 7.40 (dd, J = 6.3, 2.9 Hz, 1H, H-3'), 7.22 (dt, J = 7.5, 3.8 Hz, 2H, H-4', H-5'), 7.18 (s, 1H, H-20). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 179.97 (Cq), 142.82 (CH), 137.37 (Cq), 134.34 (CH), 133.50 (CH), 128.95 (CH), 125.24 (Cq), 124.73 (CH), 124.04 (Cq), 123.34 (CH), 122.52 (CH), 121.48 (CH), 112.42 (CH), 110.91 (Cq).



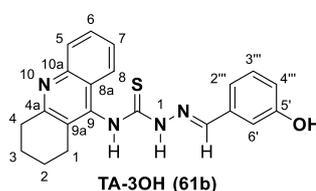
(*E*)-*N*-(acridin-9-il)-2-((2-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)hidrazina-1-carbotioamida (CL-IndM). Sólido amorfo laranja; rendimento: 62%. PF: 185-186 °C. Rf 0.58 (*n*-hexano/acetato de etila, 3:7). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 11.52 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 8.31 (d, J = 9.6 Hz, 3H, NH, H-4, H-5), 8.11 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-6'), 7.91 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H-3,

H-6), 7.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-1, H-8), 7.68 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2, H-7), 7.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-3'), 7.16 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-4', H-5'), 6.94 (s, 1H, N=CH), 1.83 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 180.16 (Cq), 149.81 (Cq), 142.29 (Cq), 141.64 (Cq), 140.52 (CH), 136.01 (Cq), 131.37 (CH), 130.16 (CH), 128.12 (CH), 125.16 (Cq), 124.56 (Cq), 124.07 (CH), 122.62 (CH), 121.37 (CH), 121.26 (CH), 111.49 (CH), 106.60 (Cq), 11.67 (CH₃).



(E)-2-benzilideno-*N*-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida (**TA-H**).

Sólido amorfo amarelo; rendimento: 52%. PF: 217-218 °C. R_f 0.53 (*n*-hexano/acetato de etila, 5:5). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9.21 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, NH), 8.43 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-5), 8.02 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-6), 7.88 – 7.82 (m, 2H, H-2''', H-6'), 7.79 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-7), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-8), 7.42 – 7.38 (m, 1H, H-4'''), 7.36 (dd, $J = 8.2, 6.2$ Hz, 2H, H-3''', H-5'), 7.12 (s, 1H, N=CH), 3.45 – 3.38 (m, 2H, H-4', H-4''), 2.81 (dt, $J = 17.5, 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 2.45 (dt, $J = 17.5, 6.5$ Hz, 1H, H-1''), 1.95 (qq, $J = 8.1, 4.5$ Hz, 2H, H-3', H-3''), 1.84 (dt, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 2H, H-2', H-2''). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 179.24 (Cq), 160.15 (Cq), 143.52 (CH), 133.96 (Cq), 133.01 (Cq), 131.06 (CH), 129.84 (CH), 128.97 (CH), 128.62 (CH), 125.09 (Cq), 123.84 (CH), 30.02 (CH₂), 24.69 (CH₂), 21.06 (CH₂), 20.87 (CH₂).



(E)-2-(3-hidroxibenzilideno)-*N*-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)hidrazina-1-carbotioamida

(**TA-3OH**). Sólido amorfo amarelo; rendimento: 48%. PF: 204-205 °C. R_f 0.60 (*n*-hexano/acetato de etila, 4:6). **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 9.47 (s, 1H, OH), 8.93 (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, NH), 8.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-5), 7.69 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-8), 7.23 – 7.17 (m, 2H, H-2''', H-6'), 7.12 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3'''), 6.78 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H, N=CH, H-4'''), 3.10 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-4', H-4''), 2.76 (dt, $J = 17.1, 6.6$ Hz, 1H, H-1'), 2.36 (dt, $J = 17.5, 6.3$ Hz, 1H, H-1''), 1.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-2'), 1.86 (dd, $J = 12.6, 6.1$ Hz, 1H, H-2''), 1.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-3', H-3''). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 179.90 (Cq), 160.72 (Cq), 157.94 (Cq), 147.70

(Cq), 142.17 (CH), 140.25 (Cq), 135.28 (Cq), 130.69 (Cq), 129.95 (CH), 129.48 (CH), 129.12 (CH), 127.17 (CH), 123.99 (Cq), 122.77 (CH), 119.69 (CH), 117.91 (CH), 114.88 (CH), 33.81 (CH₂), 25.08 (CH₂), 22.74 (CH₂), 21.94 (CH₂).

4.5 Ancoramento molecular

As estruturas estudadas foram primeiramente tratadas com base na teoria semiempírica no nível PM6 usando o software Spartan 14. Depois de otimizados, foram submetidos ao estudo de ancoramento molecular através do programa Gold 5.8.1. A ancoragem molecular foi realizada com a acetilcolinesterase de enguia elétrica (PDB ID: 1c2b); para BChE, um modelo cristalográfico de butirilcolinesterase de soro equino foi obtido no banco de dados do UniProt / Swiss-model pela modelagem por homologia. Os cálculos teóricos foram conduzidos pelo programa Gold, sendo o encaixe baseado nos resíduos de Trp⁸⁶ e Trp²⁸⁶, descritos como essenciais para os empilhamentos de elétrons no CAS e PAS. O ancoramento molecular foi realizado considerando os receptores, como moléculas rígidas, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Os resultados de encaixe foram analisados e as interações intermoleculares utilizadas como parâmetros para medir a energia de afinidade com o alvo (*score*). O confôrmero com maior pontuação e mais reprodutível foi investigado pelo programa Pymol 2.3.2, distância e tipo de interação com a macromolécula foram tratados para análise do ancoramento molecular (JIANG et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

4.6 Atividade antioxidante

Os derivados CLs estudados neste capítulo foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante usando o ensaio com DPPH (SALGUEIRO & CASTRO, 2016). Todas as soluções estoques dos compostos utilizadas nos ensaios foram preparadas em metanol (8 mM). Em seguida, uma solução estoque de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH, 10 mM em metanol) foi preparada. Inicialmente para o *screening* em concentração fixada (100 µM), em uma placa de 96 poços de fundo plano, foram adicionadas uma alíquota equivalente a 100 µM de DPPH e o volume final de cada poço (200 µL) foi ajustado com metanol (controle negativo). Posteriormente, foram adicionadas as soluções dos derivados a serem avaliados (100 µM), 100 µM de DPPH e o volume final de cada poço foi ajustado com metanol (200 µL), sendo esse procedimento realizado em triplicatas. As placas foram incubadas sob abrigo de luz durante 30 minutos, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA (iMark, Bio-Rad), com UV fixo em 520 nm. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem referente à

média dos valores de absorvância medidos para o controle tratado com metanol, descontada dos valores de referência em branco, de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = 100 - \frac{AbsA - AbsB}{AbsB} \times 100$$

*Onde: AbsA representa a absorvância da amostra com a solução do radical DPPH, AbsB representa o branco do ensaio, sendo este a absorvância do DPPH em solução metanólica.

