



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



ANA CAROLINE DOS SANTOS CASTRO

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

SERRA TALHADA-PE

Novembro de 2019

ANA CAROLINE DOS SANTOS CASTRO

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

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 licenciada em química.

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

SERRA TALHADA-PE

Novembro de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C355e Castro, Ana Caroline dos Santos
Estudos de docking molecular de derivados da acridina como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II? / Ana Caroline dos Santos Castro. - 2019.
43 f. : il.
- Orientador: Túlio Ricardo Couto de Lima Souza.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Química, Serra Talhada, 2019.
1. Anticâncer. 2. DNA. 3. Farmacocinética. I. Souza, Túlio Ricardo Couto de Lima, orient. II. Título

Ana Caroline dos Santos Castro

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

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

Aprovada em 28/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo de Castro Aguiar

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva

SERRA TALHADA-PE

Novembro de 2019

Resumo

O câncer é uma doença que atinge cerca de 13% da população mundial por ano e possui muitos tipos de tratamentos. Dentre esses tratamentos o mais utilizado é a quimioterapia, que consiste no uso de medicamentos para o controle do tumor. Por este motivo, torna-se necessário o estudo de novos fármacos com atividades antitumorais de forma a aprimorar a terapia, visto que os métodos atuais ainda causam muitos efeitos adversos ao organismo. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar através de estudos de docking molecular, o mecanismo de ação de derivados da acridina que possuem conhecida atividade antitumoral como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II α , bem como suas propriedades farmacocinéticas. Assim, foram selecionadas oito moléculas de um estudo *in vitro*, as quais obtiveram bons resultados experimentais contra sete tipos de tumor, a saber: Mama (MCF-7), Fígado (HEP-2), Colo (COLO-205), (502713), (HCT-15), Pulmão (A-549) e Neuroblastoma (IMR-32). Os dados experimentais coincidiram com os resultados *in silico* do presente estudo, onde para os três tipos de receptores, obteve-se valores de -8,25 kcal·mol⁻¹ a -10,68 kcal·mol⁻¹ de energia de ligação, deixando claro que estes compostos têm alta capacidade de atuação como agente intercalador de DNA. Com isso, é possível afirmar que os resultados do estudo de docking e das propriedades farmacocinéticas indicam que há uma formação de complexos estáveis de derivados da acridina com os receptores, apresentando potenciais de inibição da topoisomerase II α por envenenamento. Isso sugere que os mecanismos utilizados nesse estudo são plausíveis e os compostos possuem propriedades promissoras como agentes antitumorais.

Palavras chaves: Docking Molecular, Anticâncer, Derivados da Acridina, DNA, Topoisomerase II α , Farmacocinética.

Abstract

Cancer is a disease that affects about 13% of the world's population per year and has many types of treatments. Among these treatments the most used is chemotherapy, which consists in the use of drugs to control the tumor. For this reason, it is necessary to study new drugs with antitumor activities in order to improve therapy, since current methods still cause many adverse effects. Thus, our objective was to evaluate through molecular docking studies the mechanism of action of acridine derivatives that have known antitumor activity, such as potential DNA intercalators and topoisomerase II α inhibitors, as well as their pharmacokinetic properties. Thus, eight molecules from an *in vitro* study were selected, which showed good experimental results against seven tumor types, namely: Breast (MCF-7), liver (HEP-2), colo (COLO-205), (502713), (HCT-15), lung (A-549) and neuroblastoma (IMR-32). These coincided with the *in silico* results of the present study, where for the three receptor types, binding energies in the range of -8.25 kcal·mol⁻¹ to -10.68 kcal·mol⁻¹ were obtained, making it clear that these compounds may act as intercalating agents. Thus, one can state that the results of the docking study and the pharmacokinetic properties indicate that there is a formation of stable complexes of acridine derivatives with the receptors, showing potentials for topoisomerase II α inhibition by poisoning. This suggests that the mechanisms used in this study are plausible and these compounds have promising properties as an antitumoral agents.

Keywords: Docking Molecular, Anticancer, Acridine Derivatives, DNA, Topoisomerase II α , Pharmacokinetics.

Lista de Figuras

Figura 1: Desenvolvimento da célula cancerígena para tumores sólidos.	10
Figura 2: Tipos de interação de compostos orgânicos com o DNA.	13
Figura 3: Estrutura química da acridina	15
Figura 4: Estrutura química do indol	15
Figura 5: Estrutura básica dos ligantes (a) 3 e (b) 5.	26
Figura 6: Modos de interação dos derivados da acridina contra a dupla fita do DNA 1BNA.	30
Figura 7: Modos de interação dos derivados da acridina contra a dupla fita do DNA 1Z3F.	31
Figura 8: (A) modo de ligação do composto 3m com a topoisomerase II α . (B) Interações do ligante 3m com os resíduos de aminoácidos circundantes.	34
Figura 9: (A) modo de ligação do composto 5g com a topoisomerase II α . (B) Interações do ligante 5g com os resíduos de aminoácidos circundantes.	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativa <i>in silico</i> de dados farmacocinéticos mensurados nas plataformas SwissADME e pkCSM.....	26
Tabela 2: Energia de ligação para os complexos DNA-ligante.....	29
Tabela 3: Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo Topoisomerase II α	33
Tabela 4: Comparação dos resultados <i>in silico</i> x <i>in vitro</i> , para os complexos ligante-receptor.	37

Lista de Siglas

ADME Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

BHE Barreira Hematoencefálica

C Citosina

DNA Ácido Desoxirribonucleico

G Guanina

MET Metionina

PDB Protein Data Bank

RNA Ácido Ribonucleico

RO5 *Rule of five*

SNC Sistema Nervoso Central

T Timina

3D Tridimensional

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1.	Câncer	10
1.1.1.	DNA como alvo	12
1.1.2.	Topoisomerase como alvo.....	13
1.2.	Química medicinal	14
1.2.1.	Derivados acridina	14
1.2.2.	Indol	15
1.2.3.	Artigo escolhido para o estudo	17
1.3.	Uso de ferramentas <i>in silico</i> no desenvolvimento de fármacos.....	17
1.3.1.	Estudo ADME	17
1.3.2.	Regra de Lipinski	18
1.3.3.	Regra de Veber.....	19
1.3.4.	Outros parâmetros	19
1.3.4.1.	Permeabilidade Caco2	19
1.3.4.2.	Permeabilidade na barreira hematoencefálica	19
1.3.4.3.	Volume de distribuição.....	20
1.4.	Docking molecular.....	20
2.	METODOLOGIA.....	23
2.1.	TRATAMENTO DO RECEPTOR.....	23
2.3.	CÁLCULO DO GRID E DOCKING	24
2.3.1.	DNA (1BNA).....	24
2.4.	ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1.	CÁLCULO DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPLEXOS DNA	28
3.2.	DOCKING COM A TOPOISOMERASE II α	31

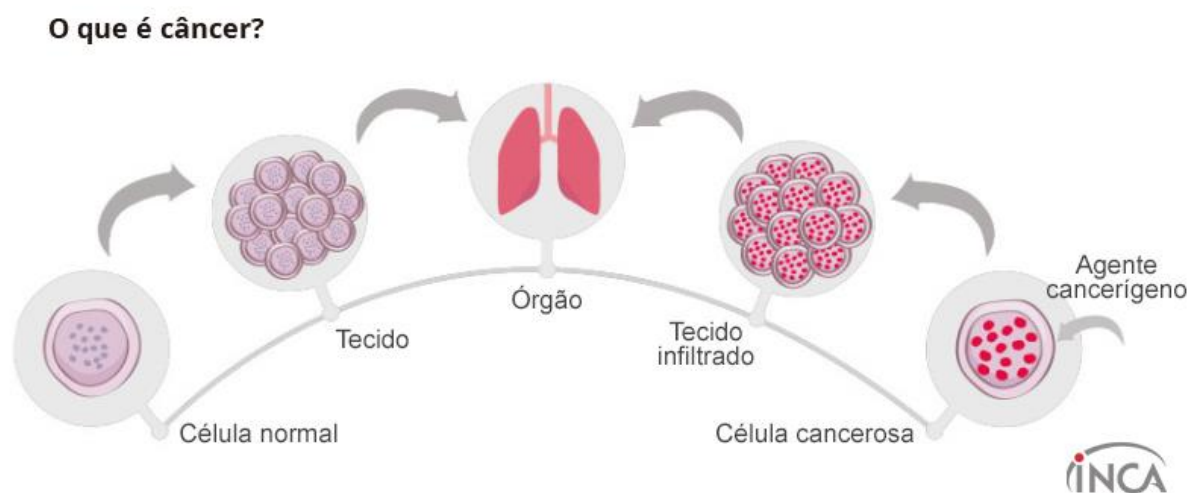
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5.	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2019), câncer é a palavra utilizada para denominar um grupo de mais de 100 enfermidades que possuem a multiplicação desordenada de células como característica principal, essas células podem invadir tecidos e órgãos. O DNA contém toda informação da célula, ele serve de transporte para que o cromossomo passe todas as informações celulares e assim a célula tenha um bom funcionamento. O aparecimento da carcinogênese (formação do câncer) se dá a partir de falhas nos mecanismos que regulam os processos de divisão, mortalidade e localização da célula (NELSON; COX, 2014). A representação da formação da célula cancerígena é mostrada na Figura 1.

