



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA



LUCAS MATHEUS DE SOUZA RODRIGUES

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS TIAZÓIS
COMO POTENCIAIS INTERCALADORES DE DNA E INIBIDORES DA
TOPOISOMERASE II

SERRA TALHADA-PE

2019

LUCAS MATHEUS DE SOUZA RODRIGUES

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS TIAZÓIS
COMA BSA E COMO POTENCIAIS INTERCALADORES DE DNA E
INIBIDORES DA TOPOISOMERASE II

Monografia apresentada ao curso de licenciatura em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em química.

Orientador: Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza.

SERRA TALHADA-PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

R696e Rodrigues, Lucas Matheus de Souza

Estudos de Docking molecular de derivados tiazóis com a BSA e como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II / Lucas Matheus de Souza Rodrigues. ã Serra Talhada, 2019.

61 f.: il. Color.

Orientador: Túlio Ricardo Couto de Lima Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) ã Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Albumina. 2. DNA. 3. Farmacocinética. I. Souza, Túlio Ricardo Couto de Lima, orient. II. Título.

CDD 540

Lucas Matheus de Souza Rodrigues

ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS TIAZÓIS COM
A BSA E COMO POTENCIAIS INTERCALADORES DE DNA E
INIBIDORES DA TOPOISOMERASE II

Monografia Apresentada à Universidade Federal Rural de
Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada como pré-requisito
para obtenção do título de licenciado em química.

Aprovada em 07/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo de Castro Aguiar

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

SERRA TALHADA-PE

Fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela vida e pela oportunidade de concluir minha graduação. Agradeço a minha família, meu pai Ivanildo e minha mãe Maria, minha avó e meus irmãos pelo apoio.

Aos meus amigos, pois foram pessoas muito importantes e essenciais para a conclusão do curso.

Sou muito grato ao professor Eduardo Aguiar por todas as dicas e contribuições que foram muito importantes para realização deste trabalho e também por disponibilizar o laboratório de simulação computacional para realização da pesquisa.

Agradeço em especial ao meu orientador Túlio Couto, por me aceitar como orientando, pelas contribuições não só com a realização desta pesquisa, mas também com minha trajetória acadêmica, e por estar sempre disposto a me guiar e esclarecer minhas dúvidas.

RESUMO

O câncer é um termo que se refere ao conjunto de doenças causadas pelo crescimento celular desordenado, sendo uma das principais causas de morte no mundo. Embora a quimioterapia seja muito empregada para o tratamento do câncer o uso desse método ainda possui limitações e induz o surgimento de efeitos adversos, surgindo nesse contexto a necessidade de desenvolvimento de drogas mais eficazes. A descoberta de novos quimioterápicos anticancerígenos capazes de interagir com o DNA e inibir enzimas topoisomerases é destacada na pesquisa anticâncer. Além disso a verificação do perfil farmacocinético de compostos com ação farmacológica é de grande importância para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Os métodos computacionais de modelagem molecular constituem uma ferramenta muito importante para o planejamento e obtenção de novos medicamentos. O emprego de técnicas de docking molecular têm se mostrado eficiente para prever a afinidade e orientação de ligação de compostos candidatos a fármacos com seus receptores biológicos. Logo esta pesquisa tem como objetivo avaliar teoricamente a interação de 8 derivados tiazóis, com a albumina bovina, proteína com função de armazenamento e transporte de fármacos, o DNA e as duas isoformas do complexo DNA-topoisomerase e verificar algumas propriedades que afetam as características de absorção e distribuição dos compostos em estudo. O estudo *in silico* foi feito utilizando as plataformas pkCMS e SwissADME e o método de docking do algoritmo Lamarckiano. Como resultado de docking e análise das interações intermoleculares observou-se que os complexos albumina-ligante formados se dão principalmente por meio de interações hidrofóbicas e todos os ligantes se ligam próximos ao ambiente de triptofano. Observou-se também que os ligantes formaram complexos com o DNA com energias inferiores a -9,00 kcal/mol, exceto o ligante **7d**. Os dados da investigação de docking sugerem que os ligantes possuem potencial de intercalação para formação de um complexo ternário com as duas isoformas da topoisomerase (II^U e II[•]), sendo os compostos **7d** e **7h** os que formaram complexos ternários mais estáveis tanto com a Topo II^U como com a topoisomerase II[•], e por meio da análise das forças intermoleculares foi observado que eles interagem com os pares de bases do sítio de ligação. A estimativa das propriedades farmacocinéticas *in silico* indicaram de forma geral que os ligantes possuem boas características de absorção e distribuição, sendo os ligantes mais lipossolúveis os que possuem maior probabilidade de permeação no sistema nervoso. Todos os ligantes atenderam as regras propostas por Veber e somente o derivado **7c** atende as regras propostas por Lipinski. Por apresentarem altos valores de lipofilicidade é indicado que os compostos possuam de moderada a alta probabilidade de atravessar a BHE, e penetrar no SNC. A pesquisa mostrou uma estimativa do perfil farmacocinético dos ligantes em estudo e indicou que os ligantes podem ser sensíveis a ensaios de fluorescência com BSA. Além disso analisando o padrão de ligação dos 8 derivados, foi observado que pelo fato de possuírem sistemas aromáticos planares eles apresentam potencial para intercalar com o DNA e atuar como veneno de topoisomerase II.

Palavras-chave: Docking molecular. Albumina. DNA. Topoisomerase II. Ligantes tiazóis. Farmacocinética.

Lista de Figuras

Figura 1: Desenvolvimento celular de tumores sólidos.	13
Figura 2: Modos de interação de compostos com o DNA.	16
Figura 3: Ilustração do modo de intercalação da amsacrina contra o complexo DNA-topoisomerase.	18
Figura 4: Representação do arcabouço da albumina do soro bovino.	20
Figura 5: Ilustração da afinidade de fármacos com a albumina.	25
Figura 6: Estrutura química do tiazol.	27
Figura 7: Estrutura química do anel indol.	28
Figura 8: Estrutura básica dos ligantes.	32
Figura 9: Docking da conformação dos ligantes 7d e 7h contra a estrutura da BSA.	34
Figura 10: Docking da conformação dos ligantes 7a, 7b, 7f e 7g contra a estrutura da BSA.	35
Figura 11: Docking da conformação dos ligantes 7c e 7e contra a estrutura da BSA.	36
Figura 12: Modos de interação dos derivados tiazóis contra a dupla fita do DNA.	38
Figura 13: Complexo formado entre a DNA-topoisomerase e o ligante 7d.	43
Figura 14: Complexo formado entre a DNA-topoisomerase e o ligante 7d.	43
Figura 15: (a) modo de ligação do composto 7a com a topo II [•] . (b) Interações do ligante 7a com os aminoácidos circundantes.	46
Figura 16: (a) modo de ligação do composto 7b com a topo II [•] . (b) Interações do ligante 7b com os aminoácidos circundantes.	47
Figura 17: (a) modo de ligação do composto 7c com a topo II [•] . (b) Interações do ligante 7c com os aminoácidos circundantes.	48
Figura 18: Ilustração dos complexos de DNA-topoisomerase com os derivados tiazóis representados em azul.	49
Figura 19: (a) modo de ligação do composto 7f com a topo II [•] . (b) Interações do ligante 7f com os aminoácidos circundantes.	50
Figura 20: (a) modo de ligação do composto 7g com a topo II [•] . (b) Interações do ligante 7g com os aminoácidos circundantes.	50
Figura 21: (a) modo de ligação do composto 7a com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7a com os aminoácidos circundantes.	60
Figura 22: (a) modo de ligação do composto 7b com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7b com os aminoácidos circundantes.	60
Figura 23: (a) modo de ligação do composto 7c com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7c com os aminoácidos circundantes.	61
Figura 24: (a) modo de ligação do composto 7e com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7e com os aminoácidos circundantes.	61
Figura 25: (a) modo de ligação do composto 7f com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7f com os aminoácidos circundantes.	62
Figura 26: (a) modo de ligação do composto 7g com a topo II ^U . (b) Interações do ligante 7g com os aminoácidos circundantes.	62

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
HSA	Albumina Sérica Humana
DNA	
Ade	Adenina
Gua	Guanina
Cit	Citosina
Tim	Timina
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção
ALA	Alanina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido aspártico
CYS	Cisteína
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutâmico
GLY	Glicina
HIS	Histidina
IC50	Concentração de inibitória de 50% de uma resposta
LEU	Leucina
MET	Metionina
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Desvio padrão quadrático médio
SER	Serina
TRP	Triptofano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 CÂNCER	13
2.2 TRATAMENTO DO CÂNCER.....	14
2.3 DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA O CÂNCER	15
2.4 INIBIÇÃO DA ENZIMA TOPOISOMERASE.....	17
2.5 ALBUMINA DO SORO BOVINO	18
2.6 INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE	21
2.7 DOCKING MOLECULAR	22
2.8 FARMACOCINÉTICA	24
2.8.1 ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS	24
2.8.2 REGRA DE 5 DE LIPINSKI E REGRA DE VEBER	26
2.9 NÚCLEOS DE INTERESSE.....	27
2.9.1 TIAZOL	27
2.9.2 INDOL	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 TRATAMENTO DO RECEPTOR	29
3.2 TRATAMENTO DOS LIGANTES	29
3.3 CÁLCULO DO GRID E DOCKING	30
3.3.1 ALBUMINA SÉRICA BOVINA	30
3.3.2 DNA.....	30
3.3.3 TOPO II ^U	31
3.3.4 TOPO II•.....	31
3.4 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 DOCKING COM A BSA	32
4.2 CÁLCULO DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPLEXOS DNA	36
4.3 INTERAÇÃO COM A ENZIMA TOPOISOMERASE	40
4.3.1 DOCKING COM A TOPO II ^U	41
4.3.2 DOCKING COM A TOPO II•	45
4.4 PREVISÃO ADMET	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6. REFERÊNCIAS	56
7. APÊNDICE	60

1. INTRODUÇÃO

Por se tratar da segunda maior causa de mortalidade no mundo, o câncer é uma doença que requer o desenvolvimento de fármacos que sejam mais eficazes no tratamento desta neoplasia maligna. Dentre os principais recursos terapêuticos para o tratamento do câncer destaca-se o tratamento cirúrgico, a quimioterapia e a radioterapia, em alguns casos é necessário a associação de mais de um recurso para garantir melhor eficácia no tratamento e redução dos efeitos colaterais já que as células cancerígenas são semelhantes as células saudáveis (INCA, 2018).

Moléculas com boa afinidade com ácidos nucleicos têm sido alvo de pesquisa para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, e isso se deve ao fato de muitos agentes citotóxicos interagirem com o DNA.(NUNES, 2015). Além disso, inibir a ação de enzimas que participam ativamente das funções biológicas das células, como a topoisomerase, é vista como um fator chave na direção de vários eventos que resultam em morte celular. Desta maneira a descoberta de novos agentes quimioterápicos anticancerígenos capazes de interagir com o DNA e inibir enzimas topoisomerasas é destacada na pesquisa anticâncer (ALMEIDA, et al., 2016). Porém para continuidade do processo de desenvolvimento de compostos com ação biológica é necessário que eles possuam boas características farmacocinéticas, que geralmente são avaliadas na etapa inicial do desenvolvimento de fármacos(NUNES, 2015).

Até a década de 1980 a principal metodologia de obtenção de novos fármacos era chamada de triagem cega. Essa metodologia tradicional consistia em testar de forma aleatória diversos compostos, em ensaios biológicos, sem nenhum conhecimento prévio sobre o mecanismo de ação receptor-ligante, exigindo dessa forma uma maior demanda de tempo e materiais, tornando o processo de obtenção de compostos candidatos a medicamentos de elevado custo. Este método também chamado de caixa preta tem sido substituído por métodos computacionais de modelagem molecular (RÓZ et al., 2015). Dessa forma muitas abordagens *in silico* foram desenvolvidas para otimizar o estudo do percurso dos compostos no corpo e sua interação com seus receptores.

Um dos grandes desafios para os métodos de docking está relacionado ao fato de não levar em consideração a flexibilidade molecular do receptor, devido à alta complexidade envolvida nesse processo, o que requer mais custos computacionais. Uma forma de otimização comum utilizada nos métodos de docking é utilizar grades de energia (GRID) que fica centrado no sítio ativo do alvo molecular, esse método torna o resultado muito mais preciso e diminui substancialmente o tempo de execução (MENG et al., 2011).

Logo, partindo do pressuposto que o câncer é um conjunto de doenças responsáveis pelo número elevado de mortalidade o objetivo desta pesquisa é avaliar teoricamente a interação de 8 derivados tiázois com a albumina bovina, o DNA e a enzima Topoisomerase II humana que são alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos.

1.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar o estudo computacional de docking molecular de compostos com potencial atividade antitumoral, e analisar sua interação com receptores biológicos e suas propriedades farmacocinéticas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

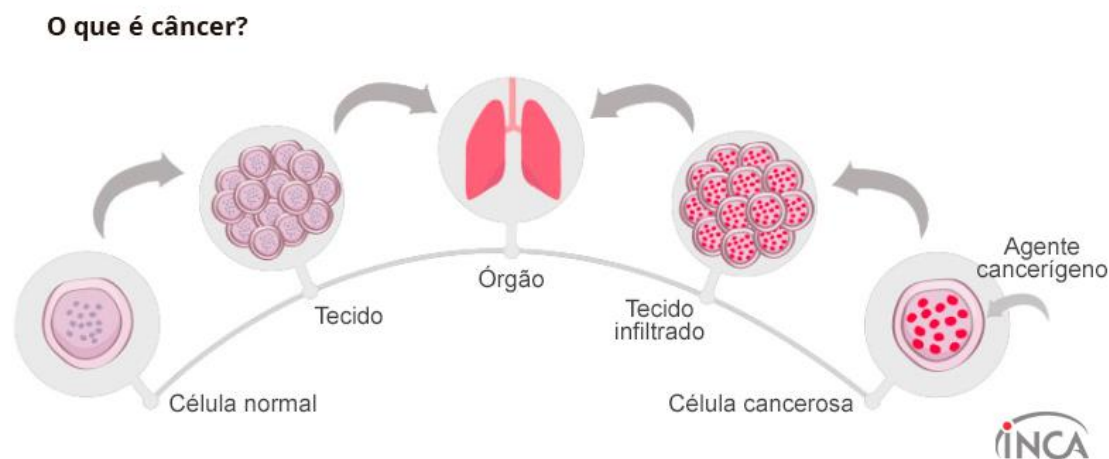
- Realizar o docking molecular dos compostos em estudo para estimar sua afinidade com o DNA;
- Avaliar a interação dos ligantes tiazóis contra a enzima topoisomerase II humana nas suas duas isoformas, II α e II β ;
- Observar os modos de ligação dos ligantes com a albumina do soro bovino e quais ligantes se ligam próximos ao resíduo de aminoácido de Trp-213;
- Analisar as principais interações intermoleculares para formação do complexo proteína-ligante;
- Estudar propriedades físico-químicas que afetam as características farmacocinéticas dos compostos.
- Prever propriedades farmacocinéticas das moléculas relacionadas com as etapas de absorção e distribuição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é um termo geral utilizado para designar um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado. Esta doença surge devido a uma modificação no DNA (INCA, 2018). O processo de divisão celular é regulado por diversos fatores de crescimento extracelulares, como as proteínas que levam a célula a dividir-se, o resultado é um equilíbrio entre o surgimento e a destruição das células, quando as proteínas de regulação sofrem algum dano, esse equilíbrio é interrompido, podendo acarretar no surgimento de um clone celular (células cancerígenas) que se divide rapidamente e de forma desregulada. Como consequência, estas células se agrupam e formam tumores que invadem os órgãos e tecidos, causando danos severos no organismo (NELSON e COX, 2014). A figura 1 ilustra o desenvolvimento de células cancerígenas.

Figura 1: Desenvolvimento celular de tumores sólidos.



Fonte: INCA, 2018.

Conforme apontado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), 1,2 milhão de novos casos da doença deve surgir no Brasil entre 2018 e 2019. Só no ano de 2018, é estimado que surgiram 582 mil novos casos, sendo 300 mil em homens e 282 mil em mulheres. Ainda segundo o estudo, em cada 10 casos, três estão relacionados ao estilo de vida que as pessoas levam. Hábitos como tabagismo, consumo de álcool, sedentarismo, obesidade e exposição excessiva ao sol aumentam as chances de incidência da doença (INCA, 2018).

Toda informação celular está contida no DNA, e por meio dele que os cromossomos passam toda informação necessária para o funcionamento da célula. O processo de formação do câncer é denominado carcinogênese. O surgimento ocorre quando os mecanismos de regulação que regulam os processos de divisão, localização e mortalidade da célula começam a falhar (NELSON e COX, 2014). Os genes que auxiliam no crescimento celular são denominados proto-oncogenes. Eles têm como função codificar proteínas reguladoras de crescimento, e quando sofrem mutação, transformam-se em oncogenes, genes mutantes de proteínas que regulam o ciclo celular, estão relacionados com o surgimento de células tumorais. A causa direta pode estar relacionada com hereditariedade, genes defeituosos podem ser herdados dos pais, ou também a exposição a compostos tóxicos e radiação que pode provocar mutações no DNA de uma célula saudável danificando-a. A exposição de uma única célula em um tecido a compostos carcinogênicos pode provocar um dano no DNA ocasionando irregularidades em uma de suas proteínas reguladoras, mas na maioria dos casos existem ambas as contribuições, hereditárias e ambientais (NELSON e COX, 2014). Por se tratar de um grave problema de saúde pública diversas terapias para o câncer foram desenvolvidas, que serão apontadas a seguir.

2.2 TRATAMENTO DO CÂNCER

Entre os principais métodos de tratamento para o câncer destacam-se a intervenção cirúrgica, a quimioterapia e a radioterapia. A quimioterapia é uma forma de tratamento na qual utiliza-se medicamentos para o controle do câncer, os agentes quimioterápicos têm por função destruir ou impedir o desenvolvimento de células cancerígenas. E a radioterapia é um tipo de tratamento no qual se utiliza radiações para destruir ou inibir o desenvolvimento das células tumorais, em um local onde ainda não ocorreu metástase, mas de forma geral melhores resultados são conseguidos quando ocorre associação de ambos os tratamentos (INCA, 2018).