4.7 Estudo da complexação dos derivados frente a Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺

Os compostos derivados acridínicos (CL-01, CL-03, CL-04, CL-05, CL-06, CL-F, CL-DiTerc e CL-InM) foram avaliados quanto a sua capacidade de complexação com Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺ (FU et al., 2016; KAMEL et al., 2019). Soluções estoque dos metais (Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺) (1 mM) foram preparadas em água (tampão Tris/HCl, pH = 7,5) enquanto as soluções estoque dos compostos estudados (1mM) foram preparadas em metanol UV-HPLC. Aliquotas da solução estoque dos compostos estudados foram diluídas a 20 µM em 3ml de mistura metanol/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH = 7,5). Os espectros de UV-vis foram obtidos em espectrofotômetro JASCO J-818 utilizando cubetas de quartzo com as quatro faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm. Todos os espectros foram plotados utilizando o programa Origin 6.0.

4.8 Citotoxicidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y

4.8.1. Preparo das amostras para o ensaio de citotoxicidade em MTT

Para cada amostra em estudo, uma solução mãe em dimetilsulfóxido (DMSO) foi preparada e diluída utilizando meio de cultivo para concentrações nos valores de 12,5, 25 e 50 µM. A amostra representando o branco/veículo foi preparada utilizando 20 µL de DMSO puro e 1980 µL de meio de cultivo, representando 1% de DMSO.

4.8.2 Cultivo das células derivados de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)

Foram utilizadas células da linhagem imortalizada de neuroblastoma humano (SH-SY5Y – ATCC: CRL-2226; BCRJ: 0223) para avaliação de citotoxicidade. As linhagens foram cultivadas utilizando meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e F12 na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina. A cultura foi mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

O cultivo foi realizado variando entre garrafas de 25 e 75 cm² em meio DMEM:F12 10%, substituído a cada 48 horas, até que as células atingissem a semi-confluência (≥ 70%). A passagem celular foi realizada com auxílio da solução de tripsina-EDTA/0,25% (NOVA BIOTECNOLOGIA) e dividida entre volumes de 5 ou 8 mL de cultivo conforme as respectivas garrafas utilizadas.

4.8.3. Ensaio de citotoxicidade pelo método em MTT

O ensaio de citotoxicidade avaliou a viabilidade celular pelo ensaio de redução de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Os protocolos e cálculos que fundamentaram o ensaio são os mesmos descritos no capítulo anterior.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS GERAIS

Este trabalho se propôs a explorar biologicamente novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos. Planejados a partir de duas propostas farmacodinâmicas, se objetivou a potencializar interações com as enzimas-alvo topo II α , quando o objetivo estava direcionado a compostos antiproliferativos, e as colinesterásicas, quando a proposta era a DA, pela hibridação do núcleo acridínico a subunidades aromáticas derivadas da tiossemicarbazona. Ambas as propostas tomaram como base modelos farmacofóricos de inibidores conhecidos.

Os capítulos 1 e 2 apresentaram trinta e oito derivados tiossemicarbazônico-acridínicos avaliados quanto ao perfil citotóxico frente a seis linhagens celulares tumorais. De modo geral, os derivados indicaram baixo perfil citotóxico, com destaque para a linhagem celular resistente Lucena-1. Oito dos dez compostos avaliados frente a enzima topo II α apresentaram perfis qualitativos interessantes a inibição, quando comparado a amsacrina. Estudos teóricos apontaram que restrições estereo-eletrônicas da cavidade enzimática direcionada a subunidade do benzilideno, assim como, alterações no perfil eletrônico do núcleo acridínico poderiam justificar o perfil não inibitório apresentado para os dois derivados. Avaliações de toxicidade aguda não clínica realizadas para cinco derivados não indicaram sinais graves de toxicidade e/ou morte dos camundongos, na dose avaliada. Quando comparados a outros derivados tiossemicarbazônicos, os novos derivados apresentaram perfil citotóxico modesto. Estudos farmacocinéticos, como o de permeabilidade celular, estão sendo realizados para propiciar um melhor entendimento sobre possíveis limitações do arcabouço proposto, dado os destacados perfis enzimáticos encontrados.

O terceiro capítulo parte de um *screening* anticolinesterásico dos derivados do primeiro capítulo. Os compostos da série não substituída na acridina (CL) apresentaram melhor perfil de atividade, subsidiando o planejamento de doze novos derivados propostos e sintetizados visando alterações na subunidade benzilidênica, assim como incorporação da tetraidroacridina e de perfis biológicos adicionais como, por exemplo, antioxidante. Os resultados inibitórios indicaram reprodutibilidade no perfil frente a BChE para os novos derivados, com destaque na atividade para o CL-DiTerc. Seis derivados foram avaliados quanto ao perfil citotóxico frente as células de neuroblastoma SH-SY5Y, não indicando citotoxicidade destacada em 50 μ M. Estudos adicionais indicaram o CL-DiTerc como um promissor anti-DA, dado o perfil antioxidante, não citotóxico e a capacidade de complexar íons metálicos (Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺). As perspectivas para este capítulo incluem a realização de ensaios *in vitro* de

neuroproteção induzida por agregação de placas β -amilóide para o CL-DiTerc, assim como, ensaios farmacocinéticos (em andamento) buscam informações sobre a capacidade do derivado em permear células da barreira epitelial intestinal (Caco-2) e endotelial cerebral (hCMEC/D3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2023 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, n. 4, p. 1598–1695, abr. 2023.

A. ARMSTRONG, R. Risk factors for Alzheimer's disease. **Folia Neuropathologica**, v. 57, n. 2, p. 87–105, 2019.

AAPRO, M. et al. Digital health for optimal supportive care in oncology: benefits, limits, and future perspectives. **Supportive Care in Cancer**, v. 28, n. 10, p. 4589–4612, out. 2020.

ABBAS, S. Y.; AL-HARBI, R. A. K.; SH EL-SHARIEF, M. A. M. Synthesis and anticancer activity of thiourea derivatives bearing a benzodioxole moiety with EGFR inhibitory activity, apoptosis assay and molecular docking study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 198, p. 112363, jul. 2020.

ABDEL-HAFEZ, G. A. et al. Synthesis, computational study and biological evaluation of 9-acridinyl and 1-coumarinyl-1,2,3-triazole-4-yl derivatives as topoisomerase II inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 502–513, 31 dez. 2022.

ABUBAKAR, M. B. et al. Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 742408, 30 mar. 2022.

ALAGESAN, M. et al. DMSO containing ruthenium(II) hydrazone complexes: in vitro evaluation of biomolecular interaction and anticancer activity. **Dalton Trans.**, v. 43, n. 42, p. 15829–15840, 16 set. 2014.

ALBINO, S. L. et al. Bioprospecting of Nitrogenous Heterocyclic Scaffolds with Potential Action for Neglected Parasitosis: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 33, p. 4112–4150, 24 set. 2020.

ALBINO, S. L. et al. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 204, 29 jan. 2023.

ALEKSI, M. M.; KAPETANOVI, V. An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA – Drug Interactions. **Acta Chim. Slov.**, p. 19, 2014.

ALFADLY, E. D. et al. Tackling neuroinflammation and cholinergic deficit in Alzheimer's disease: Multi-target inhibitors of cholinesterases, cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 161–186, abr. 2019.