Figura 1: Desenvolvimento da célula cancerígena para tumores sólidos.



Fonte: INCA, 2019.

O crescimento da célula acontece com o auxílio dos proto-oncogenes, genes que codificam as proteínas que regulam o crescimento, podendo estes genes sofrerem uma mutação. A partir dessa mutação os proto-oncogenes se transformam em oncogenes (genes mutantes de proteínas reguladoras), este segundo tem relação com o surgimento de células cancerígenas. Fatores que podem contribuir com esse surgimento estão relacionados com a hereditariedade, contato direto ou indireto com compostos tóxicos ou radioativos que podem causar mutação no DNA de uma célula não cancerígena causando danos (NELSON; COX, 2014).

Ainda pode acontecer de uma única célula ficar exposta a compostos carcinogênicos em um tecido, causando danos ao DNA por meio de uma de suas proteínas reguladoras. No entanto, de modo geral, as pessoas adquirem a enfermidade por influência de fatores genéticos e fatores externos, como o contato com produtos radioativos, por exemplo (NELSON; COX, 2014).

De acordo com dados apontados pelo INCA, a estimativa é de aproximadamente 1,2 milhão de novos casos da doença no Brasil entre 2018 e 2019. Em 2018, foram registrados 582 mil novos casos, onde 300 mil eram em homens e 282 mil em mulheres. Segundo o estudo, três de dez casos estão relacionados a como as pessoas vivem, pois as chances de desse índice subir aumentam quando as pessoas possuem hábitos como tabagismo, consumo de álcool, sedentarismo, obesidade e exposição excessiva ao sol (INCA, 2019).

Apesar dos muitos estudos realizados para que haja uma melhoria nas terapias contra o câncer, ainda não foi encontrada a cura do mesmo para boa parte dos tipos de tumor. Os principais tipos de terapia utilizados são: tratamento cirúrgico; radioterapia; quimioterapia; terapia alvo-direcionada; e hormônio terapia. A maioria desses tratamentos é sistêmica, ou seja, a droga percorre a corrente sanguínea por todo o corpo, com exceção da cirurgia e radioterapia que são locais. Comumente as terapias são feitas de forma combinada, com sequências testadas clinicamente (ALMEIDA, 2015).

Dentre os tratamentos citados anteriormente a quimioterapia é a mais utilizada na maioria dos cânceres, juntamente com a radioterapia. A quimioterapia consiste no uso de medicamentos de modo a controlar o tumor. Compostos quimioterápicos têm como principal função destruir ou bloquear o crescimento de células cancerígenas (INCA, 2019; ALMEIDA, 2015). A quantidade de moléculas disponíveis para o tratamento antitumoral é enorme. Contudo, ainda não são suficientes para atuar em todos os tipos de tumor, sem contar com os efeitos adversos que estão relacionados ao uso da maioria desses compostos. Por este motivo, os estudos continuam, a fim de se obter um quimioterápico eficiente e menos agressivo ao organismo, amenizando seus efeitos colaterais (ALMEIDA, 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Segundo o trabalho de Dobbstein e Moll (2014), o desenvolvimento de fármacos anticâncer pode ser dividido dentro de três “épocas” ou “ondas” que emergiram sequencialmente. Primeiro, foram desenvolvidos fármacos que bloqueavam principalmente a replicação do DNA e a divisão celular. Depois, fármacos direcionados contra intermediários de vias de sinalização que contribuem para o crescimento do câncer, como por exemplo, receptores e quinases. Por último, estão sendo desenvolvidos fármacos direcionados contra a maquinaria celular que é essencial para o crescimento e

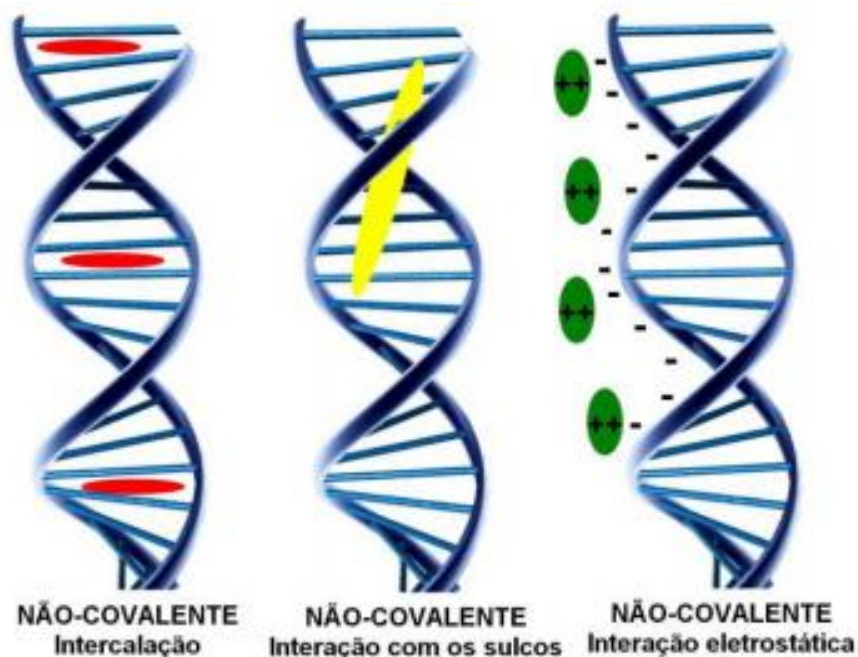
sobrevivência tumoral. Esses últimos já estão disponíveis no mercado, como o inibidor de proteassoma bortezomib (Velcade; Millennium Pharmaceuticals) utilizado contra o mieloma múltiplo (ALMEIDA, 2015, p.30 apud DOBBELSTEIN, MOLL, 2014).

1.1.1. DNA como alvo

Mesmo descoberto há mais de sessenta anos, o DNA continua sendo alvo de estudos, isso se explica pelo seu papel na elucidação e diagnóstico de enfermidades, além de ser alvo de várias terapias as quais têm como principal foco a dupla fita do DNA. A formação da estrutura do DNA é feita pela união de duas fitas complementares de ácidos nucléicos, essas fitas são constituídas por nucleotídeos ligados através da ligação fosfodiéster. As bases são heterocíclicas, sendo elas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). As estruturas são formadas principalmente através de ligações de hidrogênio, isto caracteriza a forma do DNA, que por terem suas bases empilhadas formam uma dupla hélice. As bases interagem de forma complementar na formação das ligações de hidrogênio de modo que A interage com T e C interage com G. Na parte do meio do DNA, temos um esqueleto formado pelo açúcar-fosfato, formando dois sulcos diferentes, sendo eles o sulco maior e o sulco menor. Todas essas propriedades do DNA servem como alvo para fins terapêuticos, e por isso, ele é tão explorado (ALMEIDA, 2015).

As moléculas orgânicas podem interagir com o DNA de três formas: através dos sulcos (maior ou menor), através da intercalação entre os pares de base do DNA ou por meio de interações eletrostáticas (Figura 2). Essas interações por meio dos sulcos e intercalação são resultado de interações de empilhamento π , ligações de hidrogênio e interações de van der Waals ou hidrofóbicas entre os ligantes e a dupla hélice. A ligação ocorre por meio da transferência do ligante hidrofóbico do meio aquoso polar para o interior do DNA (meio menos polar). As ligações eletrostáticas são descritas para ligações que se ligam ao DNA externamente, com carga negativa por meio de uma interação não específica. A Figura 2 mostra as principais formas de interação de moléculas com o DNA (RODRIGUES, 2019; ALMEIDA, 2015)

Figura 2: Tipos de interação de compostos orgânicos com o DNA.



Fonte: BARRA; NETTO, 2015.

1.1.2. Topoisomerase como alvo

As topoisomerasas são enzimas que estão presentes em todo nosso organismo. Elas têm como função controlar a clivagem das fitas de DNA sendo cruciais na replicação. Por este motivo compostos que atuam na inibição dessa enzima estão entre as drogas mais eficientes usadas como anticâncer (GOUVEIA; MOURA, 2016).

Essas enzimas são importantes, pois elas são responsáveis pelo processo de desligamento e religamento das fitas através do complexo enzima-DNA. Este processo resulta no relaxamento da estrutura nos processos de replicação, transcrição ou recombinação. Esta propriedade é modificada através de uma reação de transesterificação da topoisomerase com as fitas de DNA, onde um par de tirosinas atacam duas ligações fosfodiéster de quatro pares de bases em cadeias de DNA opostas, resultando em duas ligações fosfotirosil entre a enzima e o DNA. Isto permite que as dupla hélices passem umas pelas outras. (NELSON; COX, 2014; ALMEIDA, 2015).

Essas enzimas são divididas em dois tipos: topo I e topoisomerase II, onde a I corta uma fita de DNA e a II duas fitas. A topoisomerase II possui duas isoformas: Topoisomerase II α , essa é essencial no processo de mitose, pois está diretamente associada ao processo de proliferação; e a Topoisomerase II β que é essencial no desenvolvimento normal de todas as células. Os dois tipos de topoisomerase interagem com o DNA através do mesmo mecanismo,

que consiste no ataque nucleofílico de um resíduo tirosil à ligação fosfodiéster do DNA, sendo diferenciadas apenas pelo fato de a I quebrar uma fita e a II quebrar duas fitas (ALMEIDA, 2015).