Das formas de tratamentos citadas a quimioterapia é a que possui maior destaque como recurso terapêutico para o câncer, porém esse método ainda possui limitações e induz o surgimento de efeitos adversos. Além disso, existem diferentes tipos de câncer que requerem tratamentos específicos surgindo neste contexto a busca de novos agentes para terapia contra o câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

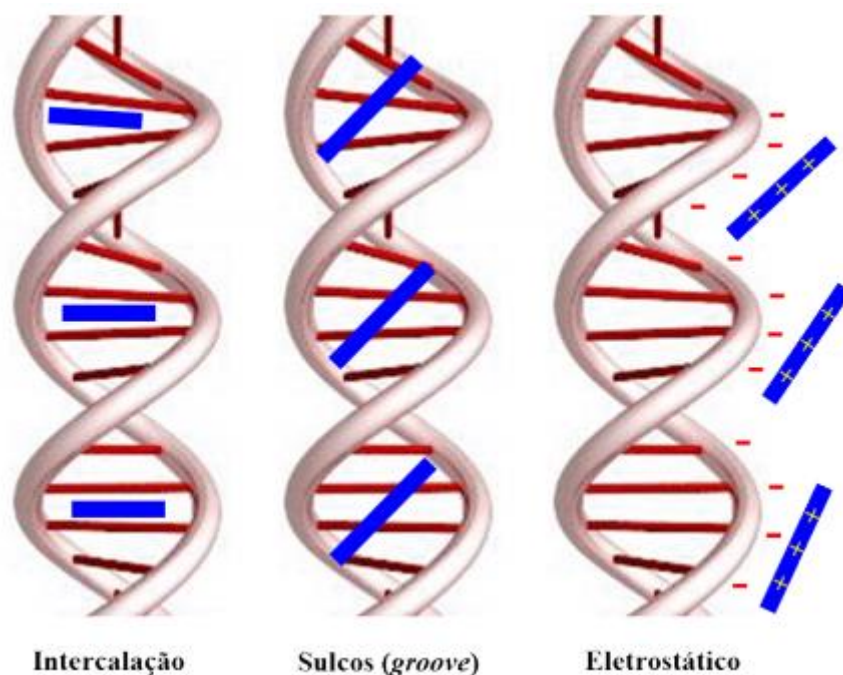
O processo de desenvolvimentos de drogas anticancerígenas é um grande desafio devido à grande complexidade envolvida no surgimento da doença e também ao fato de as células tumorais serem parecidas com as células normais. As principais informações que regem a busca de medicamentos anticâncer têm como ponto de partida o fato de que as células tumorais se replicam mais rapidamente que as normais, e também por se tratar de uma doença genética diretamente ligada com o processo de divisão celular, o DNA se torna um alvo terapêutico de grande importância. Logo compostos que possam interagir com o DNA e com enzimas que catalisam o processo de replicação, como as topoisomerases, são alvos importantes para drogas anticâncer (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

2.3 DNA COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA O CÂNCER

Considerando que o DNA é o local de ação de enzimas essenciais para a proliferação de células cancerígenas, como a topoisomerase, ligantes com boa afinidade com o DNA podem apresentar melhor potencial de inibição enzimática e consequentemente morte celular (GOUVEIA, *et al.*, 2018). Diversas pesquisas mostraram evidências concretas que o DNA é um alvo biológico promissor para novos agentes quimioterápicos promoverem resultados mais significativos e com menos efeitos adversos. Compostos que interagem com o DNA podem induzir a morte celular por apoptose (ALMEIDA, *etal.*, 2016).

As moléculas interagem com o DNA habitualmente de três formas, por meio de ligações eletrostáticas, intercalação e ligação em sulco (figura 2) (LAFAYETTE, *et al.*, 2013; ZHAO, *et al.*, 2013). Interações eletrostáticas são caracterizadas pela ligação externa de moléculas à dupla hélice de DNA carregada negativamente por meio de uma interação não específica. Na interação em sulco, os ligantes de direcionamento interagem com o DNA nas bordas da base do sulco principal ou do sulco menor. A intercalação é outro modo de ligação ao DNA que está intimamente relacionado com a atividade antitumoral de muitos agentes anticancerígenos (ZHAO, *et al.*, 2013).

Figura 2: Modos de interação de compostos com o DNA.



Fonte: SILVA, 2016.

A intercalação é um processo no qual um composto aromático se insere entre os pares de bases do DNA, resultando na formação de um complexo ligante-DNA, onde o complexo é estabilizado por forças intermoleculares de diferentes tipos. A inserção de um intercalador provoca mudanças na estrutura molecular do DNA. Os ângulos de torção das ligações fosfodiéster são alterados causando uma separação entre os pares de bases no sítio de ligação. Essa ideia sugere que as modificações provocadas pelos agentes intercaladores atuam diretamente no processo de replicação celular inibindo o desenvolvimento de neoplasias malignas e provocando morte celular (BARRA E NETO, 2015).

Os compostos que conseguem intercalar com os pares de bases do DNA possuem algumas características estruturais comuns como a presença de fragmentos poliaromáticos planos (LAFAYETTE, et al., 2013) que permitem que esses compostos com estas características se insiram entre os pares de bases da hélice do DNA, como por exemplo, compostos derivados de espiroacridina (GOUVEIA, et al., 2018), derivados piridínicos (ZHAO, et al., 2017), e ligantes contendo fragmentos com anel indol como os ligantes empregados neste estudo.

2.4 INIBIÇÃO DA ENZIMA TOPOISOMERASE

As topoisomerasas são enzimas importantes para a proliferação e sobrevivência celular, pois estão envolvidas durante o processo de replicação e empacotamento do DNA tanto em células eucariontes como em células procariontes. Estas enzimas alteram a topologia do DNA aliviando a tensão associada ao superenrolamento de DNA. Elas catalisam a quebra das ligações entre os nucleotídeos em um processo reversível, modificando o número de ligações no DNA (GOUVEIA, *et al.*, 2018). Para modificar esta propriedade as topoisomerasas realizam a clivagem da dupla fita da molécula de DNA por meio de uma reação de transesterificação, um par de tirosinas presentes no sítio catalítico inicia reação atacando duas ligações fosfodiéster escalonadas de 4 pares de bases em cadeias de DNA opostas, clivando-a resultando na formação de duas ligações covalentes fosfotirosil entre a enzima e o DNA permitindo que as hélices duplas de DNA passem umas pelas outras. Esta passagem do duplex no ponto de clivagem permite a resolução de emaranhados de DNA que surgem de transações do DNA celular, incluindo os processos de replicação, transcrição, segregação de cromossomos e recombinação (CHEN, *et al.*, 2018; NELSON e COX, 2014; POMMIER, 2009).

Estas enzimas são classificadas em dois tipos de acordo com seu mecanismo de ação, as topoisomerasas I, induz a clivagem em uma fita do DNA e a topoisomerase II (que pode ser tanto alfa como beta) proporciona a clivagem na dupla fita do DNA, elas possuem a função de relaxar o DNA supertorcido (NELSON e COX, 2014).

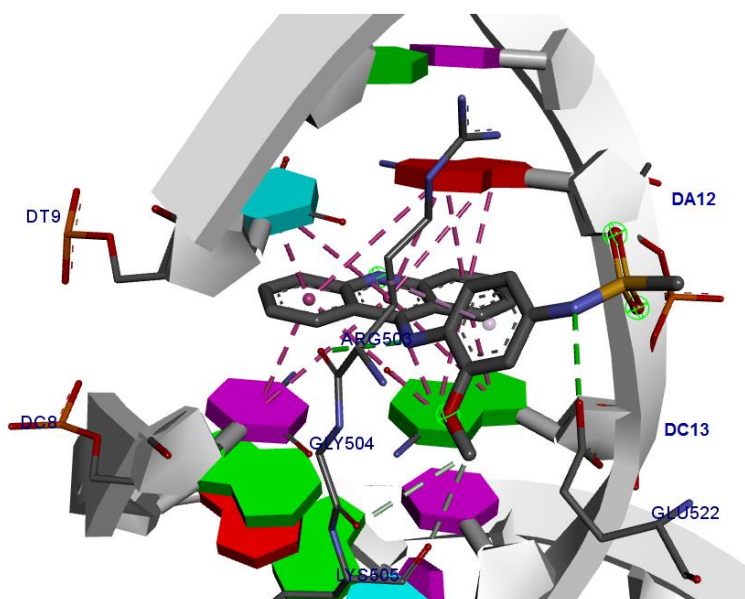
Sem as topoisomerasas as células não podem se replicar e expressar seus genes e morrem, logo o desenvolvimento de compostos inibidores da topoisomerase se tornaram agentes farmacêuticos importantes no tratamento de tumores malignos. As topoisomerasas do tipo II humanas são alvos de grande número de medicamentos anticâncer, eficazes contra vários tipos de tumores, que incluem a doxorubicina, etoposídeo e elipticina. A maior parte desses medicamentos estabiliza o complexo covalente topoisomerase-DNA (clivado) (AREPALLI, *et al.*, 2018).

Compostos direcionados a Topo II podem ser separados em duas classes. Os venenos de topoisomerase, compostos que estabilizam o complexo DNA-topoisomerase, eles atuam promovendo um aumento da atividade enzimática multiplicando o número de clivagens no DNA formando uma maior quantidade de fragmentos prejudicando o metabolismo celular. E os inibidores catalíticos, essa classe de compostos inibi a atividade catalítica da enzima sem aumentar os números de complexos covalentes da Topo II (IBRAHIM, *et al.*, 2018).

Como geralmente nas células tumorais estas enzimas estão presentes em um número muito elevado, os inibidores das topoisomerases causam muito mais dano aos tumores malignos do que nos outros tecidos, com base nessa informação vários fármacos usados na quimioterapia de neoplasias malignas são inibidores das topoisomerases do tipo II, permitindo que estas enzimas promovam a clivagem da cadeia, mas inibindo a formação de novas ligações nos pontos das quebra(MURUGAVEL, et al., 2018).

Um exemplo de agente intercalador é a amsacrina, um derivado de anilinoacridina usado para tratar uma ampla variedade de cânceres, incluindo leucemia e linfomas, este fármaco foi um dos primeiros agentes de intercalação de DNA a ser considerado como um inibidor da topoisomerase II. A atividade biológica desse composto é atribuída ao seu núcleo tricíclico plano, que consegue se inserir entre os pares de bases dos DNA.

Figura 3: Ilustração do modo de intercalação da amsacrina contra o complexo DNA-topoisomerase.



Fonte: Discovery Studio 2017.

2.5 ALBUMINA DO SORO BOVINO

Outros receptores biológicos são utilizados para estabelecer o perfil de ligação de compostos com proteínas, um dos receptores mais empregados para esta finalidade é a albumina do soro bovino devido à sua disponibilidade e facilidade de avaliar

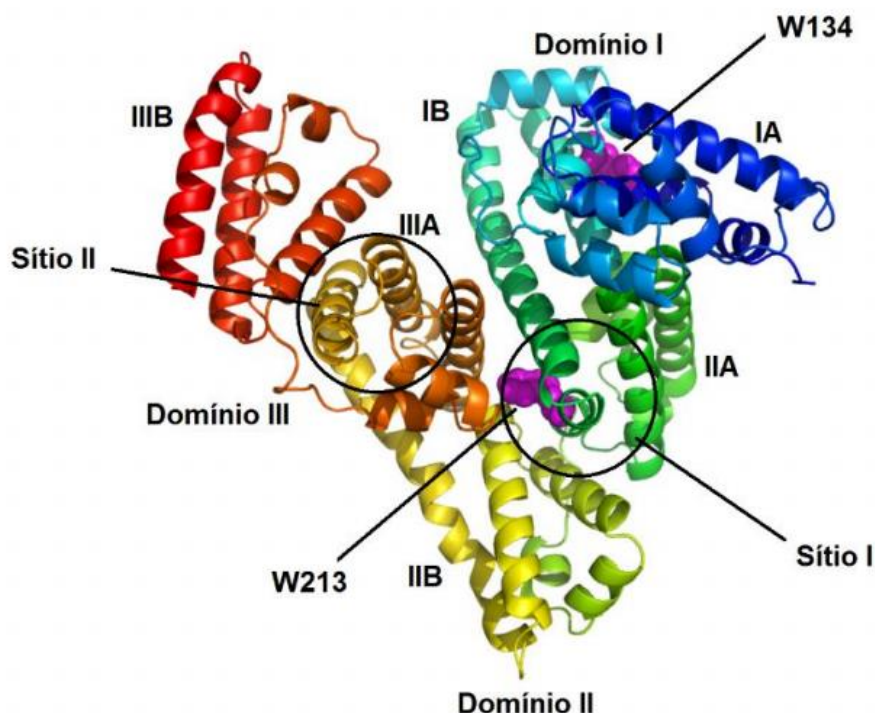
experimentalmente a formação do complexo albumina-ligante por meio de técnicas de fluorescência.

A albumina do soro bovino (do inglês *bovineserumalbumin*, BSA) é a proteína mais abundante no plasma e possui uma estrutura semelhante à albumina de soro humana (do inglês *humanserumalbumin*, HSA), desta forma as albuminas séricas bovinas são muito utilizadas em testes biológicos devido também a sua disponibilidade e menor custo em relação à HSA. As albuminas são uma classe de proteína importante, pois auxilia no transporte e distribuição de substâncias endógenas, ou exógenas como fármacos. Antes de chegarem ao seu local de ação os fármacos se combinam com as albuminas (TENG et al., 2011). A afinidade de medicamentos com a albumina afeta sua farmacocinética. Embora seja desejável afinidade de fármacos com as proteínas do soro, uma alta afinidade reduz a concentração e distribuição dos princípios ativos dos medicamentos no organismo e facilitam sua eliminação (LAMATTINA e GOLAN., 2009).

As estruturas das albuminas têm sido determinadas por técnicas de cristalografia podendo desta forma identificar seus sítios de ligação com outras moléculas.

A albumina do soro bovino é composta por 582 aminoácidos, sendo 20 grupos de tirosina e dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 e Trp-212, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente. Essas regiões são classificadas em três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B (SHU et al., 2014). As regiões responsáveis pelo armazenamento de compostos nas albuminas estão encontradas em dois bolsões hidrofóbicos localizados nos subdomínios IIA e IIIA, e são conhecidas como sítios I e II de Sudlow (figura 4) (SILVA et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; SHU et al., 2014).

Figura 4: Representação do arcabouço da albumina do soro bovino.



Fonte: <http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1744/1/Intera%C3%A7%C3%A3o%20in%20vitro%20entre%20compostos%20organicos%20de%20Arsenio%20V%20e%20proteina%20carreadora.pdf>

A interação entre a BSA com diversos ligantes tem sido estudada por métodos computacionais. TENG et al (2011) conduziram o estudo sobre a interação entre a BSA e o ligante 4-aminoantipirina revelando que a interação entre o receptor e o ligante se dá principalmente por forças eletrostáticas. SHU e colaboradores (2014) utilizaram métodos de docking para analisar a interação da BSA com o ácido érucico, revelando que este ligante tem afinidade de ligação do tipo hidrofóbica com a proteína.

Muitos ligantes se ligam especificamente à albumina sérica, devido ao fato de possuírem características levemente ácidas, eletronegativas e possuírem fragmentos apolares que podem se ligar nos bolsões hidrofóbicos presentes nos sítios de ligação da proteína como, por exemplo, a warfarina e fenilbutazona, que interagem com o sítio I (subdomínio IIA), e o ácido flufenâmico (FA) e ibuprofeno com o sítio II (subdomínio IIIB) (TENG et al., 2011).

Conhecer o sítio de ligação de fármacos com as albumina é importante, pois nos fármacos somente a fração livre do fármaco desempenha sua ação farmacológica. A warfarina, por exemplo, é um fármaco classe I, pois sua fração ligada as albuminas é de 99%, a fração livre representa apenas 1%, desta forma se este medicamento for administrado junto com outro fármaco que tenham afinidade pelos mesmos locais de ligação ele pode interagir

com a warfarina e deslocá-la aumentando sua fração livre podendo ocasionar efeitos tóxicos e farmacológicos indesejados.

2.6 INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE

Estudos sobre a especificidade das enzimas levaram a Emil Fischer em 1984 propor a ideia de que as enzimas eram estruturalmente complementares a seus substratos, assim se encaixariam de forma específica como uma chave em uma fechadura (NELSON e COX, 2014). Essa ideia de complementaridade foi aplicada também para interações entre fármacos e seus receptores. Porém o modelo chave-fechadura induz a pensar que as proteínas e os ligantes são entidades rígidas, não levando em consideração a flexibilidade molecular. É sabido que tanto as proteínas como os ligantes podem adquirir diversas conformações durante a interação. Uma das teorias que explica este fato é a teoria do encaixe induzido, essa teoria considera que durante a interação, o receptor biológico pode reconhecer diversas conformações do ligante dentro do sítio de ligação (VERLI e BARREIRO, 2005).

As proteínas são macromoléculas que exercem diversas funções biológicas, e realizam suas funções biológicas por meio da interação com outras moléculas denominada ligantes (fármacos, metais, moléculas do solvente) e também com outras macromoléculas tais como lipídios, peptídeos, ácidos nucleicos e outras proteínas (LIU et al., 2016). Por isso o estudo da interação entre proteína-ligante é de extrema importância para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos.

A interação entre uma proteína e um determinado ligante resulta na formação de um complexo proteína-ligante, desde que o ligante possua grande afinidade e especificidade de ligação com a proteína. A afinidade e especificidade entre o receptor e o ligante são dados por interações intermoleculares dentre as quais estão, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, π - π , interações iônicas ou eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV, FIORUCCI, TENNIKOVA, 2016). As ligações de hidrogênio são interações muito importantes que ocorrem em sistemas biológicos e são responsáveis por manter a estrutura das proteínas, e as ligações covalentes em sistemas biológicos são de elevada energia, e raramente são desfeitas, os fármacos que interagem por meio de ligações covalentes inativam o sítio receptor ou inibem completamente a ação das enzimas (BARREIRO e FRAGA, 2015).

Complexos onde o ligante possui alta afinidade com o sítio ativo do bioreceptor apresentam as seguintes características: alto nível de complementaridade estérica entre o

ligante e o sítio ativo; alta complementaridade de propriedades associadas às superfícies de contato entre proteína e o ligante; ligação com conformação favorável em termos de energia; baixas interações repulsivas entre proteína e ligante (COUTINHO e MORGON, 2007).

Uma maneira de avaliar a interação de potenciais agentes farmacêuticos contra proteínas ou outros tipos de receptores biológicos de forma rápida é por meio de métodos computacionais, como o método de docking que será abordado a seguir.

2.7 DOCKING MOLECULAR

O emprego de métodos computacionais para o reconhecimento a nível molecular da interação proteína-ligante é uma ferramenta importante para descoberta de novos fármacos, pois permitem analisar moléculas capazes de se ligar a determinados sítios receptores proporcionando diminuição de tempo e custo que estão relacionados no processo de desenvolvimento de novos medicamentos (COUTINHO e MORGON 2007).