ALMEIDA, C. M. et al. Crystal structures, DNA-binding ability and influence on cellular viability of gold(I) complexes of thiosemicarbazones. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 502–519, 16 fev. 2018.

ALMEIDA, S. M. V. DE 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, nov. 2016.

ALNEYADI, S. S. et al. Synthesis, Characterization, and Antioxidant Activity of Some 2-Methoxyphenols derivatives. **Heterocyclic Communications**, v. 26, n. 1, p. 112–122, 27 set. 2020.

ALSAEDI, S. et al. DNA-Binding and Cytotoxicity of Copper(I) Complexes Containing Functionalized Dipyriddyphenazine Ligands. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 764, 20 maio 2021.

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

AN, X. et al. The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 331, dez. 2018.

AUNAN, J. R.; CHO, W. C.; SØREIDE, K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. **Aging and disease**, v. 8, n. 5, p. 628, 2017.

BAGULEY, B. C. et al. DNA-Binding Anticancer Drugs: One Target, Two Actions. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 552, 21 jan. 2021.

BAILLY, C. Pyronaridine: An update of its pharmacological activities and mechanisms of action. **Biopolymers**, v. 112, n. 4, abr. 2021.

BARRA, C. V. et al. DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and thioureas. **Inorganica Chimica Acta**, v. 446, p. 54–60, maio 2016.

BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2783, 6 jun. 2019.

BAUER, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 9, p. 1061–1073, set. 2015.

BAUTISTA-AGUILERA, Ó. M. et al. Tacrines as Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. V. Recent Developments. **The Chemical Record**, v. 21, n. 1, p. 162–174, jan. 2021.

BENOIT, A. R. Synthesis and Evaluation of Acridine and Acridone Based Compound as Anti-Cancer and Anti-Bacterial Agents. Dissertation. University of Minnesota p. 117, 2013.

BOLCATO, G. et al. Can We Still Trust Docking Results? An Extension of the Applicability of DockBench on PDBbind Database. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3558, 20 jul. 2019.

BOUZID MENAA, F. M. Importance of Fluorine and Fluorocarbons in Medicinal Chemistry and Oncology. **Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research**, v. 01, n. 02, 2013.

BRIGHENTE, I. M. C. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 156–161, jan. 2007.

BUZUN, K. et al. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 1781–1799, 1 jan. 2020.

CARVAJAL, F. J.; INESTROSA, N. C. Interactions of AChE with A β Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, 2011.

CASTRO, R. N.; SALGUEIRO, F. B. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, 1 ago. 2016.

CHALUPOVA, K. et al. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 491–514, abr. 2019.

CHATTERJEE, S. et al. New 13-pyridinealkyl berberine analogues intercalate to DNA and induce apoptosis in HepG2 and MCF-7 cells through ROS mediated p53 dependent pathway: biophysical, biochemical and molecular modeling studies. **RSC Advances**, v. 5, n. 110, p. 90632–90644, 2015.

CHEN, G.; SEUKEP, A. J.; GUO, M. Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 545, 30 out. 2020.

CHEN, Z. et al. Recent Advances in the Diagnosis, Staging, Treatment, and Prognosis of Advanced Gastric Cancer: A Literature Review. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 744839, 26 out. 2021.

CHENG, Z.-Q. et al. Molecular-docking-guided design and synthesis of new IAA-tacrine hybrids as multifunctional AChE/BChE inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 277–288, mar. 2019.

CHEUNG, J. et al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 26 nov. 2012.

CHOWDHURY, S. et al. Review on Recent Advances in Metal Ions Sensing Using Different Fluorescent Probes. **Journal of Fluorescence**, v. 28, n. 4, p. 999–1021, jul. 2018.

CHUFAROVA, N. et al. New tacrine-acridine hybrids as promising multifunctional drugs for potential treatment of Alzheimer's disease. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 7, p. 1800050, jul. 2018.

CISÁRIKOVÁ, A. et al. Acridin-3,6-dialkyldithiourea hydrochlorides as new photosensitizers for photodynamic therapy of mouse leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2011–2022, maio 2016.

ĆMIKIEWICZ, A.; GORDON, A. J.; BERSKI, S. Characterisation of the reaction mechanism between ammonia and formaldehyde from the topological analysis of ELF and catastrophe theory perspective. **Structural Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 243–255, fev. 2018.

CONTI FILHO, C. E. et al. Advances in Alzheimer's disease's pharmacological treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1101452, 26 jan. 2023.

COSS, A. et al. Increased topoisomerase II α expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. **Cancer Letters**, v. 276, n. 2, p. 228–238, abr. 2009.

COSTA, E. V. et al. Benzylated Dihydroflavones and Isoquinoline-Derived Alkaloids from the Bark of *Diclinanona calycina* (Annonaceae) and Their Cytotoxicities. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3714, 18 jun. 2021.

CUKIERMAN, D. S.; REY, N. A. Tridentate N-Acylhydrazones as Moderate Ligands for the Potential Management of Cognitive Decline Associated With Metal-Enhanced Neuroaggregopathies. **Frontiers in Neurology**, v. 13, p. 828654, 16 fev. 2022.

CUMMINGS, J. New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 16, n. 1, p. 2, dez. 2021.

CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 8, n. 1, jan. 2022.

CZARNECKA, K. et al. Tetrahydroacridine derivatives with fluorobenzoic acid moiety as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic Chemistry**, v. 72, p. 315–322, jun. 2017.

CZARNECKA, K. et al. New acridine derivatives as promising agents against methicillin-resistant staphylococci – From tests to in silico analysis. **Computational Biology and Chemistry**, v. 88, p. 107321, out. 2020.

DA 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, out. 2019.

DA SILVA OLIVEIRA, G. L.; DA SILVA, A. P. DOS S. C. L. Evaluation of the non-clinical toxicity of an antiparasitic agent: diminazene aceturate. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1–11, 9 mar. 2021.

DAFLON-YUNES, N. et al. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1–2, p. 123–135, nov. 2013.

DAI, Q. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel phthalazinone acridine derivatives as dual PARP and Topo inhibitors for potential anticancer agents. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 2, p. 404–408, fev. 2020.

DANIEL, J. P. et al. Anticancer potential of mebendazole against chronic myeloid leukemia: in silico and in vitro studies revealed new insights about the mechanism of action. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 952250, 25 ago. 2022.

DARVESH, S. et al. Butyrylcholinesterase Is Associated With β -Amyloid Plaques in the Transgenic APP_{SWE}/PSEN1dE9 Mouse Model of Alzheimer Disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 71, n. 1, p. 2–14, jan. 2012.

DAS, J. R.; TIZABI, Y. Additive Protective Effects of Donepezil and Nicotine Against Salsolinol-Induced Cytotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 3, p. 194–204, out. 2009.

DAS, S.; THAKUR, A. J. A green development of Bernthsen 9-substituted acridine synthesis in the absence of solvent catalyzed by *p*-toluenesulphonic acid (*p*-TSA). **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 131–135, jun. 2011.

DE ALMEIDA, P. S. V. B. et al. Cytotoxicity evaluation and DNA interaction of Ru^{II}-bipy complexes containing coumarin-based ligands. **Dalton Transactions**, v. 50, n. 41, p. 14908–14919, 2021.