Estudos elegantes realizados no organismo geneticamente tratável, *Saccharomyces cerevisiae*, indicam que os compostos direcionados à topoisomerase matam as células não simplesmente inibindo a catálise da topoisomerase, mas estabilizando o intermediário da reação normalmente transitória na qual a enzima está ligada covalentemente ao DNA. Assim, esses compostos são frequentemente chamados de "venenos" da topoisomerase e aumentam a taxa de clivagem do DNA ou diminuem a taxa de religação do DNA pela topoisomerase (RUBIN; HAIT, 2003).

Desta forma, os inibidores da topoisomerase se ligam ao DNA, à topoisomerase ou a uma molécula na região ou perto da região da enzima envolvida na formação da ligação covalente DNA-proteína. Muitos inibidores da topoisomerase, como as antraciclinas e a actinomicina D, são compostos hidrofóbicos relativamente planos que se ligam ao DNA com alta afinidade por intercalação, o que envolve o empilhamento do composto entre pares de bases adjacentes. (RUBIN; HAIT, 2003)

1.2. Química medicinal

1.2.1. Derivados acridina

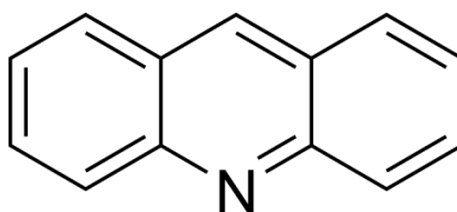
Ainda que haja muitos progressos no desenvolvimento de compostos para o tratamento e produção de vacinas para a prevenção do câncer, os compostos orgânicos com massa molecular pequena ainda são o principal foco como alternativa de droga utilizada na terapia antitumoral, por motivos de: serem moléculas com uma síntese mais rápida, o contrário das moléculas de massa molecular maior; por serem moléculas pequenas, têm maior facilidade de penetrar nos tumores, podendo alcançar um maior número de células; e a possível formação de compostos complementares que atuam na inibição de proteínas alvos que têm um mau funcionamento na célula tumoral, tendo como consequência a morte celular (ALMEIDA, 2015).

Sendo um composto orgânico heterocíclico de nitrogênio, a acridina (Figura 3), $C_{13}H_9N$, e seus derivados possuem atividades biológicas associadas à habilidade de intercalação do DNA. Com a descoberta de que suas propriedades permitiam que esses compostos agissem como antitumorais, antiparasitários e antibacterianos, tornou-se mais acentuado o estudo com os mesmos. Sua propriedade antitumoral foi mencionada após a I Guerra Mundial, sendo inserido em clínica para o tratamento do câncer em 1970. Sua intercalação com o DNA acontece por causa da protonação do nitrogênio do anel acridínico

em condições neutras, gerando assim derivados carregados positivamente (ALMEIDA, 2015; GOUVEIA; MOURA, 2016; BARROS et al., 2012).

A acridina é um alcaloide derivado do antraceno, sendo conhecida pelos nomes de dibenzopiridina, 2,3,5,6-dibenzopiridina e 10-azaantraceno. A acridina tem um odor irritante, quando cristalizada apresenta cor amarelo claro com ponto de fusão de 110 °C e ponto de ebulição de 346 °C. É caracterizada por ação irritante sobre a pele e emite fluorescência azul em solução (ALMEIDA, 2015, p. 53 apud KUMAR et al., 2012).

Figura 3: Estrutura química da acridina



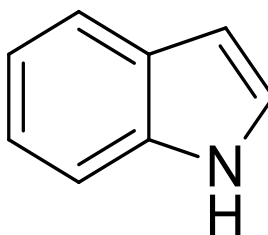
Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acridine_structure.png

Muitos derivados da acridina foram sintetizados com o objetivo de terem suas propriedades biológicas avaliadas, tendo como propriedade mais analisada a correlação entre sua ligação ao DNA e o potencial citotóxico, pois intercaladores com altas constantes de ligação ao DNA seguem uma tendência de possuir maior citotoxicidade (ALMEIDA, 2015).

1.2.2. Indol

O indol é formado por um anel benzênico ligado a um anel pirrol (Figura 4), por isto é classificado como um composto orgânico aromático. Sua característica heterocíclica pode ser encontrada em produtos naturais de várias plantas. A quantidade de moléculas que contém o núcleo indólico para fins farmacêuticos é enorme, pois esses são agentes que possuem grande potencial terapêutico. Por este motivo há uma grande busca de procedimentos de síntese para compostos semelhantes aos indóis condensados com distintos heterocíclicos (LAFAYETTE, 2016; ELSAYED, et al., 2015).

Figura 4: Estrutura química do indol



Fonte: elaboração própria

A presença do par de elétrons do nitrogênio no núcleo indólico, deixa ele rico em elétrons, isso torna-o altamente reativo, principalmente em reações de substituição eletrofílica (SUNDBERG, 2010). Como muitos compostos que possuem este núcleo são bastante explorados devido suas atividades biológicas, os anéis indólicos são muito estudados em várias áreas da química. Estudos realizados pela literatura evidenciam que este núcleo é um importante centro reativo de moléculas no que se refere a estrutura-atividade quantitativa (LAFAYETTE, 2016). Por mais que o anel indólico seja um núcleo pequeno, ele é também explorado não apenas pelas suas atividades relacionadas exclusivamente ao núcleo indólico, mas também por suas atividades oriundas de seus derivados substituídos (YAN et al. 2016; LAFAYETTE, 2016).

Uma ampla revisão foi realizada por Sharma, Kumar e Pathak (2010) sobre a importância biológica do núcleo indol. Estes demonstraram estudos e a eficiência em diversos efeitos farmacológicos, entre eles: anti-inflamatório e analgésico, antimicrobiano, antitumorais, inibidor do HIV, inibidor da lipooxigenase, tuberculostático, antihipertensivo, antihistamínico e outros (LAFAYETTE, 2016, p. 33 apud SHARMA; KUMAR; PATHAK, 2010).

Estudos mais atuais relatam que derivados contendo o núcleo indol possuem várias atividades biológicas, dentre elas temos as ações antiasmáticas, antiarritmias, inibidor da RNA polímerase e antiesquezofrênico, enaltecendo ainda mais a importância de se explorar derivados que contém esse grupamento (SHARMA; KUMAR; PATHAK, (2010); LAFAYETTE, 2016).

Segundo Gouveia e Moura (2016), diversos trabalhos descrevem testes a fim de se avaliar a citotoxicidade dos derivados de acridina frente à linhagens celulares. Sendo os principais testes feitos nas linhagens das células de: leucemia humana (HL-60), carcinoma laríngeo humano (Hep-2), células embrionárias do rim, adenocarcinoma de pulmão humano, mama (T47D), pulmão (NCI H-522), cólon (HCT-15), dos ovários (PA-1), e do fígado (Hep G2).

Contribuindo, Lafayette (2016) aponta que devido suas propriedades intercaladoras ao DNA de células alvo e inibição da topoisomerase, as acridinas são consideradas moléculas com atividade antitumoral. Essa atividade biológica é influenciada por dois aspectos: a presença de substituintes ligados diretamente ao anel acridínico e onde se localiza a natureza dos substituintes ligados ao núcleo heterocíclico. Dentre todos os derivados da acridina já estudados e testados, apenas a amsacrina é utilizada em clínica.

1.2.3. Artigo escolhido para o estudo

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo o estudo do mecanismo de ação dos derivados da acridina com potencial antitumoral que, de acordo com Sondhi et al. (2010), possuem alta capacidade inibidora da topoisomerase II e boa intercalação com os pares de base do DNA, levando a parada do ciclo celular e apoptose. Segundo Sondhi et al. (2010), é necessária a síntese de derivados da acridina devido a sua capacidade de atividade biológica tanto como agente anticâncer como anti-inflamatório. Assim, estes autores reportam a síntese das acridinas 9-cloro-2,4 e avaliadas suas atividades antitumorais *in vitro* contra mama (MCF-7), fígado (HEP-2), cólon (COLO-205, 502713, HCT-15), pulmão (A-549), neuroblastoma (IMR-32), ovário (OVCAR-5) e próstata (DU-145, PC-3). Os autores concluíram que os compostos exibiram boas propriedades na atividade anticâncer contra sete linhas celulares das citadas acima, isto é, mama(MCF-7), fígado (HEP-2), cólon (COLO-205, 502713, HCT-15), pulmão(A-549) e neuroblastoma (IMR-32).