Os métodos de docking molecular para investigar a afinidade de ligação de moléculas com atividade biológica com seus receptores são compostos por dois componentes principais: o algoritmo de busca e a função de avaliação, responsáveis respectivamente por pesquisar diferentes conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo; e responsável por estimar as afinidades de ligação das conformações geradas, classificando-as e identificando o(s) modo(s) de ligação mais favorável do ligante ao receptor, que é caracterizado pelo pela formação do complexo com menor energia (COUTINHO e MORGON 2007).

Os métodos de docking identificam o comportamento a nível atômico de uma molécula dentro do sítio ativo de uma proteína caracterizando a conformação e orientação do ligante no sítio ativo e estimando a afinidade de ligação. Conhecer a localização do sítio de ligação antes dos processos de encaixe aumenta significativamente a eficiência do encaixe. Em muitos casos, o sítio de ligação é realmente conhecido antes de acoplar ligantes nele (MENG et al., 2011). O objetivo principal dos estudos de docking é obter diferentes conformações do modo de ligação do ligante dentro sítio ativo do receptor, e na quantificação da energia de ligação entre o complexo receptor-ligante (KITCHEN et al., 2004).

Devido ao avanço da biologia molecular e o desenvolvimento de métodos de purificação de proteínas, cristalografia de raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, os métodos de docking tornaram-se uma ferramenta muito importante para descoberta de novos medicamentos. Com o avanço dessas técnicas foi possível conhecer de forma detalhada a estrutura de diversos receptores biológicos. Atualmente existem

muitos bancos de dados de estruturas biológicas, como o protein data bank (PDB), onde estão ilustradas estruturas 3D de proteínas e ácidos nucleicos com acesso disponível para o público (MENG et al., 2011)

O processo de reconhecimento molecular é bastante complexo e durante esse processo tanto o receptor quanto o ligante sofrem mudanças conformacionais que devem ser consideradas pelos algoritmos de docking (COUTINHO e MORGON 2007). Geralmente moléculas menores possuem várias conformações de baixa energia, dessa forma os algoritmos utilizados em programas de docking tornaram-se mais elaborados levando em consideração a flexibilidade do ligante, contribuindo assim com a qualidade e precisão do método (RODRIGUES et al., 2012).

O programa Autodock4.2.6 foi empregado neste estudo devido ao fato de ser muito utilizado e apresentar resultados satisfatórios quando se compara dados *in silico* com os dados experimentais. Ele utiliza ocaixasô (*grid*), geradas pelo programa AutoGrid 4.0, que tem a função de reduzir o custo computacional. Para a construção dessa grade de energia, é realizado um pré-cálculo da energia de interação entre os átomos do ligante e do receptor, para posteriormente serem utilizados pelo programa AutoDock para a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante (COUTINHO e MORGON 2007; KITCHEN et al., 2004).

A energia de ligação obtida após o cálculo pelo programa Autodock refere-se à diferença entre as energias do ligante e da proteína isolados, e a energia do complexo proteína-ligante formado após a realização do docking. Para mensurar a energia livre de ligação inicialmente é prevista a variação da energia intramolecular das moléculas isoladas, em seguida é avaliada a variação de energia intermolecular resultante da formação do complexo proteína-ligante. O campo de força inclui seis termos de interação entre pares de átomos e uma estimativa da entropia conformacional perdida durante a ligação (ΔS_{conf}) como descrito na equação 1 (HUEY, et al., 2007).

$$\Delta G_{Lig-Pro} = (G_{Lig-Pro}^{complexado} - G_{Lig-Pro}^{isolado}) + (G_{Pro}^{complexado} - G_{Pro}^{isolado}) + (G_{Lig-Pro}^{intermolecular} - G_{Lig-Pro}^{intramolecular} + \Delta S_{conf})$$

Onde L se refere ao ligante, e P se refere à proteína. O primeiro termo entre parênteses corresponde às energias intramoleculares para os estados complexado e isolado do ligante, e os termos do segundo parênteses são as energias intramoleculares para os estados complexado e isolado da proteína. A variação de energia em função das interações intermoleculares entre os estados complexado e isolado está descrita no terceiro parênteses.

2.8 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética, que é o ramo da farmacologia que estuda o percurso do fármaco no corpo, constitui um dos principais problemas no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos. A análise do perfil farmacocinético dos compostos é crucial para garantir a eficácia do medicamento, pois define as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (PIRES, BLUNDELL & ASCHER, 2015).

2.8.1 ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS

Mesmo apresentando alto potencial terapêutico se o fármaco não chegar em seu alvo em uma concentração suficiente para desenvolver seu efeito farmacológico ele irá falhar. Todos os compostos com ação farmacológica devem satisfazer exigências mínimas para ser bem-sucedidos como, por exemplo, atravessar as barreiras biológicas. Todas as células humanas são constituídas por uma membrana de dupla camada lipídica composta por moléculas anfifílicas como os fosfolipídios e o colesterol. Moléculas pequenas e pouco polares conseguem atravessar facilmente essa barreira, no entanto fármacos com alto peso molecular e alta polaridade não consegue transpor a membrana (LAMATTINA e GOLAN., 2009).

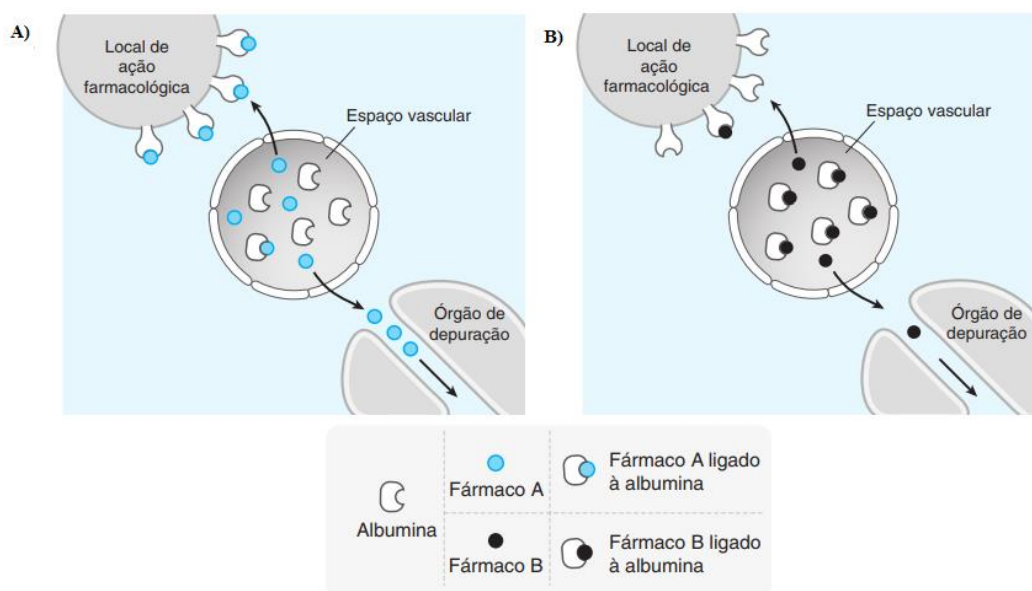
As propriedades físico-químicas dos fármacos estão diretamente relacionadas com as etapas de farmacocinéticas. A primeira etapa farmacocinética é a absorção. Esta é a etapa em que o fármaco entra direta ou indiretamente no plasma, muitos fatores influenciam na etapa de absorção, como a lipofilicidade e solubilidade aquosa, pois é necessário um equilíbrio entre estas propriedades já que os fármacos devem ser solúveis para se dissolver nos fluidos corporais, mas um fármaco muito hidrofílico não é bem absorvido devido à impossibilidade de atravessar as membranas celulares. A solubilidade dos compostos é aumentada com a presença de grupos ionizáveis e é inversamente proporcional ao peso molecular e a lipofilicidade (GONÇALVES, et al.,2016). O peso molecular afeta diretamente a farmacocinética, pois um composto com alto peso molecular é menos propenso a chegar no local de ação e ser absorvido pelo organismo (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018), e um composto altamente lipossolúvel apresenta uma absorção ou permeação baixa (NAIDU e SUNEETHA, 2014).

Nos últimos anos o emprego de células extraídas do adenocarcinoma do cólon humano, as células Caco-2 têm sido muito empregadas em ensaios biológicos para medir a

permeação e absorção de fármacos. Estas células são empregadas pela indústria farmacêutica na pesquisa de moléculas com potencial terapêutico, pois possibilitam prever sua absorção *in vivo* contribuindo para triagem de moléculas previamente aos estudos pré-clínicos (SOUZA, FREITAS & STORPIRTIS, 2007).

A etapa de distribuição de fármacos é a etapa na qual o fármaco passa do sistema vascular para o líquido extracelular onde se distribui para os órgãos e tecidos. Essa etapa depende de muitos fatores, como a ligação as proteínas plasmáticas, lipofilicidade, permeabilidade capilar e o fluxo sanguíneo. A ligação às proteínas plasmáticas indica a fração livre, fração do fármaco que irá desempenhar a ação farmacológica, e a fração ligada, fração que forma o complexo com as proteínas séricas. A ligação de fármacos com as proteínas plasmáticas não é seletiva e eles podem competir com outros fármacos por locais de ligação nas proteínas plasmáticas. Um fármaco pode deslocar outro fármaco da sua ligação na proteína e isso é um fator importante nas interações medicamentosas. O complexo fármaco-proteína resultado da ligação do fármaco com as albuminas séricas impossibilita a passagem do fármaco do espaço vascular para o seu alvo biológico ou para os tecidos circundantes (figura 5) (LAMATTINA e GOLAN.,2009).

Figura 5: Ilustração da afinidade de fármacos com a albumina.



A) Fármacos com baixa afinidade com as albuminas sobre rápida difusão, resultando numa alta concentração de fármaco livre e consequentemente uma alta taxa de eliminação podendo ser eliminado precocemente. **B)** Por outro lado um fármaco ligado fortemente as albuminas necessita de uma maior dose ingerida para aumentar sua concentração plasmática.

Fonte: LAMATTINA e GOLAN, 2009.

Os fármacos lipossolúveis conseguem atravessar a estrutura capilar dos órgãos, principalmente órgãos com estruturas capilares contínuas e sem aberturas, como por exemplo, o cérebro. Para ser transportado ativamente para o cérebro o fármaco precisa permear a estrutura capilar das células endoteliais do sistema nervoso central (SNC), logo para se dissolver nas membranas das células endoteliais o fármaco precisa ser lipossolúvel. O fluxo de sangue no local de absorção também é um fator de influência, pois órgãos com maior fluxo de sangue como, por exemplo, o intestino, são capazes de absorver melhor os fármacos (WHALEN, FINKEL e PANAVELIL, 2016).

2.8.2 REGRA DE 5 DE LIPINSKI E REGRA DE VEBER

A regra de Lipinski é um método importante para avaliar a drug-likeness de forma rápida e eficiente. Os parâmetros desta regra tornaram-se amplamente utilizadas e sua aceitação pode ser atribuída a vários fatores: são parâmetros simples, rápidos e possuem baixos custos para usar. As regras são um padrão de referência amplamente utilizado e são baseadas em pesquisa, documentação e justificativa sólidas, além de funcionar de forma eficaz permitindo avaliar as propriedades farmacocinéticas dos compostos. Os compostos que obedecem a essas regras tem maior probabilidade de serem absorvidos pelo organismo após a ingestão oral. As propriedades associadas às regras de Lipinski são determinadas a partir do exame da estrutura e utilizando softwares que estão disponíveis amplamente (KERNS, 2008).

A regra de Lipinski diz que um composto pode apresentar má absorção ou permeação pelo organismo se tiver um peso molecular superior a 500 g mol^{-1} ; sua lipofilicidade expressa como cLogP maior que 5 (ou o MLogP acima de 4,15); N° de grupos aceptores de hidrogênio maior que 10 (expressos como a soma de átomos de N e O); e número de grupos doadores de hidrogênio maior que 5 (expressos como a soma de grupamentos OH e NH); estes parâmetros ficaram conhecidos com a regra dos cinco devido ao fato de os valores das propriedades serem múltiplos de cinco (LIPINSKI et al., 2012).

Regras adicionais foram propostas por Veber e colaboradores. Eles procuraram investigar quais propriedades estruturais aumentavam a biodisponibilidade oral em ratos. Eles concluíram que a flexibilidade molecular, área de superfície polar (ASP) e o número de ligações de hidrogênio são características determinantes da biodisponibilidade oral. Esses parâmetros também são simples de identificar, as ligações rotacionáveis e o número de átomos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio podem ser contados visualmente ou usando software. A ASP é calculada via software. As regras de Veber para uma boa

biodisponibilidade oral em ratos são as seguintes: os compostos devem apresentar no máximo 10 ligações rotacionáveis; ASP menor ou igual a $140 \text{ \AA}^2$; ou no máximo um total de 12 ligações de hidrogênio (aceitadores mais doadores) (KERN, 2008).

2.9 NÚCLEOS DE INTERESSE

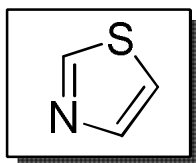
A síntese de compostos contendo mais de um núcleo aromático classificado como bis-intercaladores está despertando o interesse de muitos pesquisadores quando o alvo biológico é o DNA ou enzimas que participam de forma ativa nos processos celulares. Ligantes bis-intercaladores apresentam potencial de interagir com um maior número de pares de bases nitrogenadas, formando complexos mais estáveis com maior especificidade e afinidade com o DNA (BARRA e NETO, 2015).

Os ligantes empregados nesse estudo possuem vários grupos cromóforos destacando-se o núcleo tiazolidínico e a presença do anel indol, ambos os núcleos de grande interesse para química medicinal.

2.9.1 TIAZOL

Compostos contendo anéis heterocíclicos recebem atenção especial na química medicinal pelo fato de possuir efeitos biológicos comprovados em muitas pesquisas. Os tiazóis são compostos que possuem um anel heterocíclico de cinco membros contendo um átomo de Nitrogênio e um átomo de Enxofre (figura 6). O núcleo tiazolidínico presente em muitos compostos tem sido relatado por ser responsável pela maior parte das ações farmacológicas relacionadas com os seus compostos análogos estruturais, como por exemplo, atividade anti-câncer, anti-inflamatória, anti-bacteriana, entre outras (ROMAGNOLI et al., 2013).

Figura 6: Estrutura química do tiazol.

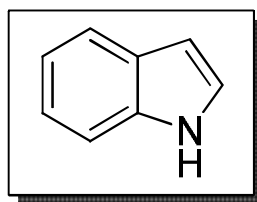


Fonte: Elaboração própria.

2.9.2 INDOL

O indol é um composto aromático heterocíclico (figura 7), e seus compostos análogos têm sido relatados na literatura pela sua atividade antitumoral para muitas linhagens de células cancerígenas (ELSAYED, et al., 2015). Oliveira e colaboradores (2017) sintetizaram uma série de compostos derivados do 4-tiazolidinonas e avaliaram sua atividade antiproliferativa em oito linhagens de células tumorais, além da interação desses compostos com o DNA e capacidade de inibição da enzima topoisomerase humana. Yan, et al (2016) realizaram síntese e avaliação biológica de derivados cíclico-indólicos como agentes antitumorais via inibição da polimerização da tubulina. Entre todos os derivados sintetizados, o composto 20 exibiu a atividade antiproliferativa mais potente com valores IC_{50} de 22-56 nM contra sete linhagens de células cancerosas, e inibição da polimerização da tubulina ($IC_{50} = 0,15 \pm 0,07 \mu M$), que tiveram resultados bem promissores, melhores do que do composto de referência Combretastatina A-4. Zhang e colaboradores (2016) realizaram síntese e avaliação biológica de derivados de lapachol com arcabouço de indol e entre os compostos analisado o 4n apresentou a melhor atividade antiproliferativa com valores de IC_{50} de $5,08 \times 10^{-6} M$ e $6,77 \times 10^{-6} M$ contra as linhagens celulares Eca109 e Hela e apresentou um ótimo potencial para inibição da topoisomerase I.

Figura 7: Estrutura química do anel indol.



Fonte: Elaboração própria.

3. METODOLOGIA

Buscou-se a estrutura cristalográfica dos receptores biológicos empregados nesse estudo, albumina do soro bovino (BSA), Topoisomerase IIhumana (alfa e beta), e o DNA no banco de dados *protein data base* (PDB).

- I. Foi obtido o cristal da BSA em complexo com o ácido 3,5-diiodosalicílico, ID: 4JK4, com resolução de 2,56 Å.
- II. Foi obtida a estrutura cristalográfica da enzima TOPO II α em complexo com o DNA e o fármaco etoposídeo, ID: 5GWK, resolução de 3,152 Å,
- III. Foi obtido o cristal da TOPO II β em complexo com o DNA e a amsacrina ID: 4G0U, resolução de 2,7 Å.
- IV. A estrutura do DNA foi obtida com o código, ID: 1BNA, resolução 1,9 Å.

3.1 TRATAMENTO DO RECEPTOR

Inicialmente no programa Discovery Studio 2017, foram removidos os ligantes de naproxeno, etoposídeo e amsacrina da BSA, TOPO II α e da TOPO II β , nessa ordem; Depois da remoção dos ligantes da estrutura cristalizada dos complexos todos os receptores foram tratados seguindo os mesmos métodos descritos a seguir. Com o programa Discovery Studio 2017, foram removidas as moléculas de água da estrutura cristalográfica dos receptores. A adição de átomos de hidrogênio polares e as cargas de Kollman foi realizada com o auxílio do programa AutoDockToolsv.1.5.6.

3.2 TRATAMENTO DOS LIGANTES

Os oito ligantestiazóis foram desenhados no programa ChemDraw Ultra 12.0 e salvos no formato adequado para pré-otimização utilizando o método MMFF94, a partir do programa Avogadro. A escolha do melhor método de otimização molecular é um passo crucial que determina a confiabilidade dos resultados obtidos, visto que seja necessária uma garantia de que as estruturas químicas otimizadas apresentem a menor energia possível e consequentemente apresentem a conformação molecular mais estável. Após a pré-otimização no Avogadro foi criado um input *mop* para otimização no programa Mopac2016 no nível PM6 pois é um método semi-empírico que descreve bem moléculas orgânicas. O arquivo

mop foi otimizado no Mopac2016 e o arquivo *out* gerado após a otimização no Mopac2016 foi aberto novamente no programa Avogadro e salvo no formato *pdb*. No programa AutoDockToolsv.1.5.6 foi aberto os ligantes *pdb* removidos os hidrogênios apolares computado às cargas de Gasteiger e posteriormente todos os ligantes foram salvos no formato *pdbqt*.