DE ALMEIDA, S. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 13023–13042, 9 jun. 2015.

DE AQUINO, R. A. N. et al. Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 48, p. 8395, 2013.

DE CONTO, V. et al. In vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells. **Toxicology in Vitro**, v. 77, p. 105235, dez. 2021.

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

DE 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, nov. 2015.

DE 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, ago. 2017.

DE SOUSA PORTILHO, A. J. et al. 1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of H2AFX in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8105, 23 jul. 2022.

DEBELA, D. T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. **SAGE Open Medicine**, Volume 9: 1–10, 2021.

DE STROOPER, B.; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603–615, fev. 2016.

DESWAL, Y. et al. Transition metal complexes of triazole-based bioactive ligands: synthesis, spectral characterization, antimicrobial, anticancer and molecular docking studies. **Research on Chemical Intermediates**, v. 48, n. 2, p. 703–729, fev. 2022.

DINAMARCA, M. C. et al. Amyloid- β -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Ab peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. p. 15, 2010.

DO N. GOULART, P. et al. Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 90–126, 2021.

DOGANC, F. et al. Synthesis, in vitro antiprotozoal activity, molecular docking and molecular dynamics studies of some new monocationic guanidinobenzimidazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 221, p. 113545, out. 2021.

DRWAL, M. N. et al. Novel DNA Topoisomerase II α Inhibitors from Combined Ligand- and Structure-Based Virtual Screening. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114904, 9 dez. 2014.

DUARTE, S. S. et al. Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions. **Anticancer Research**, v. 40, n. 9, p. 5049–5057, set. 2020.

EHSANIAN, R.; VAN WAES, C.; FELLER, S. M. Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 13, dez. 2011.

EJAZ, H. W.; WANG, W.; LANG, M. Copper Toxicity Links to Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Therapeutics Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7660, 16 out. 2020.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling: *In silico* pharmacology for drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 9–20, set. 2007.

ELWAN, A. et al. Triazoloquinolines-based DNA intercalators-Topo II inhibitors: design, synthesis, docking, ADMET and anti-proliferative evaluations. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 1556–1567, 31 dez. 2022.

EXARCHAKOU, A. et al. Socio-economic inequalities in cancer survival: how do they translate into Number of Life-Years Lost? **British Journal of Cancer**, v. 126, n. 10, p. 1490–1498, 1 jun. 2022.

FALCO, A. D. et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, dez. 2020.

FENG, Y. et al. Expression of DNA topoisomerase II- α : Clinical significance in laryngeal carcinoma. **Oncology Letters**, v. 8, n. 4, p. 1575–1580, out. 2014.

FENG, Y.; WANG, X. Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–17, 2012.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FLECKNELL, P. A. **Laboratory animal anaesthesia**. 3rd ed ed. Amsterdam Boston London: Elsevier/Academic Press, 2009.

FONTE, M. et al. 4,9-Diaminoacridines and 4-Aminoacridines as Dual-Stage Antiplasmodial Hits. **ChemMedChem**, v. 16, n. 5, p. 788–792, 3 mar. 2021.

FONTE, MÉLANIE et al. Acridine-Based Antimalarials—From the Very First Synthetic Antimalarial to Recent Developments. p. 18, 24 jan. 2021.

FRANJESEVIC, A. J. et al. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Chemistry – A European Journal**, v. 25, n. 21, p. 5337–5371, 11 abr. 2019.

FU, Y. et al. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Ferulic Acid Hybrids as Multifunctional Drug Candidates against Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1338, 11 out. 2016.

FUI, C. J. et al. Recent Advancement of Ullmann Condensation Coupling Reaction in the Formation of Aryl-Oxygen (C-O) Bonding by Copper-Mediated Catalyst. **Catalysts**, v. 10, n. 10, p. 1103, 24 set. 2020.

GABRIEL, I. 'Acridines' as New Horizons in Antifungal Treatment. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1480, 25 mar. 2020.

GAO, C. et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800–1807, abr. 2015.

GENSICKA-KOWALEWSKA, M.; CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K. Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. **RSC Advances**, v. 7, n. 26, p. 15776–15804, 2017.

GERLITS, O. et al. A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory room-temperature crystallography studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 309, p. 108698, ago. 2019.

GILAD, Y.; SENDEROWITZ, H. Docking Studies on DNA Intercalators. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 1, p. 96–107, 27 jan. 2014.

GONZÁLEZ, M. L. et al. Mechanism Underlying the Reversal of Drug Resistance in P-Glycoprotein-Expressing Leukemia Cells by Pinoresinol and the Study of a Derivative. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 205, 25 abr. 2017.

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

GOVENDER, H. et al. Synthesis, antibacterial activity and docking studies of substituted quinolone thiosemicarbazones. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 194, n. 11, p. 1074–1081, 2 nov. 2019.

GREIG, N. H. et al. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. p. 6, 2005.

GÜNDÜZ, M. G. et al. Design, synthesis and computational analysis of novel acridine-(sulfadiazine/sulfathiazole) hybrids as antibacterial agents. **Journal of Molecular Structure**, v. 1186, p. 39–49, jun. 2019.

GUO, Y. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Dual-Target Inhibitors against Alzheimer's Diseases. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 489, 23 jan. 2020.

HABET, S. Narrow Therapeutic Index drugs: clinical pharmacology perspective. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 10, p. 1285–1291, 7 set. 2021.

HAIDER, M. R. et al. Novel 9-(2-(1-arylethylidene)hydrazinyl)acridine derivatives: Target Topoisomerase 1 and growth inhibition of HeLa cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102962, jul. 2019.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 jul. 2018.

HAMULAKOVA, S. et al. Synthesis, in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking of new acridine-coumarin hybrids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 333–338, nov. 2017.

HAMULAKOVA, S. et al. Design and synthesis of novel tacrine–indole hybrids as potential multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 785–804, maio 2021.

HARIBABU, J. et al. Synthesis, DNA/protein binding, molecular docking, DNA cleavage and in vitro anticancer activity of nickel(II) bis(thiosemicarbazone) complexes. **RSC Advances**, v. 5, n. 57, p. 46031–46049, 2015.

HAWASH, M. et al. In vitro and in vivo assessment of the antioxidant potential of isoxazole derivatives. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18223, 29 out. 2022.

HEFFETER, P. et al. Anticancer Thiosemicarbazones: Chemical Properties, Interaction with Iron Metabolism, and Resistance Development. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1062–1082, 10 mar. 2019.

HERAVI, M. M.; ZADSIRJAN, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. **RSC Advances**, v. 10, n. 72, p. 44247–44311, 2020.

HMOUD ALOTAIBI, S.; ABDALLA MOMEN, A. Anticancer Drugs' Deoxyribonucleic Acid (DNA) Interactions. Em: A. A. KHALID, M. (Ed.). **Biophysical Chemistry - Advance Applications**. IntechOpen, 2020.

HOOGMARTENS, J.; CACACE, R.; VAN BROECKHOVEN, C. Insight into the genetic etiology of Alzheimer's disease: A comprehensive review of the role of rare variants. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 13, n. 1, jan. 2021.

HOSSEINPOOR, H. et al. A Series of Benzylidenes Linked to Hydrazine-1-carbothioamide as Tyrosinase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Structure–Activity Relationship. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 8, ago. 2020.