1.3. Uso de ferramentas *in silico* no desenvolvimento de fármacos

O uso de ferramentas com análise *in silico* tem como objetivo levantar hipóteses, dando um direcionamento para testes *in vitro* e/ou *in vivo* para que estes tenham maior possibilidade de êxito. Geralmente é inviável testar um grande número de compostos isolados ou sintetizados em diferentes tipos de atividade e alvos biológicos, pois requer tempo e recursos financeiros. Assim, algumas técnicas que predizem o que pode acontecer, como a análise *in silico*, trazem maior segurança para ensaios biológicos, otimizando desta forma o tempo e recursos que são necessários (OLIVEIRA, 2014). Por este motivo, métodos toxicológicos *in silico* demonstram grande utilidade no que se refere a produção de informação para a indústria farmacêutica e grupos de pesquisa em Universidades de planejamento de desenvolvimento de fármacos, tornando possível a identificação em fase pré-clínica de compostos com baixo potencial toxicológico (BRITO, 2011).

1.3.1. Estudo ADME

Para a indústria farmacêutica, é de grande importância a consideração de parâmetros farmacocinéticos como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), devido à grande quantidade de compostos em fase de desenvolvimento ter sua formação interrompida por causa de problemas farmacocinéticos como a baixa biodisponibilidade, alta toxicidade e interações medicamentosas não desejadas (SOUZA, 2019).

Os parâmetros ADME são imprescindíveis no funcionamento terapêutico de um composto biodisponível. Sua absorção está relacionada a sua capacidade de ultrapassar a bicamada lipídica e a solubilidade. Da mesma forma, a distribuição é influenciada por estes fatores, e também está relacionada à ligação do fármaco às proteínas plasmáticas (responsáveis pelo transporte da molécula até o alvo desejado). O metabolismo é um componente decisivo na biodisponibilidade de um fármaco. Um fármaco com estabilidade metabólica baixa precisará de mais doses durante a terapia. Enquanto que um fármaco com estabilidade metabólica tem um tempo de meia-vida maior e assim se torna pouco seguro. Outras questões também podem interferir no metabolismo do fármaco, como interações medicamentosas que pode causar diminuição na sua eficácia. Desta forma, tomar conhecimento das propriedades ADME através da análise *in silico* é indispensável, visto que este método torna mais seletivo a escolha dos compostos antes de se realizar testes experimentais, além de poupar gastos excessivos de tempo e recurso (SOUZA, 2019).

1.3.2. Regra de Lipinski

Christopher A. Lipinski e colaboradores trabalhavam para a Pfizer, quando observaram através de um estudo com 2000 fármacos que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que os mesmos mostrassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, aspectos importantes para a disponibilidade oral (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2017). Os resultados obtidos pelo estudo de Lipinski trouxe a chamada regra dos cinco de Lipinski ou “*rule of five*” (RO5). A RO5 vem para ajudar os químicos medicinais no que se refere a modificações químicas, no intuito de diminuir a quantidade de compostos com propriedades equivocadas. Na RO5, os principais parâmetros são: logP, número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio e massa molecular (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2017).

A RO5 ainda propõe que para uma má absorção ou permeação no organismo o composto precisa possuir mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, massa molecular maior que 500 Da e sua lipofilicidade expressa como $\log P$ calculado ($C \log P$) maior do que 5 (ou $M \log P > 4,15$). Estes parâmetros ficaram conhecidos como RO5 pelo fato de todos os valores das propriedades serem múltiplos de cinco (LIPINSKI et al., 2012; SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2017).

1.3.3. Regra de Veber

Posteriormente, Veber et al. (2002) buscaram investigar quais as propriedades estruturais aumentavam a biodisponibilidade oral em ratos. Com tal investigação, concluíram que a área de superfície polar e a flexibilidade molecular, bem como o número de ligações de hidrogênio são parâmetros determinantes da biodisponibilidade oral. Com isso propuseram que um composto, para apresentar uma boa biodisponibilidade oral, deve satisfazer os critérios: ligações rotacionáveis ≤ 10 e área de superfície polar $\leq 140\text{\AA}^2$.

1.3.4. Outros parâmetros

A prognose da absorção intestinal de drogas baseada exclusivamente em propriedades físico-químicas (pKa, lipofilicidade e solubilidade) não é suficiente. Assim, são usados modelos *in vitro* da mucosa intestinal, modelos estes que nos possibilitam uma avaliação da absorção por meio da permeabilidade em membranas, um dos principais parâmetros para a absorção de fármacos por via oral (MATOS, 2016).

1.3.4.1. Permeabilidade Caco2

O processo de avaliação de absorção oral de compostos é bastante complexo e exige vários métodos *in vitro*, como por exemplo o sistema de monocamada de células Caco-2 – derivadas de adenocarcinoma de cólon–. Por ser baseado em células humanas, é bastante utilizado em estudos de permeabilidade intestinal. Estudos revelam que a absorção oral de compostos em humanos tem uma boa correlação com sua permeabilidade em células Caco-2 nos dando informações importantes na estimativa dos compostos administrados por via oral (MATOS, 2016).

Quando as células Caco-2 são cultivadas como células normais, captam muitas características morfológicas destas últimas, diferenciando-se em enterócitos. Comumente cultivadas em placas de cultura transpoço, essas células são elaboradas exclusivamente para testes de absorção de drogas. De acordo com a literatura, moléculas com permeabilidade $<1 \cdot 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, entre 1 e $10 \cdot 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ e $>10 \cdot 10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ classificam-se, respectivamente, como fármacos pouco absorvidos (0-20%), moderadamente absorvidos (20-70%) e bem absorvidos (70-100%). Ainda é importante ressaltar que testes de permeabilidade em Caco-2 contém certas limitações que podem resultar numa não absorção intestinal (MATOS, 2016).

1.3.4.2. Permeabilidade na barreira hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura de permeabilidade bastante seletiva, que tem por função a proteção do sistema nervoso central (SNC) contra substâncias

neurotóxicas. Ela também atua limitando e regulando o cambio de substâncias entre o sangue e o SNC (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011). A BHE possui uma impermeabilidade resultante de propriedades baseadas na permeabilidade do endotélio, sem contar que há presença de enzimas degradantes em grande quantidade no interior do endotélio, fazendo com que gases como CO₂, O₂ e determinadas moléculas lipossolúveis demasiado pequenas consigam passar de forma integral com exceção da água (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011).

São várias as vias pelas quais as moléculas podem passar pela BHE, podendo se destacar a via transcelular: este transporte está limitado a pequenas moléculas lipossolúveis que se espalham através da bicamada lipídica e entram no SNC. Comumente, estas moléculas apresentam massa molecular < 500 Da, log P entre 2-4 e número de doadores de ligações de hidrogênio <5. São exemplos, pequenas moléculas gasosas (CO₂ e O₂), etanol, cafeína, etc (MENDONÇA, 2016).

1.3.4.3. Volume de distribuição

O volume de distribuição (Vdss) de uma droga nos possibilita saber o volume no qual certa quantidade de fármaco precisa para se distribuir uniformemente no organismo de modo que sua concentração se iguale à concentração do plasma sanguíneo, ou seja, se esta consegue chegar no alvo de interesse com a concentração adequada. O Vdss pode aumentar através da lipossolubilidade, o que indica uma baixa concentração plasmática e uma alta concentração tecidual, ou seja, o fármaco se distribui apenas no tecido e não no plasma (FEDERICO et al., 2017; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015)

Fármacos lipofílicos têm maior facilidade de entrar no SNC que os hidrofílicos. Contudo, dependendo do estado neste local, pode-se aumentar a solubilidade de algumas drogas hidrofílicas, facilitando sua penetração, no entanto estes precisam ser manipulados em maiores doses para um bom resultado terapêutico. Outros locais como, pulmão, próstata e osso devem seguir o mesmo procedimento de manipulação para drogas com pouca penetração. O Vdss é considerado baixo se apresentar valores de log(Vdss) abaixo de -0,15 e alto se apresentar valores de log(Vdss) acima de 0,45 (FEDERICO et al., 2017; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

1.4. Docking molecular

Fazer uso de instrumentos computacionais a fim de se tomar conhecimento em um nível micro das interações de complexos proteína-ligante é fundamental para a descoberta de novas drogas, pois com o emprego dessas ferramentas torna-se possível fazer análise de

moléculas com capacidade de se ligar a sítios receptores específicos, otimizando tempo e diminuindo gastos relacionados aos processos de desenvolvimento de fármacos. (COUTINHO e MORGON 2007). Dois componentes principais fazem parte do docking molecular para a investigação de como é o comportamento de ligantes com seus receptores em atividades biológicas: o algoritmo de busca e a função de avaliação, estes são responsáveis, respectivamente, por pesquisar distintas conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo; além de serem responsáveis por apresentar uma estimativa das afinidades de ligação das conformações geradas, mostrando a melhor conformação de modo que o complexo formado apresente uma ligação favorável, que é caracterizado por ser o composto com menor energia de ligação (COUTINHO e MORGON 2007).

Os métodos de docking são utilizados para identificar a afinidade a nível atômico de uma molécula dentro do sítio ativo de um receptor, indicando a conformação e orientação do ligante no sítio ativo, além de estimar a afinidade de ligação. É importante tomar conhecimento do local do sítio de ligação antes dos processos de encaixe, para que haja eficiência nesse encaixe. Na maioria dos casos, o sítio de ligação é conhecido antes da acoplagem de ligantes neste sítio (MENG et al., 2011).