3.3 CÁLCULO DO GRID E DOCKING

Os arquivos *dpf* foram criados para a análises de docking do algoritmo genético Lamarckiano. Cada cálculo de docking foi processado com 100 conformações e foram realizados no Laboratório de Simulação Computacional (LaSC), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A descrição do tamanho e coordenadas dos GRIDS criados para cada receptor estão descritas a seguir.

3.3.1 ALBUMINNA SÉRICA BOVINA

Para realização do cálculo de docking o tamanho do *grid* foi ajustado de modo a incluir o sítio de ligação da proteína, com base no fato que os dois principais sítios de ligação na BSA estão localizados nas proximidades de Trp134 e Trp213, desta forma o docking foi processado com a configuração dos tamanhos de grade 90x90x90 ao longo dos eixos x, y e z, com espaçamento de 0,375 Å (valor padrão), dimensões suficientes para cobrir todos os resíduos ativos dos dois locais de ligação abundantemente reportados correspondentes ao Trp134 e Trp213. O centro da grade nos eixos X, Y e Z, foi definido como 35.891, 24.195 e 35.381 Å.

3.3.2 DNA

Os ácidos nucleicos são estruturalmente diferentes das proteínas e não possuem um sítio de ativo definido de ligação, logo para a analisar as interações dos ligantes com o DNA foi criada uma caixa para englobar toda a estrutura do DNA. O docking foi processado com as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z de: 90x90x90 Å, e o espaçamento do *grid* foi de 0,375 Å, o centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 14.779, 20.976 e 8.804 Å.

3.3.3 TOPO II^U

Conhecido o sítio ativo da enzima o cálculo de docking foi processado com as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z de: 60x60x60 Å, espaçamento padrão (valor de 0,375 Å), o centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 24.5, -38,148, -59,54 Å.

3.3.4 TOPO II•

Conhecido o sítio de ativo da topoisomerase o docking foi processado com as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z de: 78x82x64 Å, e o espaçamento do *grid* foi de 0,375 Å, O centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 27.396, 103.004 e 36.245Å.

3.4 ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

A observação das principais interações dos compostos em estudo com os resíduos da BSA e TOPO II e o DNA foi feita através do programa Discovery Studio 2017.

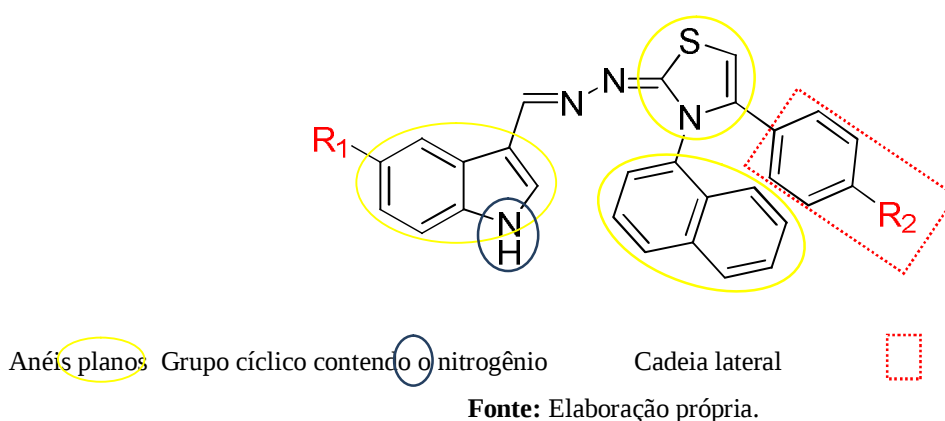
Para avaliação das propriedades físico-químicas e das propriedades farmacocinéticas a estrutura tridimensional dos 8 ligantes analisados neste estudo foi traduzido para o formato SMILES. O formato SMILES desses compostos foi processado usando as ferramentas online pkCSM e SwissADME. Disponível respectivamente em:

http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction/adme_1531024248.18/; <http://www.swissadme.ch/index.php>.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados tiazóis empregados neste estudo possuem atividade antitumoral e foram sintetizados no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LqIT) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Estes compostos compartilham características estruturais essenciais de venenos de topoisomerase (figura 8), a presença de um sistema poli aromático plano, uma espécie catiônica que pode ser um grupo heterocíclico contendo um átomo de nitrogênio, e uma cadeia lateral que possa interagir com o sulco do DNA (IBRAHIM, et al, 2018).

Figura 8: Estrutura básica dos ligantes.



Foi realizado o estudo teórico para prever a atividade destes compostos com diferentes receptores biológicos. Para avaliar a afinidade destes ligantes com proteínas, foi analisado a interação dos mesmos com a BSA, proteína com função de transporte e armazenamento de fármacos, também foi previsto o modo de interação destes ligantes com o DNA e a capacidade de intercalação dos ligantes com a enzima topoisomerase II complexada com o DNA. Foram previstas 100 conformações possíveis entre os receptores empregados no estudo e os 8 ligantes.

4.1 DOCKING COM A BSA

Por se tratar de uma proteína modelo para avaliar a afinidade de fármacos com proteínas foi escolhida a albumina do soro bovino para realização do estudo de *docking*, a albumina possui fluorescência intrínseca devido à presença dos resíduos de aminoácidos de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). O resíduo Trp da BSA tem a mais forte intensidade de fluorescência, sendo sensível às mudanças em torno do seu micro-ambiente, permitindo desta forma avaliar a interação de ligação dos ligantes com a BSA (LOU et.,

2017), portanto compostos que se ligam próximos aos resíduos de triptofano podem ser detectados em ensaios de fluorescência. Desta forma analisou-se por meio de docking a afinidade de ligação e as principais interações intermoleculares que ocorrem para formação do complexo BSA-ligante. Os resultados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo albumina-derivado, selecionado após o estudo de *docking*.

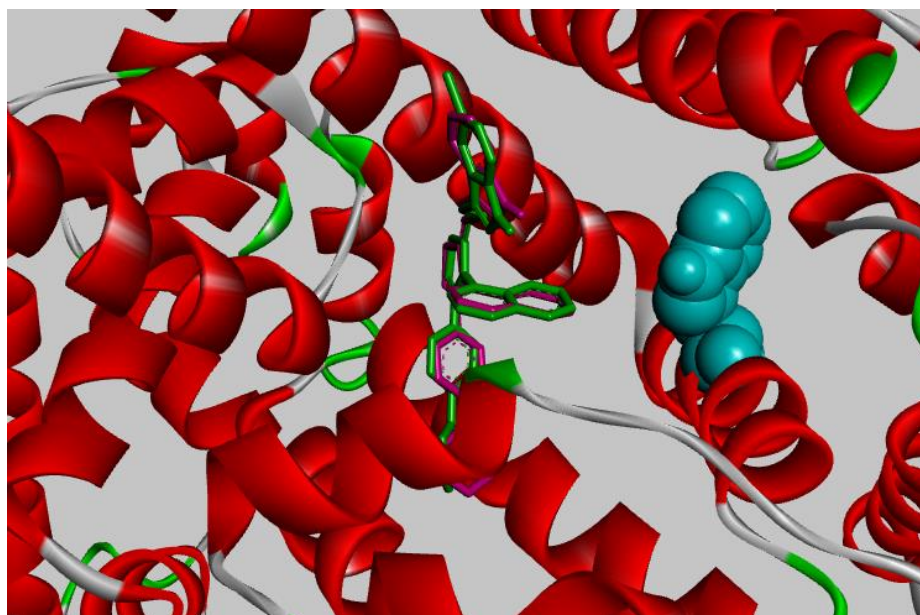
Composto	Energia de ligação kcal mol ⁻¹	Estrutura		Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas		
		R ₁	R ₂		♠-alquila Alquila	♠-sigma	Empilhamento ♠- ♠
7a	-6,77	H	H	Arg-217	Lys-221, Lys-229, Pro-446	-	-
7b	-6,78	H	F	Arg-217	Lys-221, Lys-294, Pro-446	-	-
7c	-7,86	H	NO ₂	Arg-217 Lys-221	Lys-187	-	-
7d	-10,49	H	Ph	-	Lys-187, Arg-194, Leu-259, Ala-290,	Ala-290	Tyr-187
7e	-8,12	Br	NO ₂	Arg-217 Lys-221	Cis-447	-	-
7f	-7,40	Br	H	Arg-198	Arg-194 Arg-198, Ala-260, Ile-289, Ala-290, Leu-237	Leu-137	-
7g	-7,39	Br	F	Arg-217	Lys-221, Lys-224, Pro-446, Val-342	-	-
7h	-10,56	Br	Ph	Arg-194	Arg-194, Lys-187, Ala-290	Ala-290	Tyr-149

A solução do processo de cada *docking* é mensurada com base na energia de interação do complexo e pela energia intramolecular do ligante como mostrado na equação 1. As soluções são classificadas e as de melhor pontuação são submetidas a processos de

recombinação e mutação para a geração de novas soluções. Ao final do processo, as conformações semelhantes (conformações que diferiram em menos de 2,0 Å em RMSD) são agrupadas em *clusters* e esses são ordenados de acordo com a energia. Pelo fato de a albumina possuir muitos locais de ligação para as moléculas, foi escolhida a estrutura de menor energia no *cluster* mais populoso, pois é provável que o *cluster* represente melhor o modo que o ligante deve se ligar e o local com maior probabilidade de ocorrer a interação receptor-ligante.

Como observado na tabela 1, os derivados **7d** e **7h** foram os que apresentaram melhor afinidade de ligação com a BSA, formando complexos com baixas energias de ligação, -10,49 e -10,56 kcal mol⁻¹ respectivamente. Estes ligantes possuem um anel aromático no seu fragmento **R2**, sendo este resultado esperado pois a albumina possui maior afinidade com compostos pouco polares, logo quanto maior o número de fragmentos hidrofóbicos é previsível uma melhor afinidade de ligação com a BSA. É possível perceber de acordo com a figura 9 que os derivados **7d** e **7h** formaram complexos de modo semelhante e se ligaram próximos ao ambiente do triptofano-213.

Figura 9: Docking da conformação dos ligantes 7d e 7h contra a estrutura da BSA. A figura mostra os ligantes sobrepostos, o ligante 7d está indicado em rosa e o 7h em verde. O trp-213 está indicado em azul.

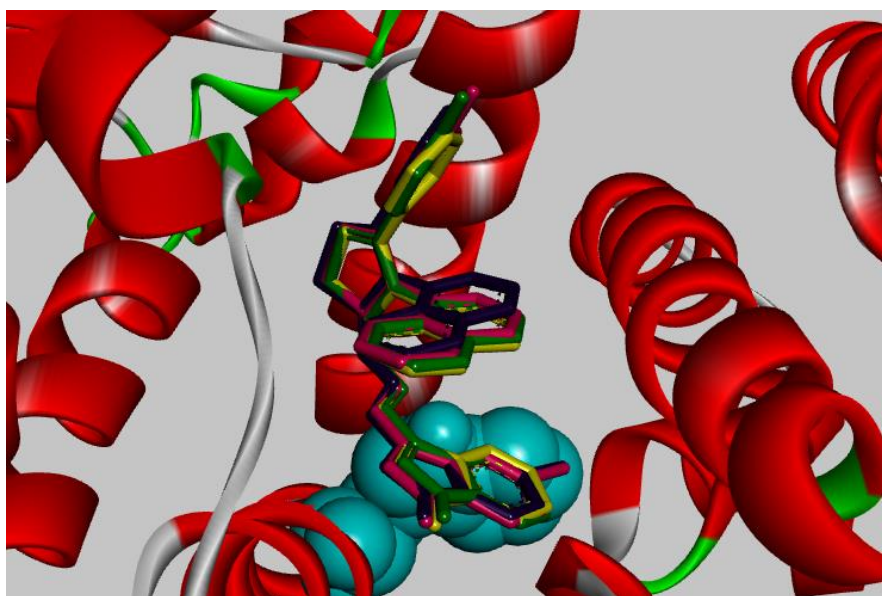


Fonte: Elaboração própria.

Os ligantes **7a**, **7b**, **7f** e **7g** se ligaram a albumina em padrões semelhantes, como pode ser observado na figura 10. As principais forças intermoleculares que formam os complexos com os ligantes **7a** e **7b** são similares e suas energias de ligação muito próximas. É possível perceber que o átomo de bromo também influencia na estabilidade do complexo, pois os

ligantes com **R1=Br** formaram complexos com energias mais baixas que os ligantes com **R1=H**. Resultado este também relatado nos estudos realizados por TAN *et al* (2015) para avaliar a interação de ligantes éteresdifênil-polibromados com HSA através dos métodos de *docking*. Como mostrado na figura 10, apesar de se ligarem com conformações semelhantes os ligantes **7f** e **7g** que possuem o átomo de bromo ligado no anel indol apresentaram energias de ligação menores, isso pode ser justificado pelo fato de o átomo de bromo possuir um raio atômico maior que o átomo de hidrogênio possibilitando realizar um maior número de interações com os aminoácidos no sítio de ligação.

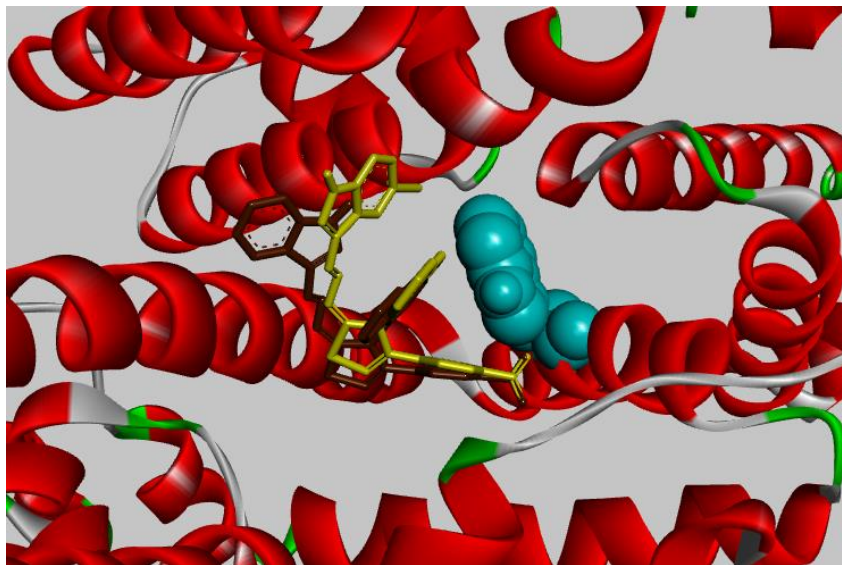
Figura 10: Docking da conformação dos ligantes 7a, 7b, 7f e 7g contra a estrutura da BSA. A figura mostra os ligantes sobrepostos, o ligante 7a está indicado em amarelo, o 7b em verde, o 7f em roxo e o 7g em rosa. O Trp-213 está indicado em azul.



Fonte: Elaboração própria.

Os ligantes **7c** e **7e** possuem o grupo nitro no fragmento R2 e formam duas ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg-217 e Lis-221 e também se ligam próximo ao ambiente do triptofano como mostrado na figura 11. Nenhum dos ligantes interagiram diretamente com o aminoácido Trp, mas com base na observação do modo de ligação é possível perceber que apesar de não interagir diretamente com o triptofano todos os ligantes se ligaram próximos ao seu ambiente interagindo com os resíduos de aminoácidos circundantes.

Figura 11: Docking da conformação dos ligantes 7c e 7e contra a estrutura da BSA. A figura mostra os ligantes sobrepostos, o ligante 7c está indicado em marrom e o 7e em amarelo. O Trp-213 está indicado em azul.

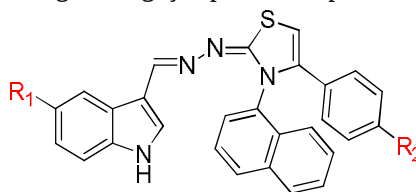


Fonte: Elaboração própria.

Como mostrado nas figuras, todos os ligantes se ligam próximos ao micro ambiente do triptofano, sendo esperado em ensaios experimentais que todos sejam sensíveis em testes de fluorescência, e é previsto que os ligantes **7d** e **7h** apresentem um valor maior de constante de ligação com a BSA pois foram os que expressaram melhor afinidade com a albumina de acordo com a análise de docking.

4.2 CÁLCULO DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPLEXOS DNA

Geralmente, as moléculas que interagem com o DNA afetam a replicação e a transcrição do DNA e podem induzir a morte celular e a apoptose. Assim, o estudo do modo de interação e mecanismo de tais compostos ajuda no desenvolvimento de novos e mais eficientes fármacos anticâncer. Duas grandes classes de agentes não-covalentes de ligação ao DNA foram identificadas: os intercaladores e os ligantes de sulcos. A fim de interpretar teoricamente o modo de ligação dos derivados contra a estrutura do DNA foi realizado o estudo de docking e análise das interações intermoleculares que regem a formação do complexo com o intuito de identificar o modo de ligação. Como resultado foi possível perceber que nenhum dos derivados intercalou com o receptor, os ligantes interagiram inserindo-se no sulco do DNA.

Tabela 2: Energia de ligação para o complexo DNA-ligante.

Composto	Energia de ligação kcal mol ⁻¹	Estrutura	
		R ₁	R ₂
7a	-10,34	H	H
7b	-10,34	H	F
7c	-9,19	H	NO ₂
7d	-10,03	H	Ph
7e	-9,36	Br	NO ₂
7f	-9,90	Br	H
7g	-10,09	Br	F
7h	-9,93	Br	Ph

A tabela 2 descreve os valores da energia de ligação dos ligantes contra a estrutura do DNA, todos os ligantes formaram complexos com o DNA com energia inferior a -9,00 kcal mol⁻¹, isso indica que os ligantes possuem habilidade de interagir com o DNA.

A pose de menor energia dos derivados tiazóis mostrou que os ligantes interagiram nas ranhuras do sulco menor como observado na figura 11. Proteínas e moléculas grandes se ligam preferencialmente ao sulco maior do DNA, enquanto moléculas pequenas se ligam preferencialmente no sulco menor. A afinidade de moléculas pequenas com o sulco menor ocorre principalmente devido a questões geométricas pois o sulco maior apresenta uma geometria mais larga e rasa e pelo fato de ser o local de ligação com outras proteínas pode estar menos disponível, já o sulco menor com geometria mais estreita e profunda permite encaixe de moléculas na ranhura do sulco com pouco impedimento estérico. As regiões ricas em **AT** são mais estreitas e ligeiramente mais profundas que as regiões ricas em **CG**, permitindo um melhor ajuste do ligante. Assim, muitos ligantes de sulcos menores mostraram preferir sequências ricas em **AT** (GILAD E SENDEROWITZ, 2014).