HOUSMAN, G. et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 5 set. 2014.

HU, W. et al. Discovery of Novel Topoisomerase II Inhibitors by Medicinal Chemistry Approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 8947–8980, 25 out. 2018.

HUBER, R. G. et al. Heteroaromatic π -Stacking Energy Landscapes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 5, p. 1371–1379, 27 maio 2014.

HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of π - π interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5525–5534, jul. 1990.

IMMING, P. Medicinal Chemistry. Em: **The Practice of Medicinal Chemistry**. Elsevier, 2015. p. 3–13.

JAMPILEK, J. Heterocycles in Medicinal Chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3839, 25 out. 2019.

JANG, C. et al. Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors designed by pharmacophore-based virtual screening, molecular docking and bioassay. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14921, dez. 2018.

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: Biology**, v. 114, p. 38–43, set. 2012.

JIANG, C.-S. et al. Discovery of New Selective Butyrylcholinesterase (BChE) Inhibitors with Anti-A β Aggregation Activity: Structure-Based Virtual Screening, Hit Optimization and Biological Evaluation. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2568, 15 jul. 2019.

JIANG, Q. et al. Entrectinib, a new multi-target inhibitor for cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 150, p. 112974, jun. 2022.

JIN, M. Y. et al. Engineered non-covalent π interactions as key elements for chiral recognition. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3276, 7 jun. 2022.

JOHNSON, E. R. et al. Revealing Noncovalent Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6498–6506, 12 maio 2010.

KAMEL, G. M. et al. Simple, selective detection and efficient removal of toxic lead and silver metal ions using Acid Red 94. **RSC Advances**, v. 9, n. 15, p. 8355–8363, 2019.

KANCHARLA, P. et al. Boron trifluoride etherate promoted microwave-assisted synthesis of antimalarial acridones. **RSC Advances**, v. 9, n. 72, p. 42284–42293, 2019.

KEIZER, J. Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 6, p. 1494–1498, mar. 1983.

KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug–DNA Interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730–1739, 28 fev. 2012.

KIFAYATULLAH, M. et al. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. **Journal of Acute Disease**, v. 4, n. 4, p. 309–315, out. 2015.

KIFLE, Z. D. et al. A recent development of new therapeutic agents and novel drug targets for cancer treatment. **SAGE Open Medicine**, v. 9, p. 205031212110670, jan. 2021.

KIM, H. G. et al. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. **NeuroToxicology**, v. 40, p. 23–32, jan. 2014.

KISHBAUGH, T. L. S. Six-Membered Ring Systems: Pyridine and Benzo Derivatives. Em: **Progress in Heterocyclic Chemistry**. Elsevier, 2012. v. 24p. 343–391.

KITDUMRONGTHUM, S. et al. Inhibition of topoisomerase II α and induction of DNA damage in cholangiocarcinoma cells by altholactone and its halogenated benzoate derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110149, jul. 2020.

KLASSMANN, L. R. et al. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **ANVISA**. p. 48, 2013.

KOŠAK, U. et al. Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39495, 23 dez. 2016.

KOZURKOVA, M.; SABOLOVA, D.; KRISTIAN, P. A new look at 9-substituted acridines with various biological activities. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 175–189, jan. 2021.

KUMAR, A. et al. Synthesis of new 4-aminoquinolines and quinoline–acridine hybrids as antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7059–7063, dez. 2010.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; CHAE, P. S. A Chromo-Fluorogenic Naphthoquinolinedione-Based Probe for Dual Detection of Cu²⁺ and Its Use for Various Water Samples. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 785, 25 jan. 2022.

KUMAR, L. V.; NATH, G. R. Synthesis, characterization and biological studies of cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes of vanillin-4-methyl-4-phenyl-3-thiosemicarbazone. **Journal of Chemical Sciences**, v. 131, n. 8, p. 76, ago. 2019.

- KUMAR, P.; KUMAR, R.; PRASAD, D. N. Synthesis and anticancer study of 9-aminoacridine derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 79–85, jan. 2013.
- KUMAR, S.; NAIR, M. S. Deciphering the interaction of flavones with calf thymus DNA and octamer DNA sequence (CCAATTGG)₂. **RSC Advances**, v. 11, n. 47, p. 29354–29371, 2021.
- LAMBA, D.; PESARESI, A. Kinetic Modeling of Time-Dependent Enzyme Inhibition by Pre-Steady-State Analysis of Progress Curves: The Case Study of the Anti-Alzheimer's Drug Galantamine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5072, 3 maio 2022.
- LAPASAM, A. et al. Half-sandwich arene ruthenium, rhodium and iridium thiosemicarbazone complexes: synthesis, characterization and biological evaluation. **Journal of Chemical Sciences**, v. 132, n. 1, p. 34, dez. 2020.
- LAROCHE-CLARY, A.; LARRUE, A.; ROBERT, J. Down-regulation of bcr-abl and bcl-xL expression in a leukemia cell line and its doxorubicin-resistant variant by topoisomerase II inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1823–1828, dez. 2000.
- LEE, J. et al. Design and Synthesis of (Z)-2-(Benzylamino)-5-benzylidenethiazol-4(5H)-one Derivatives as Tyrosinase Inhibitors and Their Anti-Melanogenic and Antioxidant Effects. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 848, 14 jan. 2023.
- LEE, J. H.; BERGER, J. M. Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 859, 30 out. 2019.
- LEHMANN, F.; WENNERBERG, J. Evolution of Nitrogen-Based Alkylating Anticancer Agents. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 377, 19 fev. 2021.
- LI, D. et al. Synthesis and biological research of novel azaacridine derivatives as potent DNA-binding ligands and topoisomerase II inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3437–3446, jul. 2017a.
- LI, L. et al. Multifunctional Compound AD-35 Improves Cognitive Impairment and Attenuates the Production of TNF- α and IL-1 β in an A β 25–35-induced Rat Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 56, n. 4, p. 1403–1417, 20 fev. 2017b.
- LI, L. et al. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 629266, 8 fev. 2021a.
- LI, M.-M. et al. Recent advances of N-heterocyclic carbenes in the applications of constructing carbo- and heterocyclic frameworks with potential biological activity. **RSC Advances**, v. 11, n. 60, p. 38060–38078, 2021b.
- LI, Q. Virtual screening of small-molecule libraries. Em: **Small Molecule Drug Discovery**. Elsevier, 2020a. p. 103–125.
- LI, Q. Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 180, 5 ago. 2020b.
- LI, S. et al. Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition. **SLAS Discovery**, v. 26, n. 10, p. 1355–1364, dez. 2021c.

- LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 1 jan. 2005.
- LIN, X.; LI, X.; LIN, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1375, 18 mar. 2020.
- LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 64, 24 dez. 2019.
- LIU, Z. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffolds as potent antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 782–793, nov. 2014.
- LOBODA, K. B. et al. Design and synthesis of 3,5-substituted 1,2,4-oxadiazoles as catalytic inhibitors of human DNA topoisomerase II α . **Bioorganic Chemistry**, v. 99, p. 103828, jun. 2020.
- LOMONACO, L. A.; KOIFMAN, R. J.; FREIRE, C. Perfil clínico-epidemiológico e sobrevida hospitalar dos casos de leucemia aguda em um hospital de referência em Rio Branco, Acre, 2007-2014. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 29, n. 3, p. 351–365, set. 2021.
- MACARI, G. et al. Fragment-Based Ligand-Protein Contact Statistics: Application to Docking Simulations. **Int. J. Mol. Sci.**, p. 18, 2019.
- MAHAPATRA, A. K. et al. A new selective chromogenic and turn-on fluorogenic probe for copper(II) in solution and vero cells: recognition of sulphide by [CuL]. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 14, p. 6490–6501, 2015.
- MAKHAEVA, G. F. et al. 9-Substituted acridine derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors possessing antioxidant activity for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 21, p. 5981–5994, nov. 2017.
- MAKHAEVA, G. F. et al. Conjugates of Tacrine and Salicylic Acid Derivatives as New Promising Multitarget Agents for Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2285, 24 jan. 2023.
- MAKHOBBA, X. H. et al. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 14, p. 3235–3249, ago. 2020.
- MANIVANNAN, C. et al. A Spectroscopic Approach with Theoretical Studies to Study the Interaction of 9-aminoacridine with Certain Phenols. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 231, n. 5, p. 939–956, 1 maio 2017.
- MANIVEL, J.; SANGEETHA, S.; MURALI, M. DNA and BSA Interaction, DNA Cleavage and *In Vitro* Cytotoxicity of Copper(II) Complexes: [Cu(bba)(phen)](ClO₄)₂ is Promising Chemotherapeutic Scaffold. **Journal of Scientific Research**, v. 12, n. 1, p. 111–133, 1 jan. 2020.
- MANSOORI, B. et al. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, 25 set. 2017.

- MARKHAM, M. J. et al. Clinical Cancer Advances 2020: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 10, p. 26, 2020.
- MARUCCI, G. et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 190, p. 108352, jun. 2021.
- MATIAS-BARRIOS, V. M. et al. Discovery of New Catalytic Topoisomerase II Inhibitors for Anticancer Therapeutics. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 633142, 1 fev. 2021.
- MATSA, R. et al. Thiosemicarbazone derivatives: Design, synthesis and in vitro antimalarial activity studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 137, p. 104986, set. 2019.
- MCKIE, S. J.; NEUMAN, K. C.; MAXWELL, A. DNA topoisomerases: Advances in understanding of cellular roles and multi-protein complexes via structure-function analysis. **BioEssays**, v. 43, n. 4, p. 2000286, abr. 2021.
- MEDAPI, B. et al. Development of acridine derivatives as selective Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 877–885, fev. 2016.
- MERMER, A.; ALYAR, S. Synthesis, characterization, DFT calculation, antioxidant activity, ADMET and molecular docking of thiosemicarbazide derivatives and their Cu (II) complexes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, p. 109742, jan. 2022.
- MEZA MENCHACA, T.; JUÁREZ-PORTILLA, C.; C. ZEPEDA, R. Past, Present, and Future of Molecular Docking. Em: GAITONDE, V.; KARMAKAR, P.; TRIVEDI, A. (Eds.). **Drug Discovery and Development - New Advances**. IntechOpen, 2020.
- MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8400–8413, 2021.
- MITRA, P. et al. Antibacterial and Photocatalytic Properties of ZnO–9-Aminoacridine Hydrochloride Hydrate Drug Nanoconjugates. **ACS Omega**, v. 3, n. 7, p. 7962–7970, 31 jul. 2018.
- MOHAMADI FARSANI, F. et al. Structural basis of DNA topoisomerase II- α (Top2- α) inhibition: a computational analysis of interactions between Top2- α and its inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 6, p. 1250–1259, jun. 2016.
- MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, M. et al. Design, synthesis, pharmacological evaluation, and docking study of new acridone-based 1,2,4-oxadiazoles as potential anticonvulsant agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 112, p. 91–98, abr. 2016.
- MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. Volume 11, p. 151–164, abr. 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MUSCIA, G. C.; BULDAIN, G. Y.; ASÍS, S. E. Design, synthesis and evaluation of acridine and fused-quinoline derivatives as potential anti-tuberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 243–249, fev. 2014.

NAGEL, R.; SEMENOVA, E. A.; BERNS, A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. **EMBO reports**, v. 17, n. 11, p. 1516–1531, nov. 2016.

NAJAFI, Z. et al. Design and synthesis of novel anti-Alzheimer's agents: Acridine-chromenone and quinoline-chromenone hybrids. **Bioorganic Chemistry**, v. 67, p. 84–94, ago. 2016.

NAKAMURA, T. et al. Determination of the LD50 of Acridine Orange via Intravenous Administration in Mice in Preparation for Clinical Application to Cancer Therapy. **in vivo**, p. 5, 2014.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 245, 22 mar. 2018.

OGINO, M. et al. Implications of Topoisomerase (TOP1 and TOP2 α) Expression in Patients With Breast Cancer. **In Vivo**, v. 34, n. 6, p. 3483–3487, 2020.

OKORO, C. O.; FATOKI, T. H. A Mini Review of Novel Topoisomerase II Inhibitors as Future Anticancer Agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2532, 28 jan. 2023.

OLIVEIRA, G. L. DA S. et al. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 338–346, fev. 2018.

OSET-GASQUE, M. J.; MARCO-CONTELLAS, J. Alzheimer's Disease, the "One-Molecule, One-Target" Paradigm, and the Multitarget Directed Ligand Approach. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 401–403, 21 mar. 2018.

PADMANABHAN, P. et al. Antiviral activity of Thiosemicarbazones derived from α -amino acids against Dengue virus: Anti Viral activity of Thiosemicarbazones Derivatives. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 3, p. 546–552, mar. 2017.

PARCHETA, M. et al. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 1984, 15 abr. 2021.

PATADIYA, N.; PANCHAL, N.; VAGHELA, V. A REVIEW ON ENZYME INHIBITORS. **International Research Journal Of Pharmacy**, v. 12, n. 6, p. 60–66, 30 jun. 2021.

PAUL, A.; LADAME, S. 9-Amino Acridines Undergo Reversible Amine Exchange Reactions in Water: Implications on Their Mechanism of Action in Vivo. **Organic Letters**, v. 11, n. 21, p. 4894–4897, 5 nov. 2009.