Os métodos de docking molecular se tornaram ferramentas cruciais no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente com o grande avanço da biologia molecular e o desenvolvimento de técnicas de purificação de proteínas, cristalografia de raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A partir dessas técnicas tornou-se mais acessível o conhecimento a nível molecular de diversos receptores biológicos. Bancos de dados com estruturas biológicas, como o *protein data bank* (PDB), são um exemplo de ferramentas disponibilizam estruturas 3D de proteínas e ácidos nucleicos com acesso disponível para o público (MENG et al., 2011).

Embora os processos de reconhecimento molecular realizado pelo docking sejam bastante complexos devido as mudanças de conformação sofridas tanto pelo ligante quanto pelo receptor, os programas de docking agregaram algoritmos mais elaborados, que levam em consideração a flexibilidade do ligante, assim o método se torna cada vez mais preciso e de qualidade (RODRIGUES et al., 2012).

O programa usado nesse estudo foi Autodock4.2.6. O motivo da escolha foi o fato deste programa além de ser muito utilizado, também apresenta resultados satisfatórios que condizem com resultados experimentais. Em conjunto com o programa AutoGrid 4.0, o Autodock gera uma espécie de caixa (grid) com o intuito de diminuir o custo computacional. Para a elaboração dessa “caixa” de energia, é necessário que um pré-cálculo seja feito da

energia de interação entre átomos do ligante e do receptor, para por conseguinte o Autodock realizar o cálculo determinando a 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 (RODRIGES, 2019, p. 23 apud HUEY, et al., 2007).

Com isso nesse trabalho temos como objetivo, realizar o estudo computacional de docking molecular de compostos derivados da acridina com potencial atividade antitumoral e analisar sua interação com os receptores biológicos DNA (sendo duas estruturas: 1Z3F e 1BNA) e Topoisomerase II α . Além de analisar suas propriedades físicoquímicas que afetam as características farmacocinéticas; prever suas propriedades farmacocinéticas relacionadas com as etapas de absorção e distribuição e analisar as principais interações intermoleculares para formação do complexo proteína-ligante.

2. METODOLOGIA

A princípio foram selecionadas oito moléculas do artigo de Sondhi et al., (2010) sendo respeitados seus respectivos códigos originais. Em seguida buscou-se a estrutura cristalográfica dos receptores biológicos utilizados nesse estudo, a saber: topoisomerase II α e dois tipos de DNA, no banco de dados *protein data bank* (PDB).

- I. Foi obtido a estrutura cristalográfica da enzima topoisomerase II α em complexo com o DNA e o fármaco etoposídeo, ID: 5GWK, resolução de 3,152Å,
- II. As estruturas do DNA foram obtidas com o código, ID: 1BNA e 1Z3F, resolução 1,9Å e 1,5Å, respectivamente.

2.1. TRATAMENTO DO RECEPTOR

Inicialmente no programa Discovery Studio 2017, foram removidos o ligante amsacrina da topoisomerase II α (5GWK) e o ligante elipticina do DNA (1Z3F). Depois da remoção dos ligantes da estrutura cristalizada do complexo, todos os receptores foram tratados seguindo os métodos descritos a seguir: com o programa Discovery Studio 2017, foram removidas as moléculas de água da estrutura cristalográfica dos receptores e a adição de átomos de hidrogênio polares e as cargas de Kollman foi realizada com o auxílio do programa AutoDockTools v.1.5.6.

2.2. TRATAMENTO DOS LIGANTES

Os oito ligantes derivados da acridina foram desenhados no programa Avogadro e salvos no formato adequado para pré-otimização utilizando o método MMFF94. 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, conseqüentemente, 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 AutoDockTools v.1.5.6, foram abertos os ligantes *pdb*, removidos os hidrogênios apolares, computado as cargas de Gasteiger e posteriormente todos os ligantes foram salvos no formato *pdqt*.

2.3. CÁLCULO DO GRID E DOCKING

Os arquivos *dpf* foram criados para as 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.

2.3.1. DNA (1BNA)

Os ácidos nucleicos são estruturalmente diferentes das proteínas e não possuem um sítio ativo definido de ligação, logo para 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* para o 1BNA nos eixos X, Y e Z de: 90x90x90Å, e o espaçamento do *grid* foi de 0,375Å, o centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 14,779, 20,976 e 8,804Å.

2.3.2. DNA (1Z3F)

No caso desse ácido nucleico o sítio ativo escolhido foi o sítio de intercalação, logo para analisar as interações dos ligantes com o DNA foi criada uma caixa para englobar o sítio de intercalação do DNA. O docking foi processado com as dimensões do *grid* para o 1Z3F nos eixos X, Y e Z de: 60x42x42Å, e o espaçamento do *grid* foi de 0,375Å, o centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 0,452, 17,567 e 45,604Å.

2.3.3. TOPOISOMERASE II α (5GWK)

Conhecido o sítio ativo da enzima o cálculo de docking foi processado com as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z de: 60x60x60Å, espaçamento padrão (valor de 0,375Å), o centro da grade nos eixos X, Y e Z foi definido como 24,5, -38,148, -59,54Å.

2.4. ANÁLISE DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

A observação das principais interações dos compostos em estudo com os resíduos da topoisomerase II α 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:

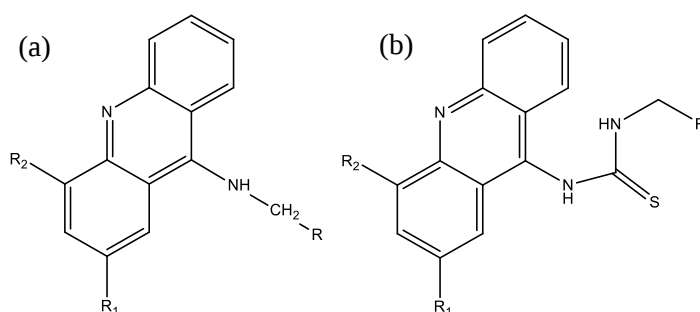
http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction/adme_1531024248.18/;

<http://www.swissadme.ch/index.php>.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A previsão dos parâmetros ADME foram elaborados a fim de se avaliar as informações farmacocinéticas dos compostos em análise (Figura 5). Segundo Gouveia et al. (2018), duas maneiras são comumente usadas para se avaliar o potencial de biodisponibilidade oral de um fármaco: através das Regras de Lipinski e Veber. Os resultados dos parâmetros obtidos estão dispostos na Tabela 1.

Figura 5: Estrutura básica dos ligantes (a) 3 e (b) 5.



Fonte: SONDHI et al., 2010.

Tabela 1: Estimativa *in silico* de dados farmacocinéticos mensurados nas plataformas SwissADME e pkCSM.

#	Massa molar	MLogP	A.H.	D.H.	L.R.	TPSA	Ali Log S	Permeabilidade Caco2	Absorção intestinal (%)	VDss	Permeabilidade BHE
3c	288,35	2,82	3	1	3	38,06	-4,99	1,638	94,8	0,080	0,437
3e	334,44	3,32	4	1	5	62,39	-5,88	1,745	93,0	0,108	0,128
3g	332,41	2,04	5	1	6	51,97	-4,34	1,403	95,6	0,669	0,183
3j	308,38	2,42	4	1	4	43,38	-4,5	1,36	95,6	0,551	0,230
3m	367,45	3,42	3	2	5	49,94	-6,38	1,004	93,8	-0,022	0,187
5d	347,44	2,53	3	2	3	82,18	-5,52	0,995	93,2	0,285	0,291
5f	351,47	2,71	3	2	3	78,27	-5,24	1,211	93,7	0,579	0,225
5g	410,55	3,7	2	3	4	84,83	-7,12	0,945	91,8	-0,363	0,220

MLogP: Lipofilicidade, AH: Grupos receptores de hidrogênio, DH: Grupos doadores de hidrogênio, LR: Ligações rotacionáveis, TPSA: Área de superfície polar, Ali LogS: Solubilidade aquosa, VDss: Volume de distribuição.

Na Tabela 1, observa-se que todas as moléculas se enquadram nos parâmetros físico-químicos propostos por Lipinski e Veber. Contendo massa molecular abaixo de 500Da; doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; receptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e MlogP $\leq 4,15$; área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e ligações rotacionáveis ≤ 10 . Estes parâmetros foram previstos a partir de dados da plataforma SwissADME. Ainda de acordo com os dados da

Tabela 1 é possível identificar que os ligantes **3m** e **5g** possuem maiores valores no MLogP sendo 3,42 e 3,7 respectivamente. Um dos motivos que explica este resultado se dá pelo fato de ambos possuírem o grupamento indol no R, evidenciando sua afinidade com compostos lipofílicos.