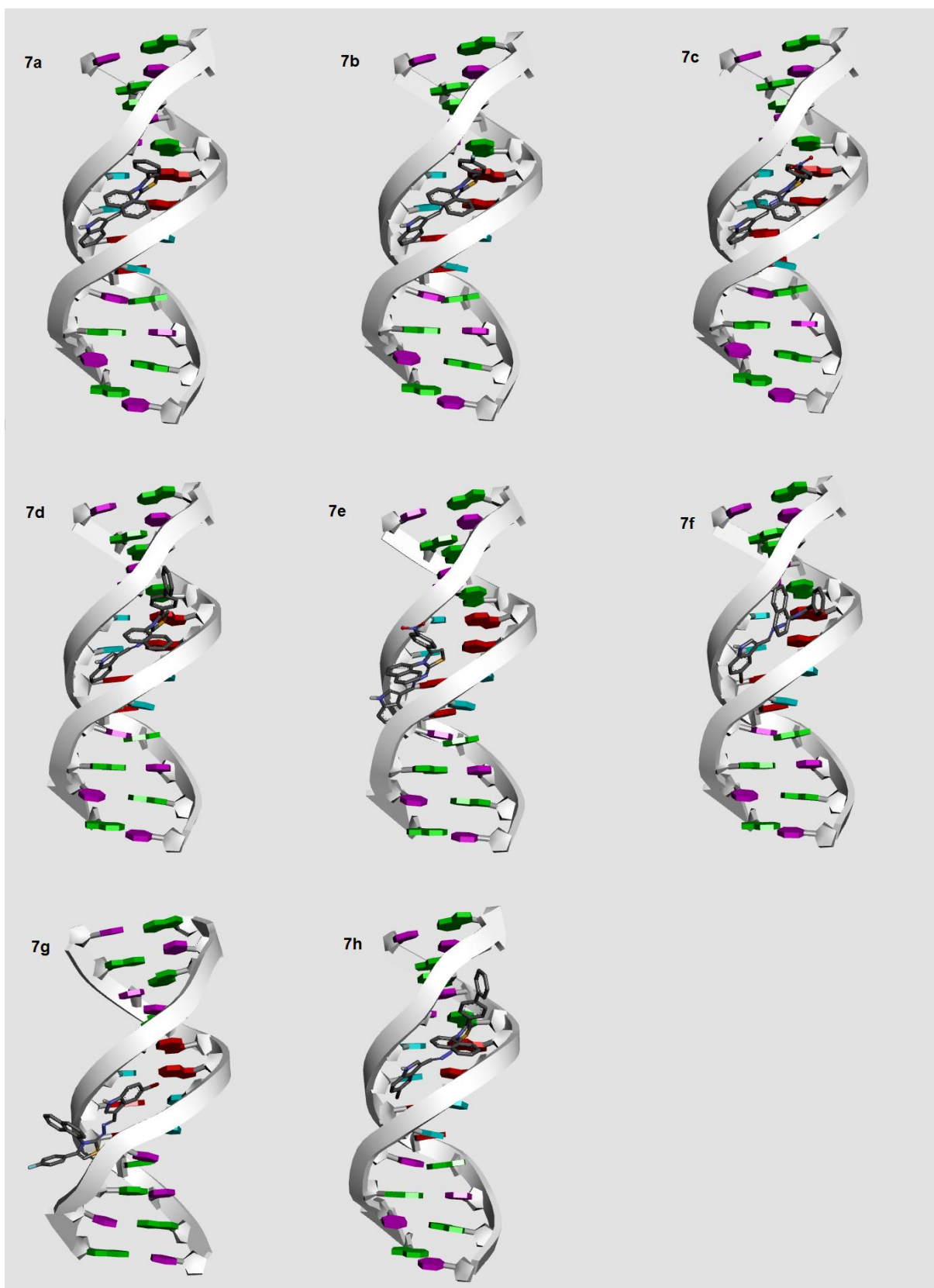
Os complexos foram formados principalmente por interações hidrofóbicas, interagindo principalmente com as bases de adenina 5 e 6, guanina 16 e timina 19 e 20 e os fragmentos aromáticos do ligante, esta interação ocorreu por meio do empilhamento de anéis em forma de T.

Os ligantes **7a** e **7b** foram os que apresentaram melhor afinidade de ligação com o DNA e suas energias de ligação foram ambas no valor de -10,34 kcal/mol. A figura 12

(Pág38) mostra as poses de ligação e é possível constatar que o modo de ligação segue uma tendência, pois o núcleo tiazol e o fragmento indolsão os núcleos que estão direcionado ao sulco do DNA.

No geral, os ligantes do sulco interferem na interação do DNA com proteínas de ligação ao DNA, como fatores de transcrição e proteínas de reparo de DNA. Isso pode levar à parada da proliferação e, finalmente, à morte celular (GILAD E SENDEROWITZ, 2014).

Figura 12: Modos de interação dos derivados tiazóis contra a dupla fita do DNA.



Fonte: Elaboração própria.

4.3 INTERAÇÃO COM A ENZIMATOPOISOMERASE

Os intercaladores de DNA estão entre as classes de compostos mais importantes para o tratamento de doenças como o câncer. Os compostos intercaladores podem influenciar na atividade da enzima topoisomerase impedindo a formação do complexo DNA-topoisomerase ocupando o local de ligação da topoisomerase e também pode formar um complexo ternário entre o DNA, o intercalador e a topoisomerase, neste caso o complexo formado é mais estável que o complexo DNA-topoisomerase, impedindo a religação das fitas clivadas podendo induzir apoptose, sendo este mecanismo conhecido como envenenamento de topoisomerase. (LAFAYETTE, et al., 2013).

Partindo desse pressuposto foi feito o estudo teórico para avaliar a afinidade de ligação dos compostos contra as duas isoformas da enzima DNA-topoisomerase com o intuito de verificar quais compostos possuem melhor potencial de atuar como agente intercalador.

4.3.1 DOCKING COM A TOPO II α

A enzima topoisomerase II α é a isoforma mais utilizada em ensaios experimentais para avaliação de fármacos inibidores desta proteína, pois algumas pesquisas relatam que a topo II α é a principal isoforma envolvida nos processos mitóticos, além disso a concentração celular de topo II α é proporcional a taxa de proliferação celular (AREPALLIA, et al., 2018; GOUVEIA, et al., 2018; OLIVEIRA, et al., 2017). Os resultados de docking contra a TOPO II α estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo Topo II alfa-derivado

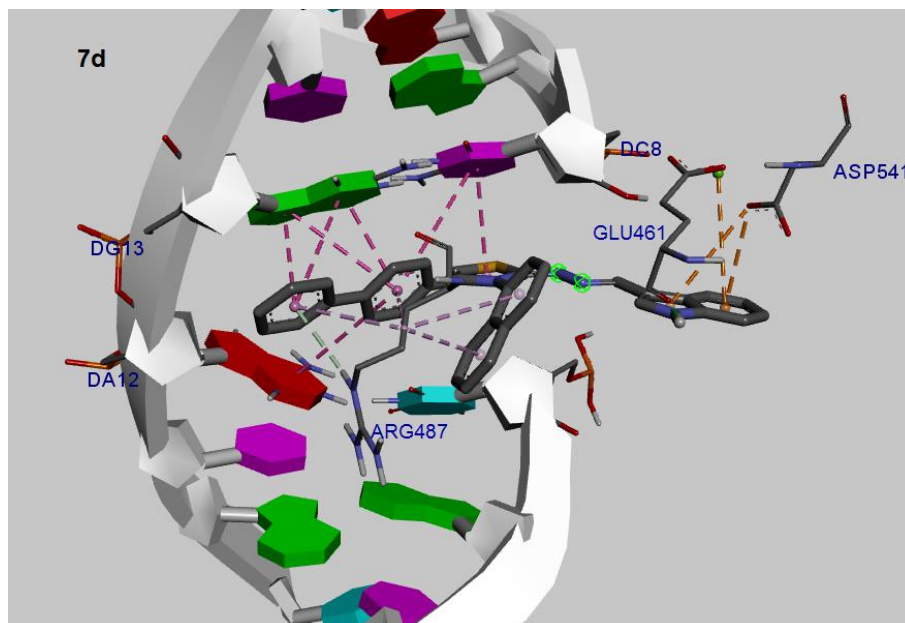
Composto	Energia de ligação kcal mol ⁻¹	Estrutura		Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas		
		R ₁	R ₂		♠-alquila Alquila	♠- sigma	Empilhamento ♠- ♠
7a	-10,38	H	H	Cit-8	Arg-487	-	Cit-8 Tim-9 Gua-13
7b	-10,27	H	F	Arg-487 Leu-616	-	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7c	-10,84	H	NO ₂	Arg-487 Glu-461	Arg-487	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7d	-12,18	H	Ph	Glu-461	Arg-487	-	Cit-8 Ade-12 Gua-13
7e	-11,16	Br	NO ₂	Arg-487 Glu-461	Arg-487 Lis-614	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7f	-10,75	Br	H	Arg-487	Tim-9 Ade-12 Ala-461	-	Cit-8 Tim-9 Gua-13
7g	-10,57	Br	F	Arg-487	Arg-487 Lis-614 Tir-805	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7h	-12,69	Br	Ph	Glu-461	Arg-487 Lis-614	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13

Com base no estudo de docking molecular todos os derivados tiazóis possuem boa energia de interação e intercalam com os pares de bases do DNA no ponto de clivagem e todos interagem com o aminoácido de Arg-487, de modo semelhante ao etoposídeo (fármaco co-cristalizado presente na estrutura da topo II α).

A presença de vários fragmentos poli aromáticos planos na estrutura do ligante permite que estes possam interagir com um maior número de bases de DNA (GILAD E SENDEROWITZ, 2014) e isso foi observado na verificação do modo de ligação do complexo de menor de energia. Os ligantes **7d** e **7h** foram os que apresentaram melhor potencial para formação de um complexo ternário mais estabilizado com energia de ligação no valor de -12,18 e -12,69 kcal/mol. Estruturalmente são os ligantes que possuem um maior conjunto de anéis planos, permitindo dessa forma que ele possua uma afinidade mais acentuada.

O complexo formado com o ligante **7d** mostrado na figura 13 é resultado da interação do anel tiazol com a base de citosina-8, e esta base juntamente com a base de timina-9 e guanina-13 intercala com os anéis fenil do ligante, complementarmente realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glutamina-461. O ligante **7h** (figura 14) se ligou em uma pose muito semelhante e interagiu com os quatro pares de bases no sítio de ligação e também realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glutamina-461. Interações adicionais ocorrem entre o bromo e outros resíduos circundantes, sendo as interações predominantemente hidrofóbicas.

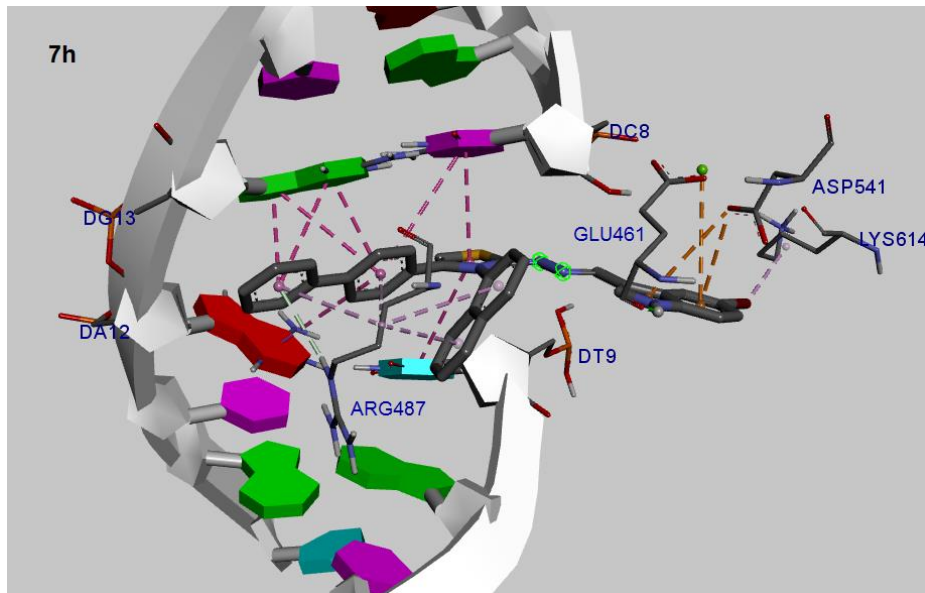
Figura 13: Complexo formado entre a DNA-topoisomerase e o ligante 7d.



As interações de empilhamento π estão representadas em linhas tracejadas rosas.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 14: Complexo formado entre a DNA-topoisomerase e o ligante 7d.



As interações de empilhamento π estão representadas em linhas tracejadas rosas.

Fonte: Elaboração própria.

Os ligantes **7c** e **7e** também formaram complexos com baixas energias de ligação e se ligaram em poses parecidas. O mecanismo de intercalação que ocorre entre o ligante **7c** e a proteína é formado por meio de empilhamento em forma de **T** entre a base de adenina-12 e o anel fenil, e com a base de guanina-13 de forma alinhada. O núcleo tiazol se inseriu entre as

bases de citosina-8 e timina-9, além de duas ligações de hidrogênio com arginina-487 e o oxigênio do grupo nitro e a glutamina 461, sendo estas as principais forças intermoleculares que ocorreu para formação do complexo. O modo de ligação do ligante **7e** segue o mesmo padrão do **7c**, pois ocorre o empilhamento $\pi-\pi$ entre os quatros pares de bases nitrogenadas próximos ao ponto de clivagem e duas ligações de hidrogênio, a diferença na estrutura entre os ligantes é a presença do átomo de bromo no grupo **R1** que permitiu um maior número de contatos hidrofóbicos com os resíduos de aminoácidos circundantes, a presença do grupo nitro também pode influenciar na estabilidade do complexo pois permitiu que estes ligantes realizassem maior número de ligações de hidrogênio.

O ligante **7a** intercala com os quatro pares de bases simultaneamente devido a presença de muitos anéis, a base guanina-8, timina-9 e guanina-13 interage com o anel indol, por meio de empilhamento de $\pi-\pi$, ocorre intercalação entre a guanina-8 e grupo naftil por empilhamento em forma de T, interações de empilhamento aromático também ocorre entre a guanina 13 e o anel fenil, a base de citosina-8 realiza uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do anel indol.

Com a observação do modo de ligação foi visto que núcleo indol é o fragmento do ligante **7b** que intercala com os quatros pares de bases do sítio de ligação, adicionalmente realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo de leucina-616 e o átomo de flúor do ligante, e a arginina-487 com o hidrogênio do indol.

O ligante **7f** se liga em um modo semelhante ao ligante **7b** no qual o núcleo indólico é o fragmento que se insere entre os pares de citosina-8, timina-9 e guanina-13 interagindo por meio de empilhamento entre os núcleos planos, e também realiza uma ligação de hidrogênio com o aminoácido de arginina-487. As demais interações que formam os complexos são predominantemente hidrofóbicas através contato entre o átomo de bromo e os resíduos circundantes.

Conforme os dados de docking os 8 ligantes da série possuem potencial de inibir a atividade da topoisomerase e esses efeitos podem ser confirmados experimentalmente por meio de eletroforese em gel de agarose.

4.3.2 DOCKING COM A TOPO II•

Estruturas de complexos ternários de topoisomerase-droga-DNA revelaram os sítios e mecanismos de ligação exatos dos venenos de topoisomerase. Embora a isoforma da TOPO II^U seja expressa preferencialmente em células em proliferação quando comparada a TOPO II[•], a possibilidade de projetar venenos de topoisomerase II humana específica para as duas isoformas, sugere o desenvolvimento de drogas anticâncer mais seguras (IBRAHIM, et al., 2018), desta forma foi avaliado o potencial de interação dos ligantes tiazóis com o complexo da topo II beta. Os resultados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo Topo II beta-derivado

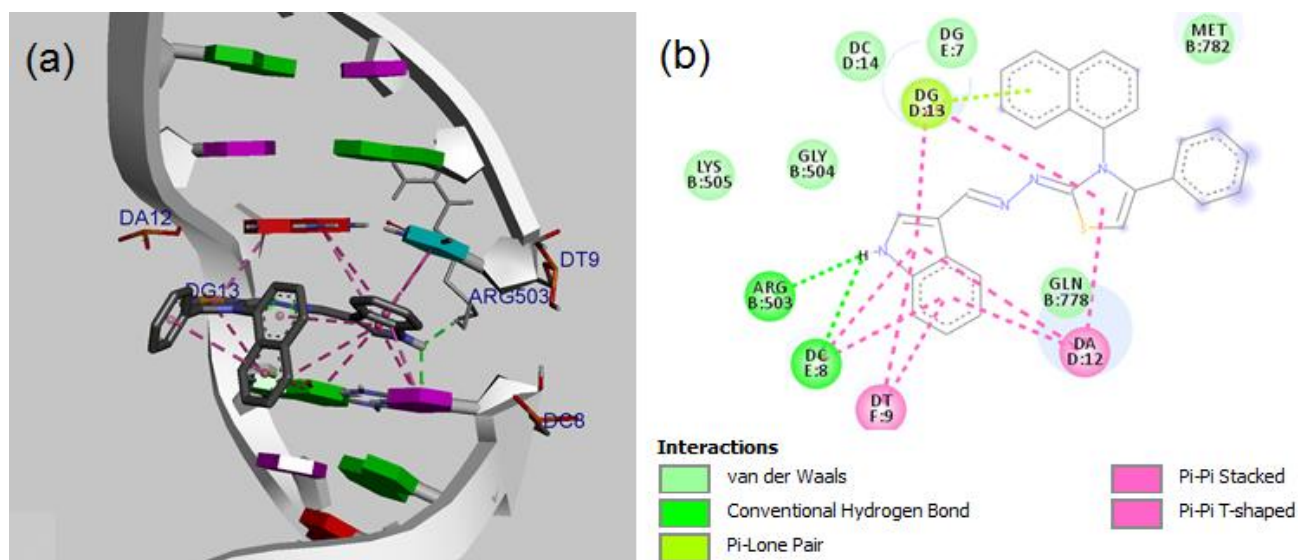
Composto	Energia de ligação kcal mol ⁻¹	Estrutura		Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas		
		R ₁	R ₂		♠-alquila Alquila	♠-sigma	Empilhamento ♠- ♠
7a	-9,05	H	H	Arg-503 Cit-8	-	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7b	-9,16	H	F	Arg-503 Cit-8	-	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7c	-10,43	H	NO ₂	Gua-13 Leu-507 Asn-520	Arg-503 Ala-521	Ade-12 Ala-521	Ade-12
7d	-10,38	H	Ph	Tim-9 Cit-11	Met-781 Met-782 Ala-816 Pro-819	Val-785	-
7e	-9,71	Br	NO ₂	Cit-10 Gua-11Arg-820 Met-782	Met-782 Val-785 Pro-819	Met-782	-
7f	-9,53	Br	H	Ade-12	Ade-12 Gua-13 Arg-503 Met-782 Pro-819	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7g	-8,57	Br	F	Ade-12	Tim-9 Ade-12 Gua-13	-	Cit-8 Tim-9 Ade-12 Gua-13
7h	-10,46	Br	Ph	Tim-9	Met-781 Met-782 Ala-816 Pro-819	Val-785	Ala-816

O sítio de ligação chave relatado do complexo DNA-TopoII• consiste em aminoácidos e resíduos nucleotídicos de Asp-479, Arg-503, Gln-778, Met-782, Cit-8, Tim-9, Cit-11, Gua-13 e Ade-12 (IBRAHIM, et al., 2018). O docking dos ligantes tiazóis contra a enzima DNA-topoisomerase II• mostrou que os derivados **7a**, **7b**, **7c**, **7f** e **7g** interagiram com as bases nitrogenadas por meio de empilhamento de anéis de modo semelhante a amsacrina (agente antineoplásico co-cristalizado na estrutura da DNA-topoisomerase ilustrado na figura 1), este tipo de interação é característico de intercalação, e também interagiram com os aminoácidos relatados presentes no sítio de ativo, estes derivados formaram complexos com baixas energias de ligação como descrito na tabela 2, com destaque para os ligantes **7c** e **7f** com energias de -10,53 e -9,53 kcal mol⁻¹ nessa ordem, sendo estes os ligantes apontados como os mais promissores para formação de um complexo ternário estável.