- PEARCE, A. et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0184360, 10 out. 2017.
- PÉREZ-ARNAIZ, C. et al. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 5, p. 1288–1295, 6 fev. 2014.
- PETRASHEUSKAYA, T. V. et al. Estrone–salicylaldehyde N-methylated thiosemicarbazone hybrids and their copper complexes: solution structure, stability and anticancer activity in tumour spheroids. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 775–791, out. 2021.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.
- PITASSE-SANTOS, P. et al. A Novel Protocol for the Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles Active against Trypanosomatids and Drug-Resistant Leukemia Cell Lines. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 12, p. 403, 28 nov. 2022.
- PLUCHINO, K. M. et al. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 1–2, p. 98–105, fev. 2012.
- POMMIER, Y. et al. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 5, p. 421–433, maio 2010.
- POPE, C. N.; BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 205–216, jul. 2018.
- POPP, F. D. Polyphosphoric Acid in the Berntsen Reaction ¹. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 2658–2659, jul. 1962.
- PRABAKARAN, K. et al. Synthesis and characterisation of new acridine dye molecules combined UV absorber and exploring photophysical properties. **Dyes and Pigments**, v. 192, p. 109391, ago. 2021.
- PRASHER, P.; SHARMA, M. Medicinal chemistry of acridine and its analogues. **MedChemComm**, v. 9, n. 10, p. 1589–1618, 2018.
- PRITAM, P. et al. Antioxidants in Alzheimer’s Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 212, 28 jan. 2022.
- PRZYBYŁOWSKA, M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel *N*-phosphorylated and *O*-phosphorylated tacrine derivatives as potential drugs against Alzheimer’s disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 1012–1022, 31 dez. 2022.
- PUCCI, C.; MARTINELLI, C.; CIOFANI, G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. **ecancermedicalsecience**, v. 13, 10 set. 2019.
- QUARTI, J. et al. Selective Cytotoxicity of Piperine over Multidrug Resistance Leukemic Cells. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 934, 10 fev. 2021.

QUEDA, F. et al. Novel Donepezil–Arylsulfonamide Hybrids as Multitarget-Directed Ligands for Potential Treatment of Alzheimer’s Disease. **Molecules**, v. 26, n. 6, p. 1658, 16 mar. 2021.

QUEIROZ, C. M. et al. Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 11, p. 2050–2065, nov. 2020.

QUEIROZ, K. C. S. et al. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. **Oncogene**, v. 29, n. 48, p. 6314–6322, 2 dez. 2010.

RABBITO, A. et al. Biochemical Markers in Alzheimer’s Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1989, 14 mar. 2020.

RAMANA, M. M. V. et al. In vitro DNA binding studies of antiretroviral drug nelfinavir using ethidium bromide as fluorescence probe. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 194–200, out. 2015.

RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, dez. 2018.

RAMSAY, R.; TIPTON, K. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1192, 15 jul. 2017.

RAUSCH, M. et al. Identification of low-dose multidrug combinations for sunitinib-naive and pre-treated renal cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 123, n. 4, p. 556–567, 18 ago. 2020.

REHUMAN, N. A. et al. Halogenated Coumarin–Chalcones as Multifunctional Monoamine Oxidase-B and Butyrylcholinesterase Inhibitors. **ACS Omega**, v. 6, n. 42, p. 28182–28193, 26 out. 2021.

REID, G. A.; CHILUKURI, N.; DARVESH, S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. **Neuroscience**, v. 234, p. 53–68, mar. 2013.

REN, Y. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel acridine and quinoline derivatives as tubulin polymerization inhibitors with anticancer activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 116376, set. 2021.

RESCIFINA, A. et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 95–115, mar. 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, p. 111592, nov. 2019.

RICCIO, A. A.; SCHELLENBERG, M. J.; WILLIAMS, R. S. Molecular mechanisms of topoisomerase 2 DNA–protein crosslink resolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 1, p. 81–91, jan. 2020.

RICHTER, L. Topliss Batchwise Schemes Reviewed in the Era of Open Data Reveal Significant Differences between Enzymes and Membrane Receptors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 10, p. 2575–2583, 23 out. 2017.

RODY, A. et al. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 113, n. 3, p. 457–466, fev. 2009.

ROSENBERRY, T. et al. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2098, 29 nov. 2017.

ROSSI, M. et al. Sustainable Drug Discovery of Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 8, p. 4972–4990, 22 abr. 2021.

ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. Other Related Techniques. Em: **Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment**. Elsevier, 2015. p. 357–425.

RUMJANEK, V. M. et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 57–69, mar. 2001.

RUPAR, J. et al. Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 378–386, 2020.

S. SCHNEIDER, L. A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 111–128, 30 jun. 2022.

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

SAGHATFOROUSH, L. et al. INVESTIGATION OF THE BINDING ABILITY OF A NEW THIOSEMICARBAZONE-BASED LIGAND AND ITS Zn(II) COMPLEX TOWARD PROTEINS AND DNA: SPECTRAL, STRUCTURAL, THEORETICAL, AND DOCKING STUDIES. **Journal of Structural Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 748–761, maio 2021.

SALAS ROJAS, M. et al. Quinacrine, an Antimalarial Drug with Strong Activity Inhibiting SARS-CoV-2 Viral Replication In Vitro. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 121, 17 jan. 2021.

SALEEM, U. et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 580–585, 2017.

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

- SALUSTIANO, E. J. et al. Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reverts multidrug resistance by differentially modulating ABC transporters in chronic myeloid leukemias. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 19, p. 6457–6471, maio 2020.
- SAMEEM, B. et al. A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 332–345, mar. 2017.
- SAMPIETRO, A. et al. Unveiling the Multitarget Anti-Alzheimer Drug Discovery Landscape: A Bibliometric Analysis. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 545, 28 abr. 2022.
- SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.
- SANTOS, L. DE S. et al. Xylopine Induces Oxidative Stress and Causes G₂/M Phase Arrest, Triggering Caspase-Mediated Apoptosis by p53-Independent Pathway in HCT116 Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.
- SANTOS, S. N. et al. Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC Advances**, v. 9, n. 35, p. 20356–20369, 2019.
- SATPATHI, S. et al. A Green Solvent Induced DNA Package. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9137, ago. 2015.
- SAZELI, S. et al. Semicarbazide and thiosemicarbazide containing butylated hydroxytoluene moiety: new potential antioxidant additives for synthetic lubricating oil. **RSC Advances**, v. 11, n. 13, p. 7138–7145, 2021.
- SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY**, p. 13, 2019.
- SETHI, A. et al. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. Em: GAITONDE, V.; KARMAKAR, P.; TRIVEDI, A. (Eds.). **Drug Discovery and Development - New Advances**. IntechOpen, 2020.
- SHAHABADI, N.; HASHEMPOUR, S. DNA binding studies of antibiotic drug cephalexin using spectroscopic and molecular docking techniques. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 38, n. 6, p. 428–447, 3 jun. 2019.
- SHARBER, S. A.; MULLIN, W. J.; THOMAS, S. W. Bridging the Void: Halogen Bonding and Aromatic Interactions to Program Luminescence and Electronic Properties of π -Conjugated Materials in the Solid State. **Chemistry of Materials**, v. 33, n. 17, p. 6640–6661, 14 set. 2021.
- SHERBORNE, G. J. et al. Origins of high catalyst loading in copper(I)-catalysed Ullmann–Goldberg C–N coupling reactions. **Chemical Science**, v. 8, n. 10, p. 7203–7210, 2017.

- SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, jan. 2023.
- SILVA, C. F. M. et al. Evolution of Acridines and Xanthenes as a Core Structure for the Development of Antileishmanial Agents. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 148, 26 jan. 2022.
- SILVA, V. R. et al. A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 288, dez. 2018.
- SINNOKROT, M. O.; SHERRILL, C. D. Substituent Effects in π - π Interactions: Sandwich and T-Shaped Configurations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 24, p. 7690–7697, 23 jun. 2004.
- SINYOR, B.; MINEO, J.; OCHNER, C. Alzheimer's Disease, Inflammation, and the Role of Antioxidants. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 4, n. 1, p. 175–183, 16 jun. 2020.
- SKOK, Ž. et al. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 884–904, 13 fev. 2020.
- SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555–563, fev. 2010.
- SONI, A. et al. A DNA Intercalation Methodology for an Efficient Prediction of Ligand Binding Pose and Energetics. **Bioinformatics**, p. btx006, 10 jan. 2017.
- SOUSA, G. et al. Synthesis and Evaluation of Antiproliferative Activity, Topoisomerase II α Inhibition, DNA Binding and Non-Clinical Toxicity of New Acridine–Thiosemicarbazone Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1098, 2 set. 2022.
- SPEROTTO, E. et al. The mechanism of the modified Ullmann reaction. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 43, p. 10338, 2010.
- STANCIU, G. D. et al. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 40, 26 dez. 2019.
- SUN, D. et al. Dual-target kinase drug design: Current strategies and future directions in cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 188, p. 112025, fev. 2020.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.
- TABASSUM, S.; MISRANI, A.; YANG, L. Exploiting Common Aspects of Obesity and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 14, p. 602360, 15 dez. 2020.
- TANG, G. et al. Analysis of Animal Well-Being When Supplementing Drinking Water with Tramadol or Metamizole during Chronic Pancreatitis. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2306, 5 dez. 2020.

- TOK, F. et al. Synthesis of novel thiosemicarbazone derivatives as antidiabetic agent with enzyme kinetic studies and antioxidant activity. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 197, n. 12, p. 1284–1294, 2 dez. 2022.
- TONELLI, M. et al. Acridine derivatives as anti-BVDV agents. **Antiviral Research**, v. 91, n. 2, p. 133–141, ago. 2011.
- TOPLISS, J. G. Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 15, 1972.
- TORRES, P. H. M. et al. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 15 set. 2019.
- TSAVARIS, N. et al. Topoisomerase I and II α protein expression in primary colorectal cancer and recurrences following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 391–398, jul. 2009.
- TSENG, H.-J. et al. Synthesis and biological evaluation of acridine-based histone deacetylase inhibitors as multitarget agents against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 192, p. 112193, abr. 2020.
- TYLIŃSKA, B. et al. Evaluation of Interactions of Selected Olivacine Derivatives with DNA and Topoisomerase II. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8492, 6 ago. 2021.
- VANN, K. R.; OVIATT, A. A.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II Poisons: Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors. **Biochemistry**, v. 60, n. 21, p. 1630–1641, 1 jun. 2021.
- VARADWAJ, P. et al. Can Combined Electrostatic and Polarization Effects Alone Explain the F \cdots F Negative-Negative Bonding in Simple Fluoro-Substituted Benzene Derivatives? A First-Principles Perspective. **Computation**, v. 6, n. 4, p. 51, 20 set. 2018.
- VERNON, R. M. et al. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. **eLife**, v. 7, p. e31486, 9 fev. 2018.
- VILKOVÁ, M. et al. Acridine Based N-Acylhydrazone Derivatives as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Characterization and ctDNA/HSA Spectroscopic Binding Properties. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2883, 30 abr. 2022.
- VITAKU, E.; SMITH, D. T.; NJARDARSON, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10257–10274, 26 dez. 2014.
- WANG, G. et al. Exploring the binding mechanism of phosphoramidate derivative with DNA: Spectroscopy, calorimetry and modeling. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 492–496, mar. 2013.

- WANG, Y.-R. et al. Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 18, p. 10861–10871, 13 out. 2017.
- WANG, Z.-M. et al. Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 282–297, nov. 2016.
- WENDORFF, T. J. et al. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, n. 3–4, p. 109–124, dez. 2012.
- WEYESA, A.; MULUGETA, E. Recent advances in the synthesis of biologically and pharmaceutically active quinoline and its analogues: a review. **RSC Advances**, v. 10, n. 35, p. 20784–20793, 2020.
- WHEELER, S. E. Understanding Substituent Effects in Noncovalent Interactions Involving Aromatic Rings. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 4, p. 1029–1038, 16 abr. 2013.
- WILEY, J. C. PROPOSED MECHANISMS. p. 3, 2010.
- WINGERT, B. M.; CAMACHO, C. J. Improving small molecule virtual screening strategies for the next generation of therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 44, p. 87–92, jun. 2018.
- WOLF, S. J. et al. In vitro assessment of novel transcription inhibitors and topoisomerase poisons in rhabdomyosarcoma cell lines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 6, p. 1059–1069, nov. 2009.
- WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. **Biochemistry**, v. 26, n. 20, p. 6392–6396, out. 1987.
- WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**, v. 323, n. 9, p. 844, 3 mar. 2020.
- WU, F. et al. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 726, 11 set. 2020a.
- WU, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel carbamates as potential inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115324, mar. 2020b.
- WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3490, dez. 2018.
- XIA, X. et al. Aging and Alzheimer's disease: Comparison and associations from molecular to system level. **Aging Cell**, v. 17, n. 5, p. e12802, out. 2018.

XIAO, S. et al. Efficacy and safety of a novel acetylcholinesterase inhibitor octohydroaminoacridine in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Phase II multicenter randomised controlled trial. **Age and Ageing**, v. 46, n. 5, p. 767–773, 1 set. 2017.

XU, A. et al. Tacrine-hydroxamate derivatives as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis, and biological evaluation. **Bioorganic Chemistry**, v. 98, p. 103721, maio 2020.

YALOWICH, J. C. et al. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 52–58, jul. 2012.

YANG, J. et al. The influence of the molecular packing on the room temperature phosphorescence of purely organic luminogens. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 840, dez. 2018.

YANG, S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11–12, p. 444–450, jun. 2010.

YANG, X. et al. Classification of difference between inhibition constants of an inhibitor to facilitate identifying the inhibition type. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 205–213, 1 fev. 2013.

YUAN, Z. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 4-amidobenzimidazole acridine derivatives as dual PARP and Topo inhibitors for cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 1135–1146, set. 2017.

ZAIB, S. et al. Hybrid Quinoline-Thiosemicarbazone Therapeutics as a New Treatment Opportunity for Alzheimer's Disease–Synthesis, In Vitro Cholinesterase Inhibitory Potential and Computational Modeling Analysis. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6573, 30 out. 2021.

ZAWADA, K. et al. New hybrids of tacrine and indomethacin as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors. **Chemical Papers**, v. 75, n. 1, p. 249–264, jan. 2021.

ZEGLIS, B. M.; DIVILOV, V.; LEWIS, J. S. Role of Metalation in the Topoisomerase II α Inhibition and Antiproliferation Activity of a Series of α -Heterocyclic-N⁴-Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu(II) Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2391–2398, 14 abr. 2011.

ZELL, J. et al. DNA folds threaten genetic stability and can be leveraged for chemotherapy. **RSC Chemical Biology**, v. 2, n. 1, p. 47–76, 2021.

ZHANG, B. et al. Design, synthesis and biological research of novel N-phenylbenzamide-4-methylamine acridine derivatives as potential topoisomerase I/II and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 23, p. 126714, dez. 2019.

ZHONG, L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 201, dez. 2021.

ZHOU, S.; HUANG, G. The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112556, fev. 2022.