Outra importante propriedade foi avaliada: a solubilidade aquosa, expressa numericamente pelo método Ali LogS. Este é um parâmetro que afeta de maneira significativa as características de absorção e distribuição. Geralmente um fármaco com baixa solubilidade tem pouca absorção pelo organismo. Este parâmetro funciona de forma inversa à lipofilicidade, ou seja, quanto maior o valor obtido maior será a afinidade do composto com a água e consequentemente maior será sua solubilidade. Os ligantes empregados neste estudo são classificados como de moderada solubilidade pois apresentam valores de Ali LogS maiores que -6, com exceção dos ligantes **3m** e **5g** que apresentam um grupo hidrofóbico (anel indólico) em sua estrutura o que lhe confere uma menor solubilidade aquosa, -6,38 e -7,12 respectivamente, sendo estes ligantes classificados como pouco solúveis (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Com o uso da plataforma pkCSM, foi possível prever algumas propriedades farmacocinéticas importantes para os ligantes em análise. Dentre elas o valor da permeabilidade Caco-2 que nos informa uma estimativa da absorção do ligante na mucosa intestinal humana. Para esta permeabilidade ser considerada alta, ela precisa se encaixar nos valores $> 0,90$, onde a fração permeável é medida em função do tempo (LAMBERTUCCI et al., 2018). Para os ligantes estudados observa-se que todos estão acima de 0,90, sendo estes bem absorvidos (70-100%), ou seja, com alta permeabilidade. Os compostos também apresentam um alto percentual de absorção intestinal $> 90\%$. Os valores de VDss nos informa o valor de distribuição do composto, valores $> 0,45$ indicam que o fármaco tem maior chance de se distribuir no tecido, para valores $< -0,15$ o fármaco tem mais chances de se distribuir no plasma. Para os ligantes em análise, observa-se que **3m** é o único ligante que possui valor de VDss $< -0,15$, ou seja, tem maior probabilidade de se distribuir no plasma. Já os ligantes **3c**, **3e**, **5d** e **5g** possuem valores de VDss entre -0,15 e 0,45, logo nem se distribuem apenas no tecido nem no plasma, podendo estes ficarem nos dois locais, com exceção dos ligantes **3g**, **3j** e **5f**, que apresentam valores $> 0,45$ e por isso têm maior probabilidade de se distribuir nos tecidos (LAMBERTUCCI et al., 2018; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

A proteção do cérebro contra compostos exógenos é feita pela BHE. Um importante parâmetro a ser considerado é a capacidade do fármaco de atravessar esta barreira e chegar até o cérebro, desta forma pode-se ajudar a diminuir possíveis efeitos colaterais ou ainda melhorar no funcionamento do fármaco cujo alvo seja o cérebro (HARDJONO; SISWANDONO; ANDAYANI, 2018). Este parâmetro é adquirido através do cálculo logBBB. Com este cálculo é possível prever as concentrações de compostos no cérebro, para valores $> 0,3$ o composto indica uma pré-disposição do ligante atravessar a BHE e para valores < -1 indica uma fraca distribuição deste composto (LAMBERTUCCI et al., 2018; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Dos ligantes apresentados na Tabela 1, nenhum apresenta valor < -1 , ou seja, nenhum está totalmente impedido de atravessar a BHE. Apenas o **3c** possui um logBBB $> 0,3$, indicando que este tem uma probabilidade maior de atravessar a BHE. Os ligantes **3e**, **3g**, **3j**, **3m**, **5d**, **5f** e **5g** apresentam valores de logBBB $< 0,3$ indicando uma menor probabilidade de atravessar a BHE (HARDJONO; SISWANDONO; ANDAYANI, 2018).

3.1. CÁLCULO DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPLEXOS DNA

No geral as moléculas que se ligam ao DNA interferem na replicação levando à morte celular. Desta forma, torna-se importante o estudo da interação e mecanismo dessas moléculas para que haja maior eficácia no desenvolvimento de drogas anticâncer. Foram identificadas no presente estudo, duas classes de agentes não-covalentes de ligação ao DNA: os ligantes de sulco e os intercaladores.

De acordo com Gilad e Senderowitz (2014), os ligantes do sulco influenciam na interação do DNA com proteínas que se ligam ao DNA, como fatores de transcrição e proteínas de reparo de DNA. Isso pode acarretar na parada da proliferação e, conseqüentemente, à morte celular.

Tendo como propósito a interpretação teórica do modo de ligação dos derivados contra as estruturas 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 de cada complexo. Como resultado foi possível perceber que para o receptor 1BNA todos os derivados interagiram com o sulco menor do DNA. Já para o 1Z3F todos os ligantes intercalaram com o DNA.

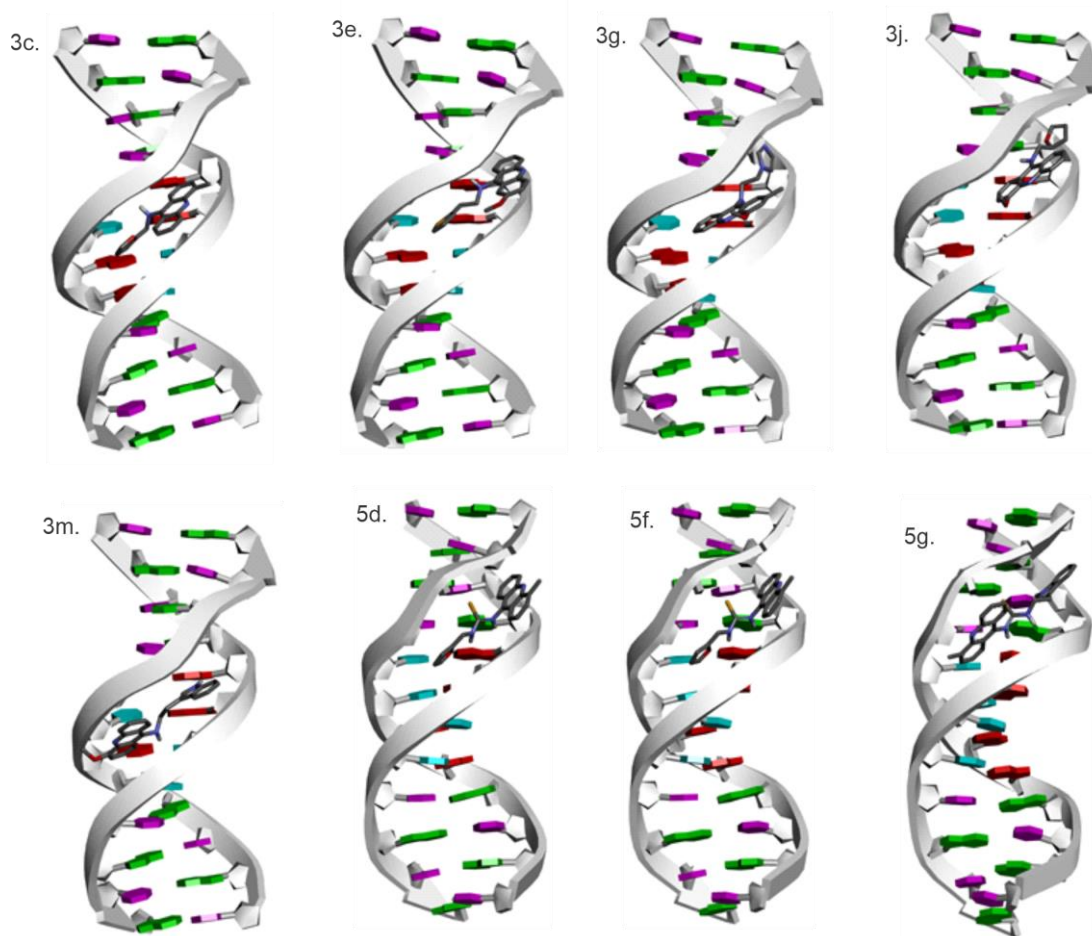
Tabela 2: Energia de ligação para os complexos DNA-ligante.

Composto	Energia de ligação kcal·mol ⁻¹		Estrutura		
	1BNA	1Z3F	R	R ₁	R ₂
3c	-8,99	-8,88		H	CH ₃
3e	-9,04	-8,89		OCH ₃	H
3g	-8,34	-9,04		H	OCH ₃
3j	-8,91	-8,38		H	OCH ₃
3m	-10,93	-9,88		H	OCH ₃
5d	-9,17	-9,53		H	CH ₃
5f	-9,17	-9,64		H	CH ₃
5g	-10,68	-9,93		H	CH ₃

A Tabela 2 descreve os valores da energia de ligação dos ligantes contra a estrutura do DNA 1BNA e 1Z3F, todos os ligantes formaram complexos com o DNA com energia inferior a -8,00kcal·mol⁻¹, isso indica que os ligantes possuem habilidade de interagir com as duas estruturas de DNA.

Os ligantes derivados da acridina interagiram com o sulco menor para o DNA 1BNA como observado na Figura 6. Para uma interação no sulco maior do DNA é necessário proteínas e moléculas grandes, já que este sulco é de uma geometria mais larga e rasa e é uma região de ligação com outras proteínas além de ser rica em citosina e guanina, ou seja, menos disponível. Em contra partida moléculas pequenas interagem melhor no sulco menor, pois este possui geometria mais estreita e profunda e é uma região rica em adenina e timina, permitindo o encaixe das moléculas nas ranhuras do sulco com pouco impedimento estérico. Desta forma, muitos ligantes de sulcos menores demonstram maior interesse em sequências de adenina e timina. (GILAD E SENDEROWITZ, 2014).

Figura 6: Modos de interação dos derivados da acridina contra a dupla fita do DNA 1BNA.