Os ligantes **7a** e **7b**, assim como ocorreu com a albumina, formaram um complexo com o receptor de maneira idêntica e com valores de energia de ligação muito próximos, -9,05 e -9,16 kcal mol⁻¹ respectivamente. Estruturalmente a diferença entre os compostos é a presença do átomo de flúor no grupo R2 do ligante **7b**. O modo de ligação de ambos os ligantes foram iguais assim como as principais interações intermoleculares que formaram o complexo como mostrado na figura 15 e 16.

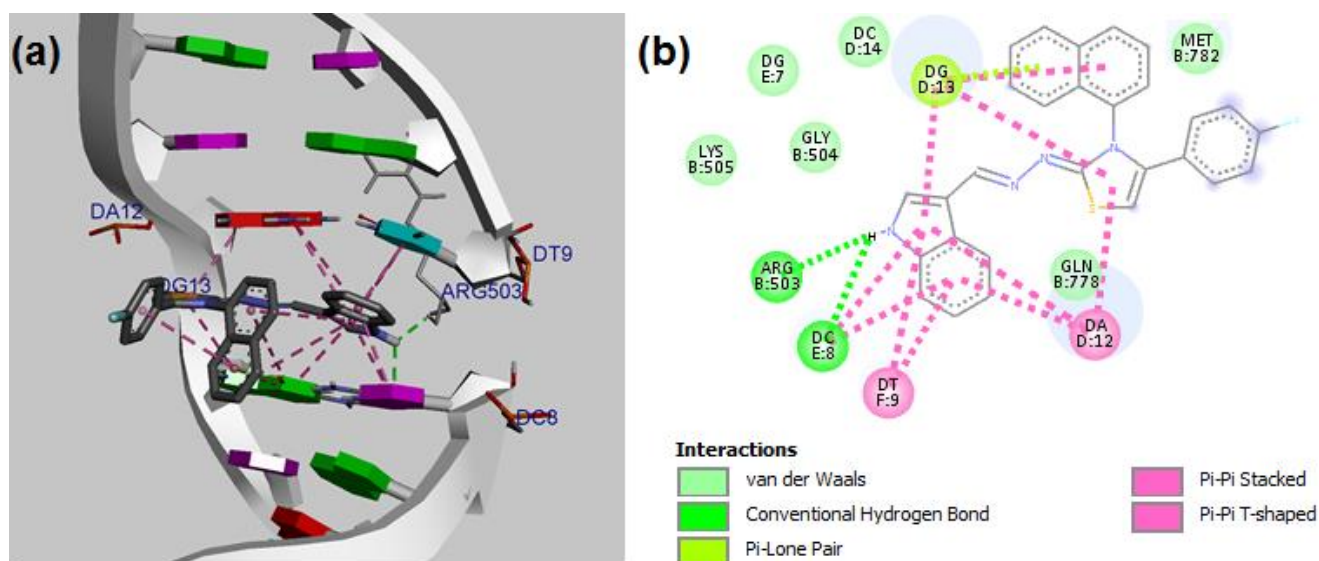
Como relatado em outros estudos (LAFAYETTE, et al., 2013; GOUVEIA, et al., 2018; ZHAO, et al., 2017; OLIVEIRA, et al., 2017; GILAD E SENDEROWITZ, 2014; IBRAHIM, et al., 2018), a planaridade de compostos poli aromáticos como anel indol permite que ele se insira entre os pares de bases do DNA, esta característica foi observada nesta pesquisa já que o anel indol dos ligantes **7a** e **7b**, intercalou entre as bases de citosina 8, timina 9, adenina 12, e citosina 13, além disso o núcleo tiazol também interagiu com os pares de base de adenina 12 e guanina 13, por meio do empilhamento de anéis. Adicionalmente os ligantes realizaram duas ligações de hidrogênio com o aminoácido de Arg-503 e a base de citosina do receptor, sendo as ligações de hidrogênio muito importantes em termos de energia.

Figura 15: (a) modo de ligação do composto **7a** com a topo II•. (b) Interações do ligante **7a** com os aminoácidos circundantes.



Fonte: Elaboração própria.

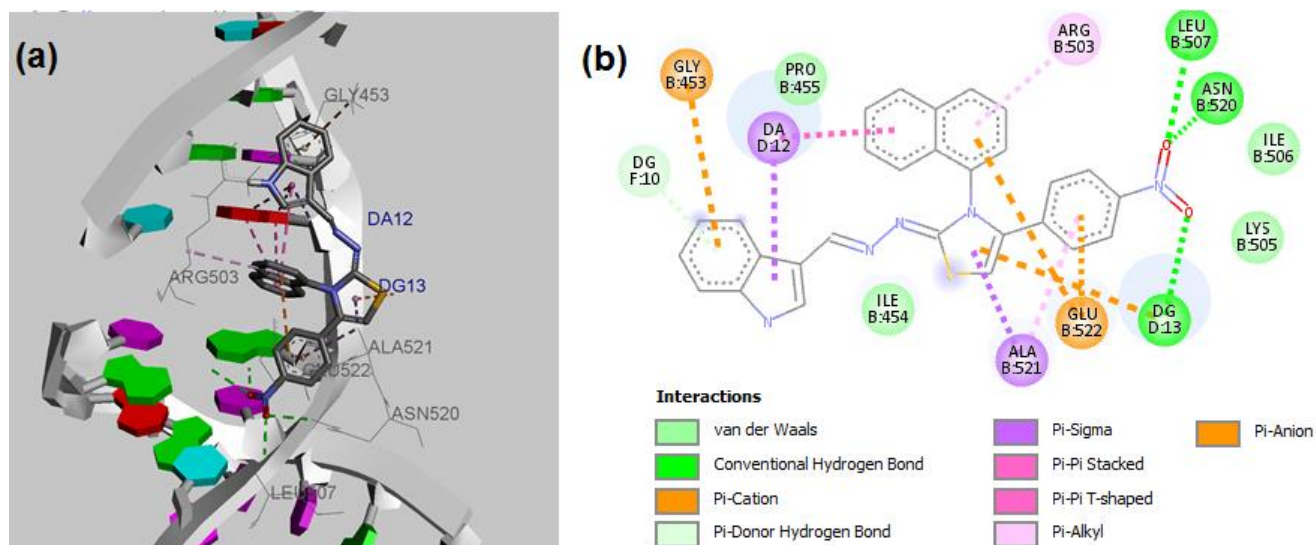
Figura 16: (a) modo de ligação do composto 7b com a topo II. (b) Interações do ligante 7b com os aminoácidos circundantes.



Fonte: elaboração própria.

O ligante 7c formou um complexo mais estável entre todos os ligantes que intercalaram com o DNA e apresentou um modo de ligação misto. O grupo naftil presente no ligante intercalou com a base de Adenina-12, e os outros fragmentos do ligante como o grupo nitro interagiram com o DNA e com os outros resíduos de aminoácidos da proteína por meio de três ligações de hidrogênio com a base de guanina 13 e os aminoácidos de leucina-507 e Asn-520 (figura 17).

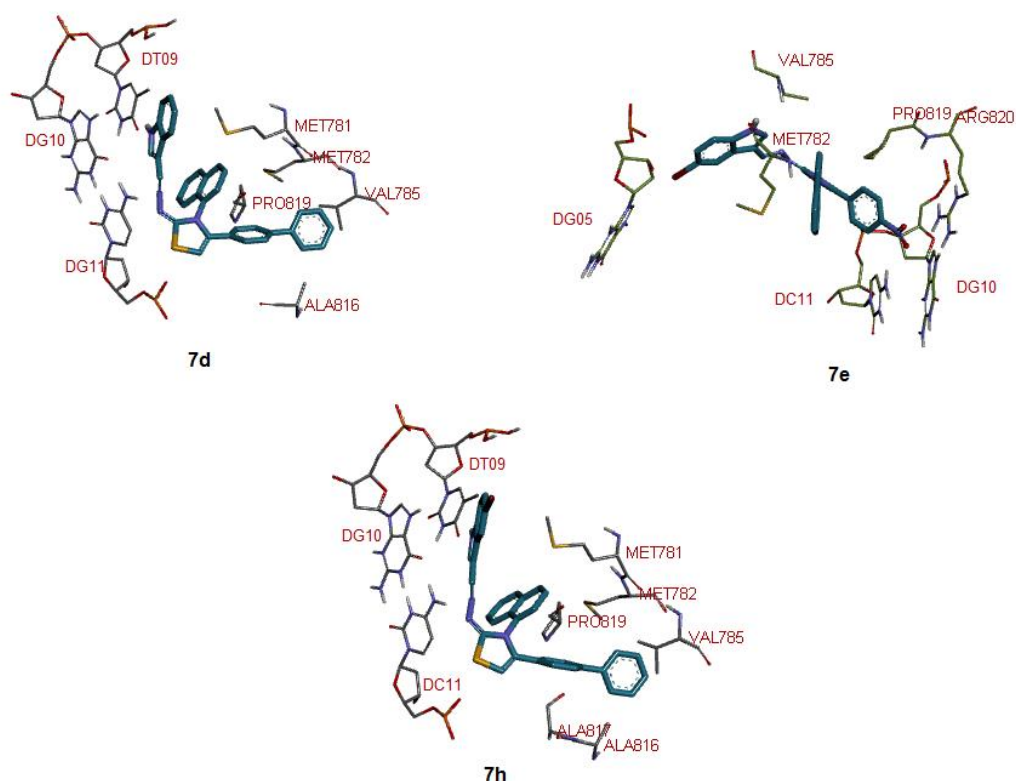
Figura 17: (a) modo de ligação do composto 7c com a topo II•. (b) Interações do ligante 7c com os aminoácidos circundantes.



Fonte: Elaboração própria.

A ausência de interações do tipo empilhamento- π entre os pares de bases presentes e os derivados tiazolidínicos **7d**, **7e** e **7h** mostrou que estes compostos não intercalaram com o DNA complexado na estrutura da enzima. Isso pode ser observado na figura 18, onde estão elucidados os ligantes interagindo com os resíduos e bases circundantes.

Figura 18: Ilustração dos complexos de DNA-topoisomerase com os derivados tiazóis representados em azul.

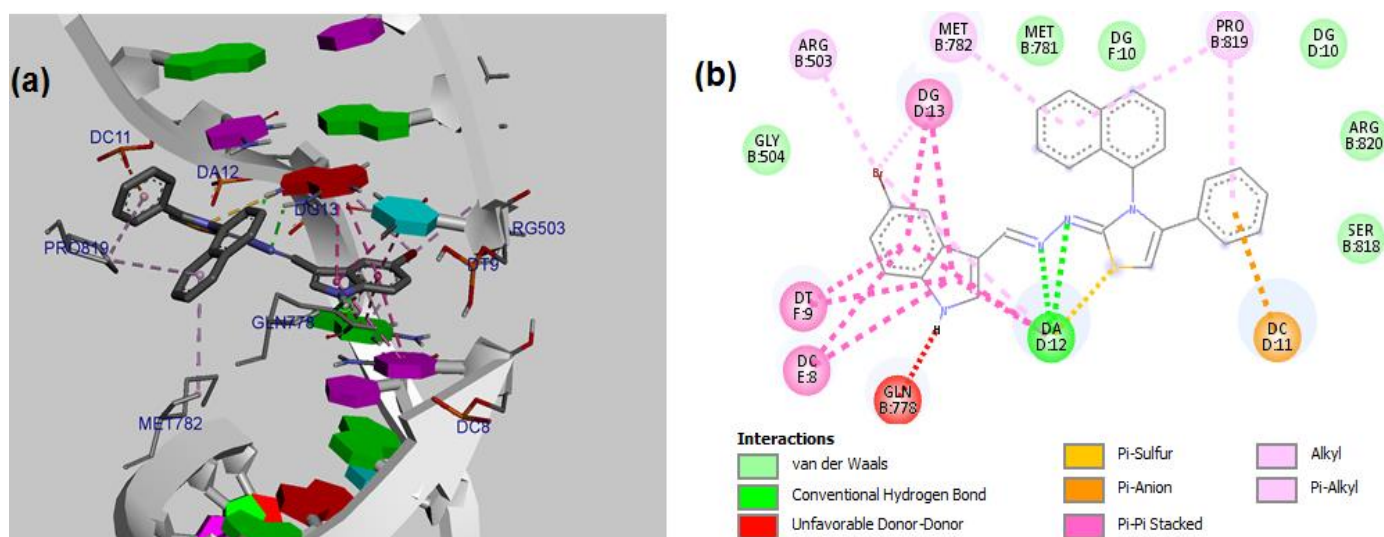


Os compostos **7d** e **7h** são estruturalmente semelhantes e dentre todos os derivados foram os que apresentaram menor energia de ligação ($-10,38$ e $-10,46$ kcal mol $^{-1}$ para o **7d** e **7h** respectivamente), assim como observado com topo II α , mas o modo de ligação foi bem distinto pois eles não se ligaram no sítio de ligação do complexo DNA-topo II $\bullet$. As forças intermoleculares que formam os dois complexos também são similares, ambos os compostos realizaram uma ligação de hidrogênio com a timina-9, as demais interações ocorreram com os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da enzima, sendo as interações hidrofóbicas predominantes. O ligante **7e** apresentou boa energia de ligação ($-9,71$ kcal mol $^{-1}$), o complexo foi formado com 4 ligações de hidrogênio sendo uma ligação entre o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio do indol com o aminoácido de metionina-782, as outras três ligações de hidrogênio ocorreram entre o átomo do grupo nitro com as bases de guanina-10 e citosina-11 e o resíduo de arginina-820.

Os modos de intercalação dos ligantes **7f** (figura 19) e **7g** (figura 20) seguem o mesmo padrão, os intercaladores ligam-se através da inserção de um cromóforo aromático planar, o anel indol, entre os quatro pares de bases do sítio de ligação por meio de empilhamento de anéis aromáticos, e interagem por meio de ligação de hidrogênio com a base de adenina 12,

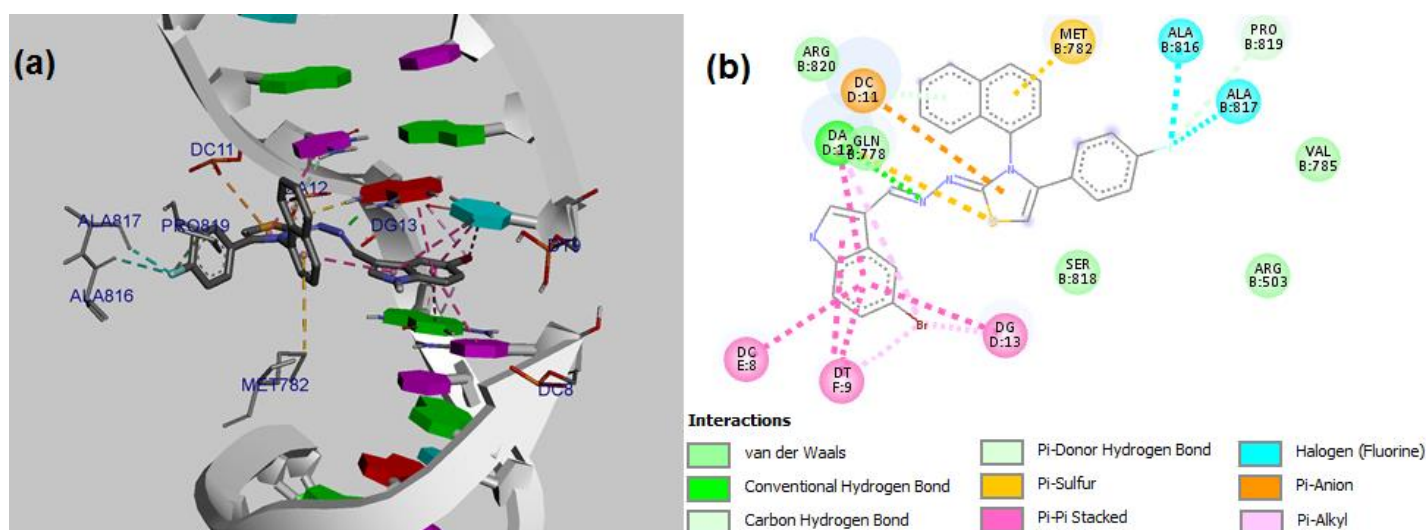
sendo que o ligante **7f** realizou duas ligações de hidrogênio. Segundo os resultados do docking o ligante **7g** foi o que formou um complexo com maior energia de ligação ($-8,59 \text{ kcal mol}^{-1}$) em comparação aos demais ligantes da série.

Figura 19: (a) modo de ligação do composto **7f** com a topo II•. (b) Interações do ligante **7f** com os aminoácidos circundantes.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 20: (a) modo de ligação do composto **7g** com a topo II•. (b) Interações do ligante **7g** com os aminoácidos circundantes.



Fonte: Elaboração própria.

Baseado na análise de docking observou-se que o núcleo indólico é uma característica estrutural chave presente na estrutura dos ligantes para inibição da topo II•.