Com o 1Z3F a interação aconteceu através da intercalação, todos os ligantes intercalaram formando o complexo intercalador-DNA como indica a Figura 7. Segundo Barra e Netto (2015) a intercalação ocorre quando a molécula aromática se insere entre os pares de bases do DNA.

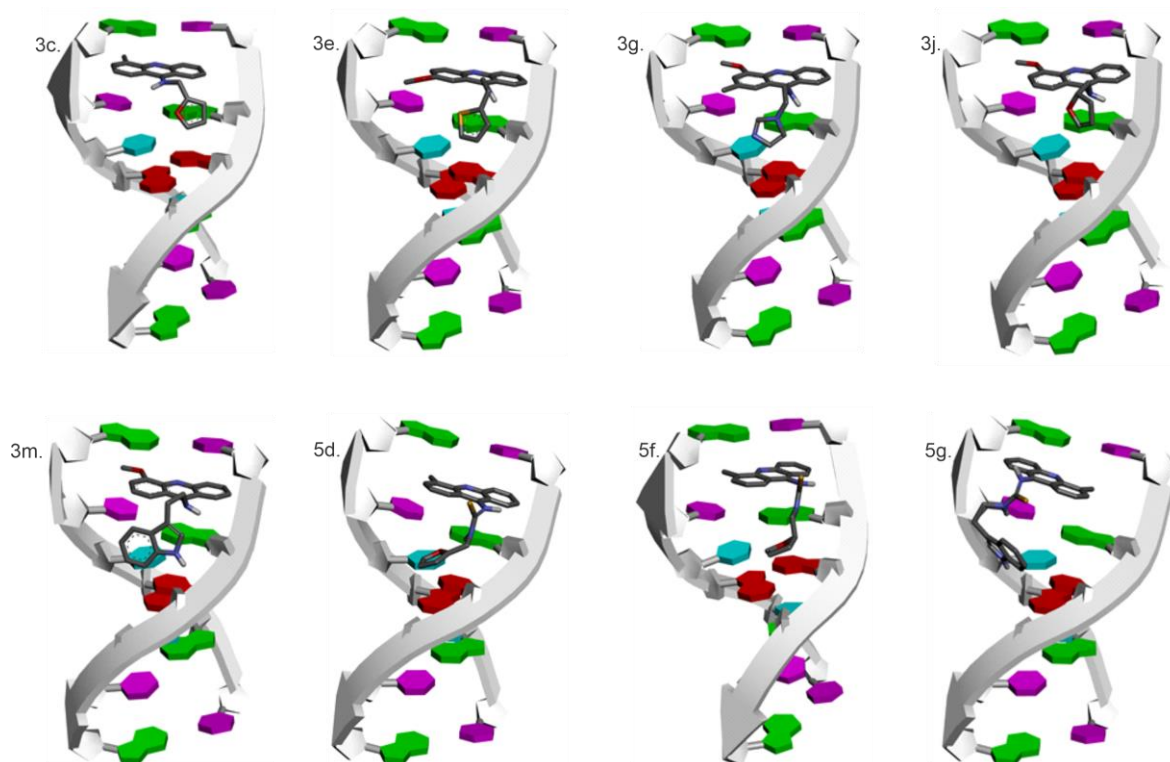
As ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas e, principalmente, interações de empilhamento π entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do agente intercalador contribuem para a estabilização do complexo intercalador-DNA (BARRA; NETTO, 2015, p.7).

Características comuns dos chamados “intercaladores clássicos” condizem com as características dos derivados da acridina utilizados nesse estudo, que são uma cadeia lateral conectada e aromáticos com anel fundido. Os anéis planos facilitam na interação com o DNA, que ocorre em forma de empilhamento π com os pares de base do mesmo para a formação do complexo (STREKOWSKI; WILSON, 2007).

Os ligantes **3m** e **5g** foram os que apresentaram melhor afinidade de ligação com ambas as estruturas de DNA: 1BNA e 1Z3F, suas energias de ligação foram no valor de

-10,93 kcal·mol⁻¹ e -10,68 kcal·mol⁻¹; e -9,88 kcal·mol⁻¹ e -9,93 kcal·mol⁻¹, respectivamente. As figuras 6 e 7 mostram as regiões de ligação, onde é possível constatar que o modo de ligação segue o mesmo padrão de interação em cada estrutura de DNA, onde o núcleo acridínico está direcionado ao sulco e centralizado nos pares de bases do DNA.

Figura 7: Modos de interação dos derivados da acridina contra a dupla fita do DNA 1Z3F.



3.2. DOCKING COM A TOPOISOMERASE II α

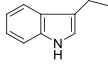
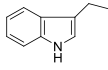
Uma das classes de compostos mais importantes no tratamento de enfermidades como o câncer são os intercaladores de DNA. Estes interferem na atividade enzimática da topoisomerase, dificultando a formação do complexo DNA-topoisomerase, podendo formar um outro complexo, chamado complexo ternário entre o DNA, o intercalador e a topoisomerase. O complexo ternário é mais estável que o complexo DNA-topoisomerase. Assim, tem-se maior possibilidade da formação do complexo ternário, tornando pouco possível a religação das fitas clivadas do DNA podendo induzir a morte celular programada. Este mecanismo é conhecido como envenenamento da topoisomerase. (LAFAYETTE, et al., 2013).

Partindo desse pressuposto foi feito o estudo teórico para avaliar a afinidade de ligação dos compostos com a isoforma II α da enzima DNA-topoisomerase a fim de se obter o melhor composto – dentre os estudados – que pode atuar como agente intercalador.

A topoisomerase II α é a enzima mais utilizada em ensaios experimentais para a análise de fármacos inibidores desta proteína, de acordo com a literatura essa isoforma é a principal envolvida nos processos mitóticos. Não obstante esta também possui concentração proporcional à taxa de proliferação celular (AREPALLIA, et al., 2018; GOUVEIA, et al., 2018; OLIVEIRA, et al., 2017). Com os estudos de docking, tornou-se possível analisar a afinidade de ligação para a formação dos complexos topo-ligante. Os resultados de docking contra a topoisomerase II α estão dispostos na, estando descritos os valores da melhor conformação entre as 100 geradas de cada complexo assim como também suas principais ligações entre ligante e receptor.

Feitas as simulações de docking molecular, as interações entre a topoisomerase II α e os ligantes derivados da acridina foram analisadas através do Discovery Studio 2017. Com este programa é possível avaliar o comportamento entre receptor e ligante, podendo-se identificar quais são as interações moleculares presentes na formação do complexo gerando um diagrama bidimensional que nos informa os tipos de interação entre a topoisomerase II α e o ligante.

Tabela 3: Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo Topoisomerase II α .

#	Energia de ligação Kcal·mol ⁻¹	Estrutura			Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas		
		R	R ₁	R ₂		π -alquila/ Alquila	π - σ	Empilhamento π - π
3c	-8,25		H	CH ₃	G-10 Asp-463	C-8	-	G-13 Arg-487
3e	-8,72		OCH ₃	H	Arg-487	-	G-13	C-8 T-9 G-13
3g	-8,4		H	OCH ₃	Arg-487	G-13 Arg-487	A-12	A-12
3j	-8,29		H	OCH ₃	Arg-487	A-12 G-13 Arg-487	A-12	C-8 T-9 G-13
3m	-10,28		H	OCH ₃	T-9 Arg-487	Met-762	-	C-8 T-9 G-13
5d	-8,9		H	CH ₃	C-8 A-12 G-13	Arg-487 C-8	Met-762	C-8 T-9 G-13
5f	-9,42		H	CH ₃	T-9	A-12 Arg-487 Met-762	-	C-8 G-13
5g	-10,8		H	CH ₃	T-9	C-8 Met-762	-	-

As principais interações intermoleculares entre os ligantes e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da proteína alvo nesse estudo estão destacadas na (Tabela 3). Sendo as principais: ligações de hidrogênio: depois das ligações covalentes do sistema biológico são as ligações mais importantes em se tratando de energia; e as interações hidrofóbicas: que em sua particularidade são consideradas fracas e acontecem em função da interação entre cadeias ou subunidades pouco polares. Como as estruturas de peptídeos e fármacos possuem grande quantidade de cadeias hidrofóbicas, tal interação torna-se importante no reconhecimento do ligante pela proteína como uma molécula do próprio sistema.

As interações hidrofóbicas apresentadas são interações de empilhamento π - π que consistem numa atração (não covalente) entre anéis aromáticos, estas são importantes na organização das moléculas de DNA e de RNA (BROW, 2005); e as interações ou conjugação σ - π , que é interpretada como uma sobreposição de um orbital σ de uma ligação C-H e o orbital π de uma ligação C-C (BRUICE, 2006).

Com base no estudo de docking molecular todos os derivados da acridina possuem boa energia de interação e intercalam com os pares de bases do DNA no ponto de clivagem. A presença de vários fragmentos poliaromáticos 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 energia. Os ligantes **3m** e **5g** foram os que apresentaram melhor potencial para formação de um complexo ternário mais estabilizado com energia de ligação no valor de -10,28 e -10,8kcal·mol⁻¹. Estruturalmente são os ligantes que possuem um maior conjunto de anéis planos, permitindo dessa forma que ele possua uma afinidade mais acentuada com o receptor.