4.4 PREVISÃO ADMET

As previsões dos parâmetros ADMET foram realizadas para avaliar os perfis farmacocinéticos e de toxicidade dos compostos em análise. Duas formas comuns de avaliar o potencial de biodisponibilidade oral de um composto é através das regras propostas por Lipinski e Veber (GOUVEIA, et al., 2018). Os resultados dos parâmetros estudados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Estimativa *in silico* de dados farmacocinéticos mensurados nas plataformas SwissADME e pkCSM.

	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h
MM (g mol⁻¹)	444,563	462,553	489,56	520,661	568,456	523,459	541,449	599,557
AH	4	4	6	4	6	4	4	4
DH	1	1	1	1	1	1	1	1
LR	4	4	5	5	5	4	4	5
Ali LogS	-8,29	-8,39	-9,07	-9,97	-9,79	-9,01	-9,11	-10,69
MlogP	4,72	5,09	3,77	5,66	4,33	5,28	5,64	6,20
ASP (Å²)	73,68	73,68	119,5	73,68	119,5	73,68	73,68	73,68
Per.Caco2 log pp; log cm/s	1,018	1,056	0,266	0,983	0,152	0,909	0,947	0,863
Abs. In (%)	94,467	94,194	92,544	94,242	89,590	90,830	91,002	91,418
VDss (log L / kg)	-0,383	-0,437	-0,665	-0,572	-0,643	-0,419	-0,495	-0,429
Per. BHE (log BB)	0,409	0,386	-0,784	0,412	-0,978	0,573	0,534	0,526
Per. SNC (log PS)	-0,892	-0,921	1,136	-0,536	-1,038	-0,682	-0,722	-0,340

MM: Peso molecular, DH: Grupos doadores de hidrogênio, AH: Grupos receptores de hidrogênio, LogS: Solubilidade aquosa, MlogP: Lipofilicidade, ASP: Área de superfície polar, Abs. Int: Absorção intestinal humana, Per. Caco2: Permeabilidade nas células Caco-2, VDss: Volume de distribuição, Per. BHE: Permeação da barreira hematoencefálica, Per. SNC: Permeação no sistema nervoso central.

Os parâmetros físico-químicos da regra de Lipinski e Veber, foram previstos pelos dados da plataforma SwissADME. Todos os ligantes atendem as regras propostas por Veber e colaboradores mas somente o ligante **7c**, devido a presença do grupo nitro no fragmento R2 e ausência do átomo de bromo no R1 que gerou um pequeno decréscimo da hidrofobicidade, está de acordo com os parâmetros propostos por Lipinski, pois estes ligantes são caracterizados por possuírem altos valores de lipofilicidade violando a regra de Lipinski neste parâmetro. A lipofilicidade é medida através do coeficiente de partição entre o n-octanole a água, devido à importância desta propriedade muitos métodos computacionais são utilizados para medir a lipofilicidade. De acordo com os dados da tabela 5 é possível identificar uma relação entre o valor da lipofilicidade com afinidade com albumina bovina, pois os ligantes **7d** e **7h** foram os que formaram complexos mais estáveis com a proteína segundo o resultado do docking são os ligantes da série que apresentaram os maiores valores de **MlogP**, 5,66 para o

7d e **6,02** para o **7h**, evidenciando ainda mais que a BSA interagem melhor com compostos lipofílicos. Foi avaliada outras propriedades importantes como a solubilidade aquosa, expressa numericamente pelo método Ali LogS. Este parâmetro afeta significativamente as características de absorção e distribuição. Em geral um composto com baixa solubilidade não é bem absorvido pelo organismo. A solubilidade aquosa é o inverso lipofilicidade, os ligantes empregados neste estudo são classificados como de baixa solubilidade pois apresentam valor de Ali LogS menor que -6, com exceção do ligante **7h** que é o que apresenta em sua estrutura mais grupos hidrofóbicos o que lhe confere mais baixa solubilidade aquosa, -10,69, sendo este ligante classificado como insolúvel (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017).

Através da plataforma pkCMS foi prevista algumas propriedades farmacocinéticas importantes para os ligantes em estudo como o valor da permeabilidade das células Caco-2 que fornece uma estimativa para absorção do ligante na mucosa intestinal humana onde a alta permeabilidade é prevista para valores maiores que 0,90, a fração permeável é medida em função do tempo (LAMBERTUCCI et al., 2018). Os compostos em análise que apresentaram valores de permeabilidade das células Caco-2 maior que 0,90 foram os ligantes **7a**, **7b**, **7d**, **7f** e **7g**, então é previsto que estes ligantes da série apresentem alta permeabilidade, com destaque para o ligante **7b** que apresentou maior valor (1,056). Os ligantes também apresentaram percentual de absorção através do intestino de maior que 90%, exceto o ligante **7e**. Os valores de VDss indica o volume de distribuição do composto onde valores de VDss superior a 0,45 indica que o composto tem maior probabilidade de ser distribuído nos tecidos do que no plasma. Todos os ligantes apresentaram valor de VDss menor que -0,15 e isto indica que os ligantes apresentam maior probabilidade de se distribuir no plasma que nos tecidos (LAMBERTUCCI et al., 2018; PIRES et al., 2015)..

O cérebro é protegido de compostos exógenos pela barreira hematoencefálica (BHE). A capacidade de um medicamento para atravessar para o cérebro é um parâmetro importante a considerar para ajudar a reduzir efeitos colaterais e de toxicidade, ou para melhorar a eficácia de medicamentos cuja atividade farmacológica é no cérebro (HARDJONO et al., 2018). Esta análise faz a precisão da relação logarítmica das concentrações de fármaco no cérebro para o plasma, para valores > 0,3 o fármaco fornece indícios que o ligante pode atravessar a BHE, para valores < -1 a distribuição cerebral é fraca (LAMBERTUCCI et al., 2018; PIRES et al., 2015). Os ligantes **7c** e **7e** apresentaram valores de -0,784 e -0,978 respectivamente sendo os ligantes moderada probabilidade de atravessar a BHE, os demais ligantes apresentam valores de logBBB acima de 0,3 indicando que podem ter boa probabilidade de penetrar na BHE (HARDJONO et al., 2018).

A barreira hematoencefálica retarda a entrada de fármacos no sistema nervoso central (SNC) de modo que um fármaco com caráter lipofílico tem maior probabilidade de penetrar no SNC. Segundo Pires et al. (2015), considera-se que um composto com $\log PS > -2$ penetra no SNC, enquanto aqueles com $\log PS < -3$ são considerados incapazes de penetrar no SNC. A partir dos dados da tabela 5 todos os compostos derivados de tiazóis apresentam probabilidade de penetrar no SNC, pois possuem valor de $\log PS$ entre 1,136 e -1,038.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi realizado o estudo do docking molecular e de acordo com os resultados é possível perceber que os ligantes possuem boa afinidade com a BSA, e um dos fatores que está relacionado com esta afinidade é o valor da lipoficidade, visto que os ligantes mais lipofílicos, **7d** e **7h** são os que apresentam menor energia de ligação com BSA ($-10,49 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-10,56 \text{ kcal mol}^{-1}$), logo os complexos mais estáveis. Através da análise das interações intermoleculares dos ligantes todos os derivados tiazóis se ligam próximos ao microambiente do aminoácido de Triptofano, sendo este um dado importante para ensaios experimentais de fluorescência e um indicativo do local de ligação do ligante com a albumina.

Os estudos de docking molecular forneceram uma análise prévia da interação desses compostos com o DNA e observou-se que os complexos formados possuem energias inferiores a $-9,00 \text{ kcal mol}^{-1}$, e isso pode estar relacionado a pose de ligação visto que todos os ligantes se ligaram no sulco menor que possui geometria favorável para ligação com moléculas pequenas.

Além disso, o docking apontou que os ligantes possuem potencial para formação de um complexo ternário estabilizado com a DNA-topoisomerase II α mostrando um padrão de ligação semelhante ao do ligante co-cristalizado. Sendo os ligantes **7d** e **7h** os que formaram complexos com menor energia. Os resultados com a topoisomerase II β mostraram que os ligantes **7a**, **7b**, **7f** e **7g** possuem melhor potencial de intercalação no ponto de clivagem.

Todos os ligantes da série obedecem às regras para fármacos proposto por Veber, mas somente o ligante **7c** obedece aos parâmetros propostos por Lipinski. Quanto às propriedades físico químicas relacionadas ao perfil farmacocinético, observou-se que os ligantes **7a**, **7b**, **7d**, **7f** e **7g** possuem alta probabilidade de permeação nas células Caco-2, e também apresentaram bom percentual de absorção através do intestino sendo o ligante **7e** o que apresentou menor percentual. A análise do volume de distribuição indica que todos os compostos em análise possuem maior probabilidade de se distribuir melhor no plasma. Por apresentarem altos valores de lipoficidade é indicado que os compostos possuam de moderada a alta probabilidade de atravessar a BHE, e penetrar no SNC.

Os resultados de docking sugerem que os derivados tiazóis apresentam um potencial de atuar como intercalador pois possui boa afinidade de ligação com o complexo DNA-topoisomerase, impedindo a religação das fitas clivadas podendo induzir apoptose. Como perspectivas é necessária a realização do teste experimental por meio de eletroforese em gel de

agarose para observar os efeitos dos derivados tiazóis contra a topoisomerase e ensaios experimentais de fluorescência para verificar a interação dos compostos com a BSA.

6. REFERÊNCIAS

- AREPALLIA, S.K.; LEEA.C.; SIMA.S.; LEEB. K.;JOC. H.; JUNC. K.Y.; KWONC. Y.; KANGD, J.S.; JUNGA, J.K.; LEEA, H. Development of 13H-benzo[f]chromeno[4,3-b][1,7]naphthyridines and their salts as potent cytotoxic agents and topoisomerase I/II inhibitors. *Bioorganic& Medicinal Chemistry* 26 (2018) 5181-5193.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 1998-2016.
- BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 3ª Edição, Editora ArtMed, Porto Alegre, 2015.
- CHEN, S. H., CHAN, N.-L.; & HSIEH, T. New Mechanistic and Functional Insights into DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 139-170. (2013).
- DAINA, A., MICHIELIN, O. & ZOETE, V. SWISSADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 42717 (2017)
- DU, X et al. insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *international journal of molecular sciences.*, 17, 144. 2016.
- GILAD, Y.; SENDEROWITZ, HANOCH. Docking Studies on DNA Intercalators. *J. Chem. Inf. Model*, 2014, 54 (1), pp 96-107.
- GONÇALVES, Valter L. da C; et al. Planejamento, Desenho, Avaliação Toxicológica e Docking Molecular de uma Nova Série de Inibidores da Enzima FAAH. *Revista da Jopic*, v.1, n.1, 2016.
- GOUVEIA, R.G., RIBEIRO, A.G.; SEGUNDO, M.A.S.P.; OLIVEIRA, J.M., LIMA, M.C.A.; COUTO, T.R.; ALMEIDA, S.M.V.; MOURA, R.L. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26 (2018) 5911-5921.
- GURYANOV, I; FIORUCCI, S; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. *Materials Science and Engineering C* 68, 890-903., 2016.
- HARDJONO, S., SISWANDONO, S. & ANDAYANI, R. Evaluation of N-benzoylthiourea derivatives as possible analgesic agents by predicting their physicochemical and pharmacokinetic properties, toxicity, and analgesic activity. *Indones. J. Biotechnol.* 22, 76 (2018).
- IBRAHIM, M.K. et al. Design, synthesis, molecular modeling and anti-proliferative evaluation of novel quinoxaline derivatives as potential DNA intercalators and topoisomerase II inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018), doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.004.

HUEY, R.; MORRIS G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. *J. Comput. Chem.* **2007**, 28, 1145.

KERNS, EDWARD; LI DI. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design, and Methods: From ADME to Toxicity Optimization*. Copyright ©, 2008.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews*, v. 3, p. 935-949, nov. 2004.

LAMATTINA e GOLAN. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

LAMBERTUCCI, C. et al. New potent and selective A₁ adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. *Eur. J. Med. Chem.* (2018). doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.067

LIMA, L.M. QUÍMICA MEDICINAL MODERNA: DESAFIOS E CONTRIBUIÇÃO BRASILEIRA. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1456-1468, 2007.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W. & FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 4ñ17 (2012).

MENG, X.Y.; ZHANG, H.X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7, 146-157., 2011.

MOREIRA, M.B; FRANCISCATO, D. S; TOLEDO, K.C.F; SOUZA, J.R.B; NAKATANI, H.S; SOUZA, V.R. investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana porcomplexo de rutênio. *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-6, 2014.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

NAIDU, C.K; SUNEETHA, Y. Molecular docking, QSAR and AMDET analysis of 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran and its analogs against Estrogen receptor alpha. *Medicinal chemistryresearch*, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de lehninger*. 6.ed Porto Alegre: Artmed, 2014.

NUNES, I. K. C. A Importância do Estudo do Metabolismo nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento de Fármacos. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (2), 649-662.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL.2015. Available at <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Acessadoemfevereiro de 2018.

PIRES, D. E. V., BLUNDELL, T. L. & ASCHER, D. B. Pkcs_m: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* 58, 4066-4072 (2015).

POMMIER, Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition. *Chemical Reviews*, Maryland, v. 109, n. 7, p. 2894-2902, 2009.

RODRIGUES, R. P; et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 6, p.739- 736, dez., 2012.

ROMAGNOLI, R, BARALDI, P. G., SALVADOR, M. K., CAMACHO, M. E., BALZARINI, J., BERMEJO, J., ESTÉVEZ, F. Anticancer activity of novel hybrid molecules containing 5-benzylidene thiazolidine-2,4-dione. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 63: 544-557, 2013.

RÓZ, A.L; LEITE, F.L; FERREIRA, M.; JR, O.N.O. Grandes áreas da nanociência e suas aplicações, volume 2. São Paulo: Elsevier editora LTDA, 2015.

S. MURUGAVEL, C. RAVIKUMAR, G. JAABIL, P. ALAGUSUNDARAM. Synthesis, crystal structure analysis, spectral investigations (NMR, FT-IR, UV), DFT calculations, ADMET studies, molecular docking and anticancer activity of 2-(1-benzyl-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methoxypyridine – A novel potent human topoisomerase II α inhibitor, *Journal of Molecular Structure* (2018).

SHU, Y., XUE, W., XU, X., JIA, Z., YAO, X., LIU, S., & LIU, L. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. *Food Chemistry*, 173, 31-37, 2014.

SILVA, R.E.; TOLEDO, K.C.F.; JORGE, H.B.; NETO, B.M.; SOUZA, V.R; NAKATANI, H.S. interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 10, 1633-1638, 2014.

TAN, S. CHIA, Z. SHANA, Y. WENA, Z, LIA, W. Interaction studies of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) with human serum albumin (HSA): Molecular docking investigations. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 54 (2017) 34-39.

TENG, Y; LIU, R; LI, C; XIA, Q; ZHANG, P. The interaction between 4-aminoantipyrine and bovine serum albumin: Multiple spectroscopic and molecular docking investigations. *Journal of Hazardous Materials* 190, 574-581, 2011.

VERLI, H; BARREIRO, E.J. UM PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL: A FLEXIBILIDADE DOS LIGANTES E RECEPTORES. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 95-102, 2005.

WANG, J. C. Papel celular das topoisomerasas do DNA: uma perspectiva molecular. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (6), 430-440 (2002).

WHALEN, KAREN; FINKEL, RICHARD; PANAVELIL, THOMAS A. *Farmacologia ilustrada*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

Y.Y. ZHU, J. WANG, J. CHEN, J.H. SHI. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking, *J. Photochem. Photobiol. B* 56 (2016) 155-163.

YAN, J.; HU, J.; NA, B.; HUANG, L.; LI, X. Design, synthesis, and biological evaluation of cyclic-indole derivatives as anti-tumor agents via the inhibition of tubulin polymerization, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.125, p. 663-675, 2016.

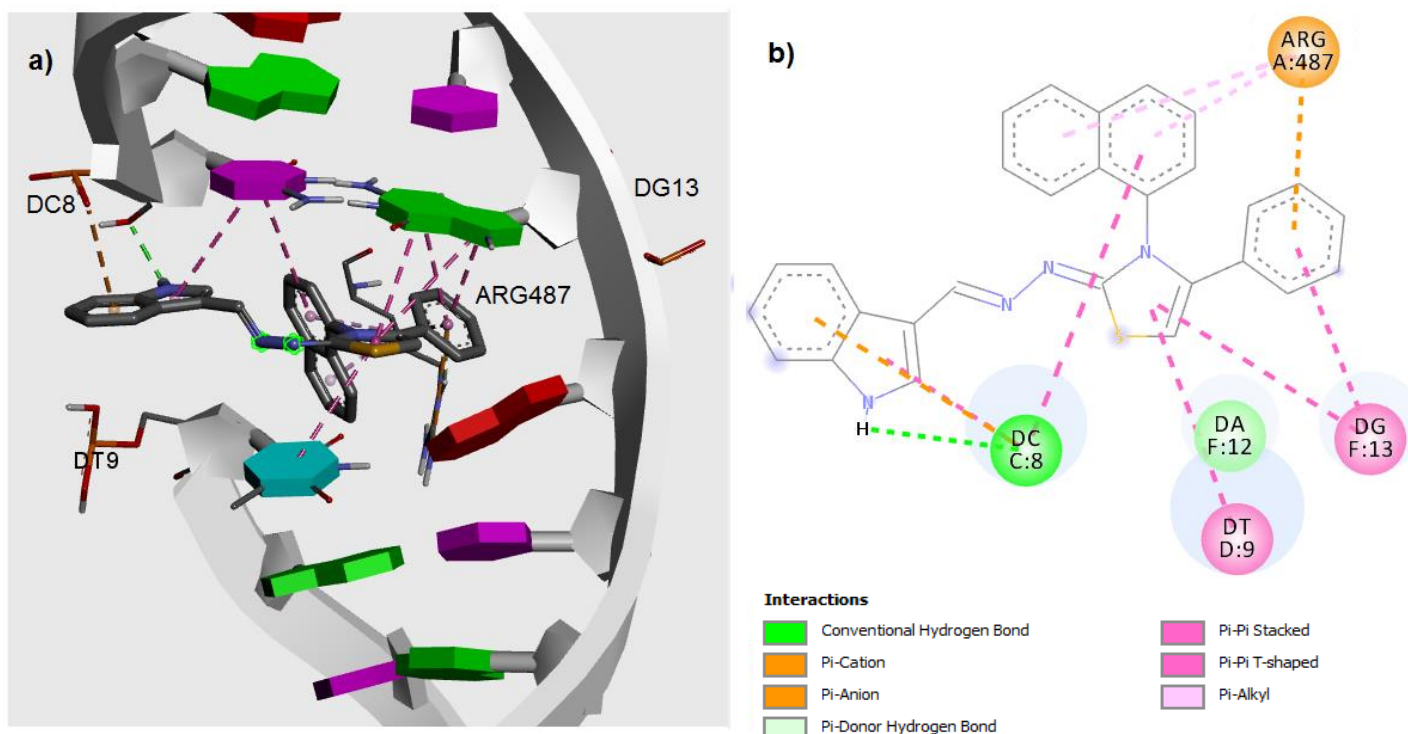
YAN-YUE LOU, KAI-LI ZHOU, JIE-HUA SHI, DONG-QI PAN. Characterizing the binding interaction of fungicide boscalid with bovine serum albumin (BSA): A spectroscopic study in combination with molecular docking approach, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* (2017), doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.037

ZHAO, J.; LI, W.; MA, R.; CHEN, S.; REN, S.; JIANG, T. Design, Synthesis and DNA Interaction Study of New Potential DNA Bis-Intercalators Based on Glucuronic Acid. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, v.14, p. 16851-16865, 2013.

ZHAO, Y., ZHANG, J., ZHUANG, R., HE, R., XI, J., PAN, X., SHAO, Y., PAN, J., SUN, J., CAI, Z., LIU, S., HUANG, W., LV, X. Synthesis and evaluation of a series of pyridine and pyrimidine derivatives as type II c- Met inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.25, p. 3195-3205, 2017.

7. APÊNDICE

Figura 21: (a) modo de ligação do composto 7a com a topo III $\ddot{U}$ (b) Interações do ligante 7a com os aminoácidos circundantes.



Fonte: elaboração própria.

Figura 22: (a) modo de ligação do composto 7b com a topo III $\ddot{U}$ (b) Interações do ligante 7b com os aminoácidos circundantes.

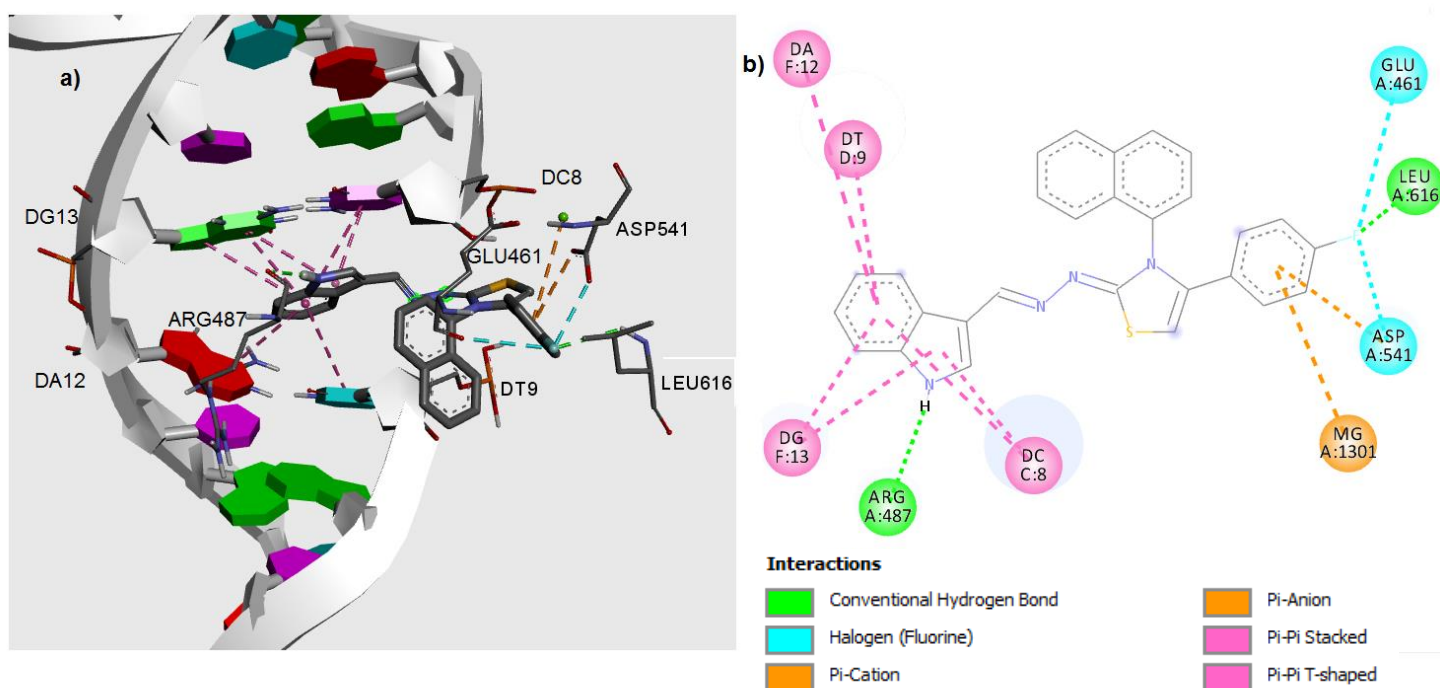
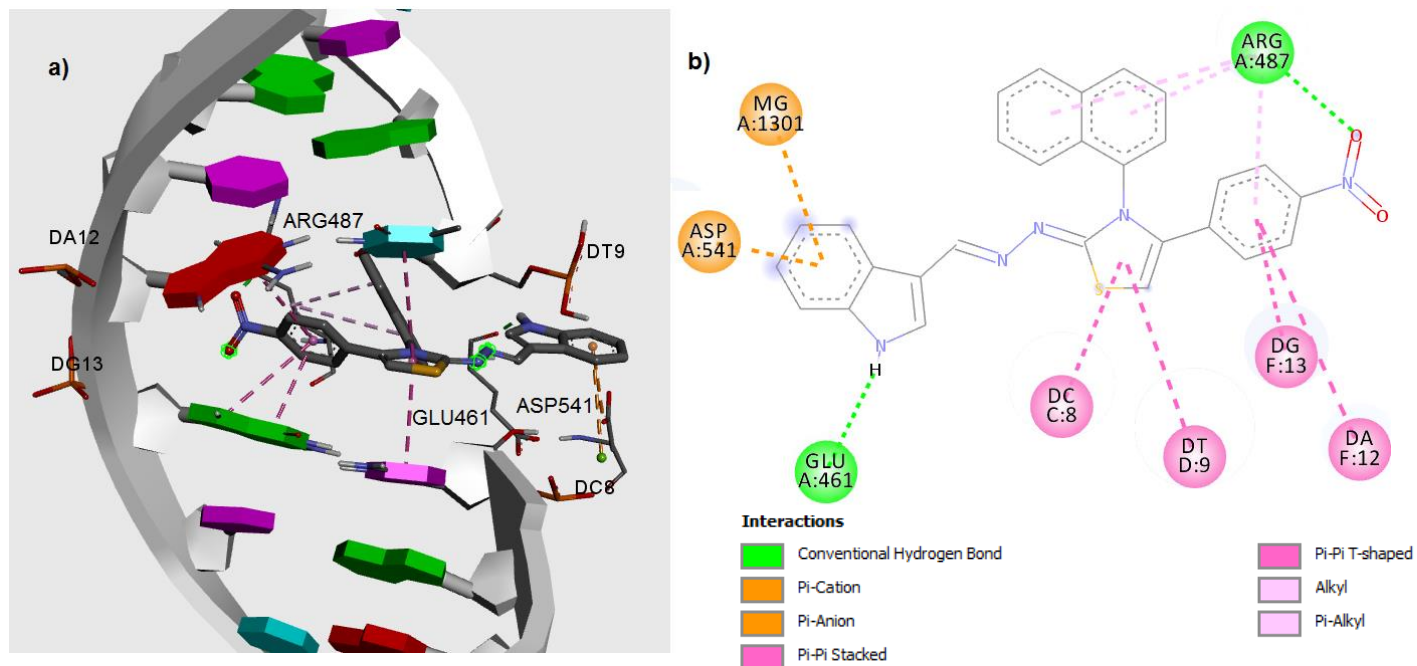
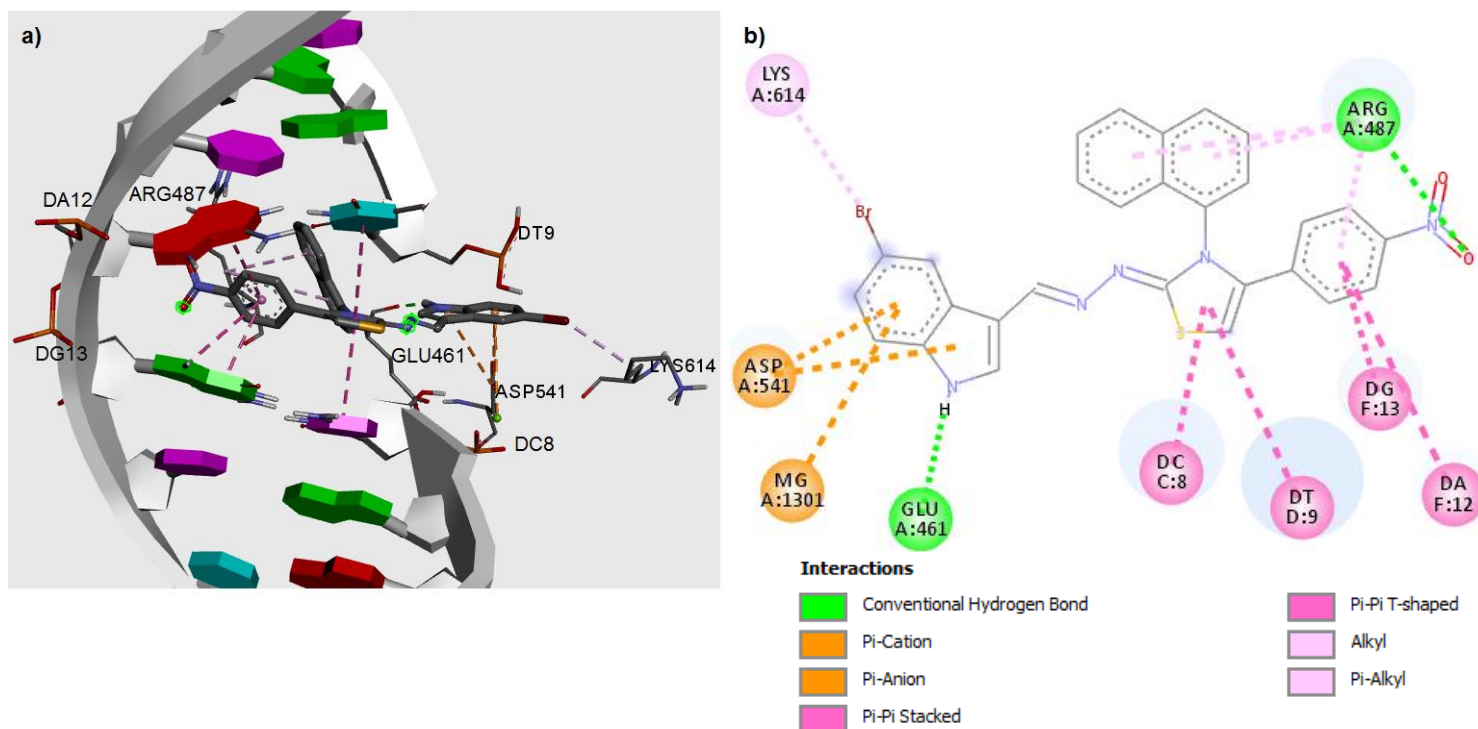


Figura 23: (a) modo de ligação do composto 7c com a topo II α (b) Interações do ligante 7c com os aminoácidos circundantes.



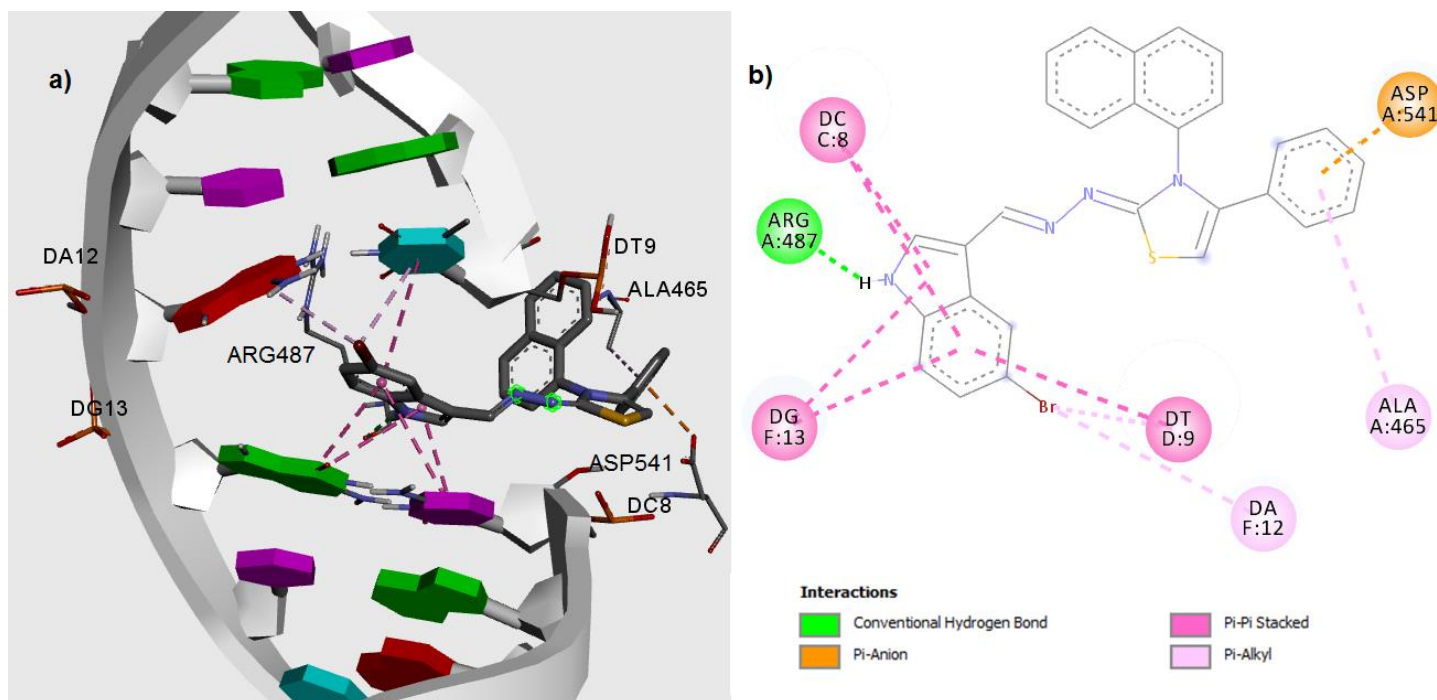
Fonte: elaboração própria

Figura 24: (a) modo de ligação do composto 7e com a topo II α (b) Interações do ligante 7e com os aminoácidos circundantes.



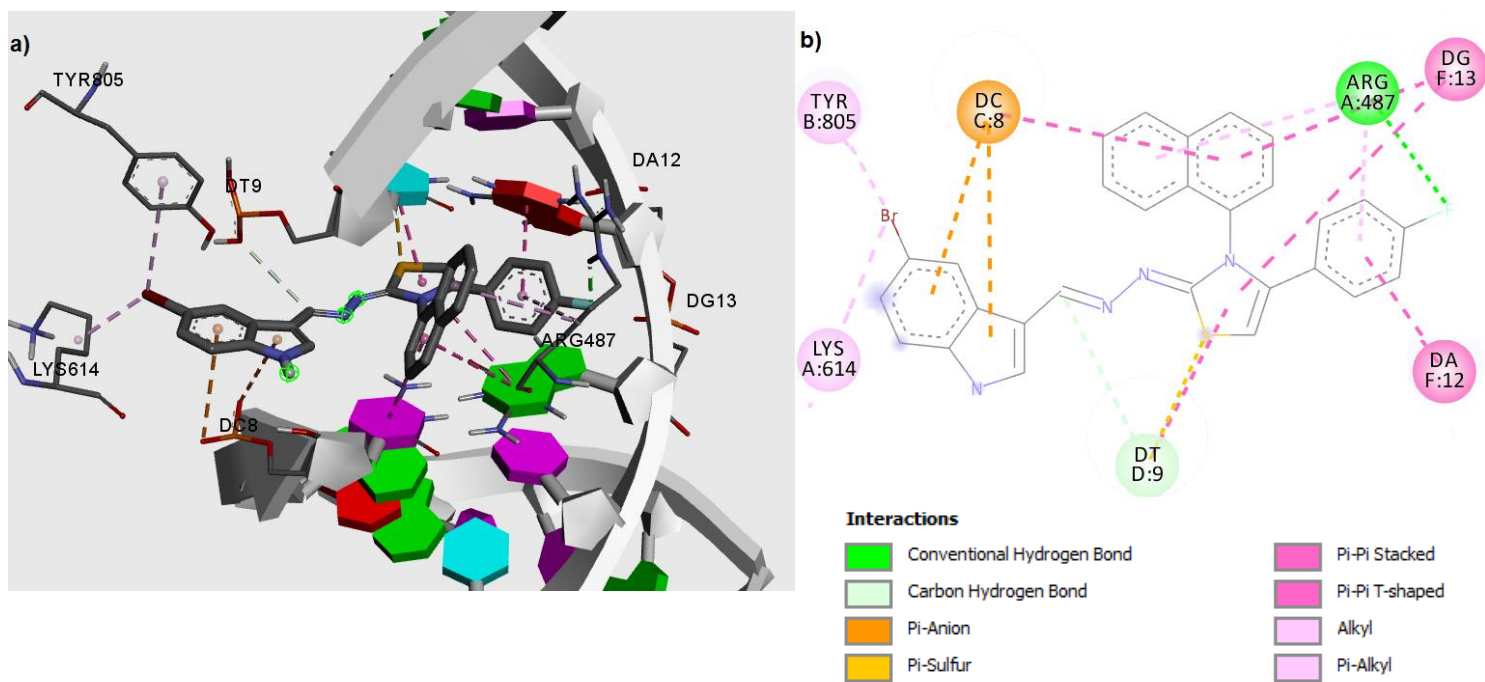
Fonte:Elaboração própria.

Figura 25:(a)modo de ligação do composto 7f com a topo II $\ddot{U}$ (b) Interações do ligante 7f com os aminoácidos circundantes.



Fonte:Elaboração própria.

Figura 26: (a)modo de ligação do composto 7g com a topo II $\ddot{U}$ (b) Interações do ligante 7g com os aminoácidos circundantes.



Fonte: Elaboração própria.