O complexo formado com o ligante **3m** mostrado na Figura 8 é resultado da interação do anel indólico com a citosina-8, e essa juntamente com a timina-9 e guanina-13 intercala com os anéis fenil do ligante, complementarmente realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo arginina-487 e timina-9. O ligante **5g** (Figura 9) se ligou em uma pose diferente interagindo apenas com a citosina-8 e timina-9, no entanto realizou três ligações de hidrogênio com o resíduo de timina-9.

Figura 8: (A) modo de ligação do composto 3m com a topoisomerase II α . (B) Interações do ligante 3m com os resíduos de aminoácidos circundantes.

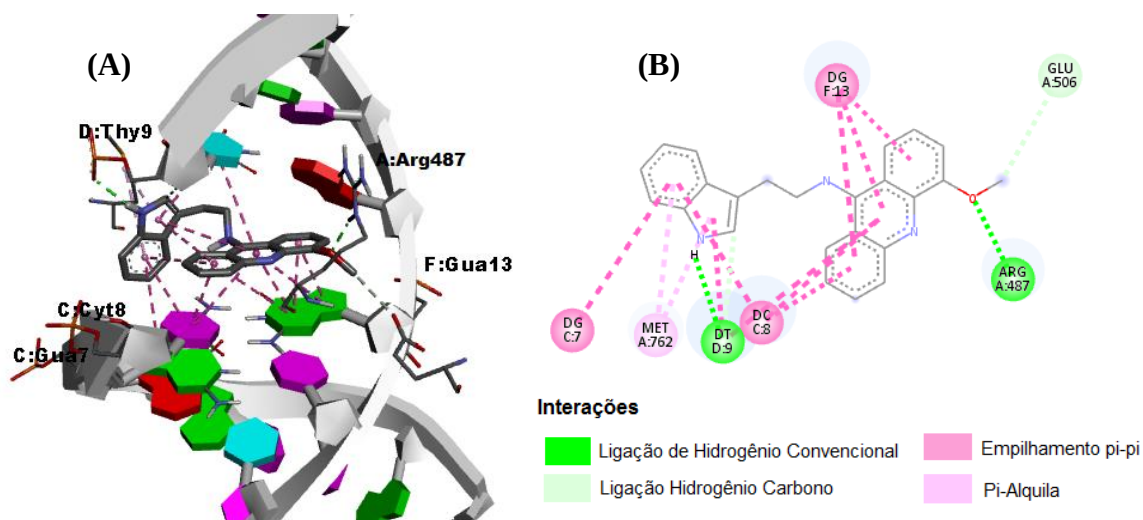
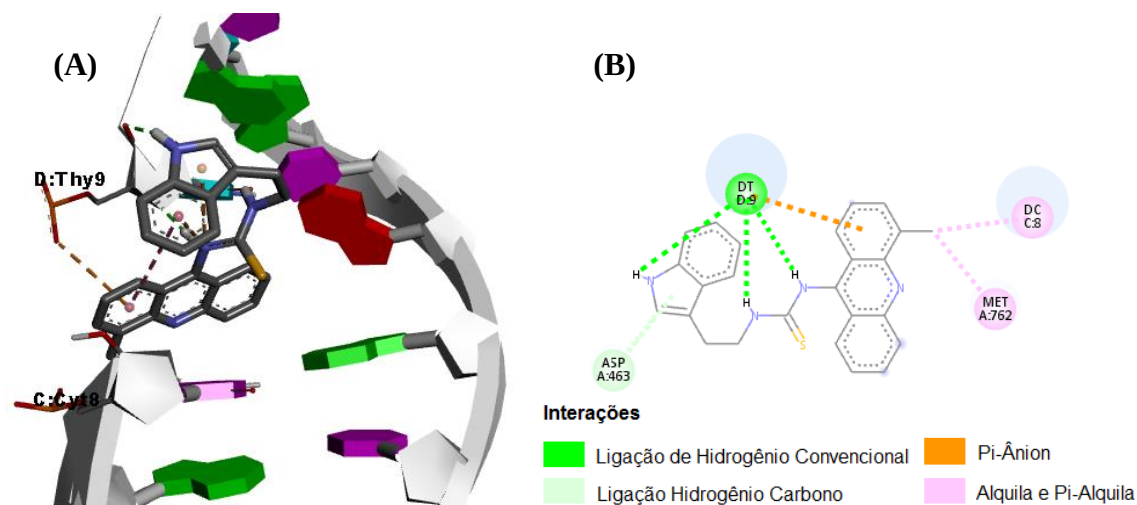


Figura 9: (A) modo de ligação do composto 5g com a topoisomerase II α . (B) Interações do ligante 5g com os resíduos de aminoácidos circundantes.



Os ligantes **3c** e **3j** foram os complexos que tiveram maior energia de ligação, $-8,25\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $-8,29\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente, ou seja, tiveram menor interação com a enzima. A interação que acontece entre o ligante **3c** e a proteína é formada através de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupamento furano e a guanina-10 e outra entre o hidrogênio da amina e o aspartato-463. O núcleo acridínico se inseriu entre a arginina-487 e a guanina-13 por meio do empilhamento π - π , sendo estas as principais forças moleculares que resultaram na formação do complexo. A forma de ligação do ligante **3j** ocorre através de empilhamento π - π entre o anel acridínico e as bases timina-9, guanina-13 e citosina-8, uma ligação de hidrogênio entre o resíduo arginina-487 e o oxigênio do tetraidrofurano. A diferença entre as estruturas desses ligantes é a presença de oxigênio no R₂ do **3j** e a aromaticidade no R do **3c**.

O ligante **3e** intercala entre as bases de citosina-8, timina-9 e guanina-13 através do empilhamento π - π com o núcleo acridínico e realiza ligação σ - π entre o metil do metoxilo e a guanina-13, além de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do metoxilo e a arginina-487.

Analisando as interações do ligante **3g** observa-se que o nitrogênio do núcleo acridínico interage através de uma ligação de hidrogênio com a arginina-487 que também interage através de ligação de hidrogênio com o oxigênio da metoxila no R₂, além de realizar uma interação σ - π e empilhamento π - π entre a base da adenina-12 e o núcleo acridínico.

As interações do ligante **5d** se dão através do empilhamento π - π entre as bases de citosina-8, timina-9 e guanina-13 e o núcleo acridínico e ligações de hidrogênio sendo uma entre a base de citosina-8 e o oxigênio do furano, uma entre a base de adenina-12 e o enxofre e outra entre a base de guanina-13 e o hidrogênio do grupamento amina.

O ligante **5f** se intercala por meio de empilhamento π - π entre as bases de citosina-8 e guanina-13 e duas ligações de hidrogênio entre a base de tirosina-9 e o hidrogênio dos grupamentos amina presente no ligante.

Conforme os dados do resultado de docking os ligantes do presente estudo possuem potencial de inibir a atividade da topoisomerase II α podendo esses efeitos serem confirmados experimentalmente através de eletroforese em gel de agarose (RODRIGUES, 2019). Ao se observar os valores do docking para as duas estruturas de DNA, percebe-se que para ambas as estruturas os ligantes de melhor interação são o **3m** e **5g**. O mesmo acontece com a topoisomerase II α , o que evidencia ainda mais o quanto esses ligantes podem atuar como inibidores.

Com base no exposto, o presente estudo tem como o comparar os resultados teóricos de docking e os resultados experimentais encontrados na pesquisa de Sondhi et al., (2010). A Tabela 4 apresenta os resultados da pesquisa experimental com as energias de ligação dos ligantes com cada receptor, onde foi observado que os compostos derivados da acridina têm indícios promissores de que podem atuar como agentes intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase, visto que todos apresentaram baixa energia de ligação, indicando boa interação com os receptores. Comparando-se inicialmente apenas os resultados de docking o composto com o ligante **5g** foi o de melhores valores de energia de ligação com os três receptores utilizados nesse estudo, onde para a estrutura de DNA 1Z3F apresentou energia igual a $-9,93\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; para a estrutura 1BNA energia igual a $-10,68\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; e para a topoisomerase II α (5GWK) energia igual a $-10,8\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabela 4: Comparação dos resultados *in silico* x *in vitro*, para os complexos ligante-receptor.

#	1Z3F	1BNA	5GWK	% Inibição do tumor						
				Mama	Fígado	Colo		Pulmão		Neuroblastoma
				MCF-7	HEP-2	COLO-205	502713	HCT-15	A-549	IMR-32
3c	-8,88	-8,99	-8,25	58	51	72	52	74	52	86
3e	-8,89	-9,04	-8,72	44	52	69	67	78	20	89
3g	-9,04	-8,34	-8,4	71	77	73	61	77	51	93
3j	-8,38	-8,91	-8,29	52	34	66	60	64	56	69
3m	-9,88	-10,93	-10,28	78	75	84	63	91	49	99
5d	-9,53	-9,17	-8,9	94	61	88	95	-	46	5
5f	-9,64	-9,17	-9,42	99	14	71	95	-	96	21
5g	-9,93	-10,68	-10,8	95	96	98	90	-	84	67

Quando comparados com os resultados experimentais, as energias apresentadas pelos ligantes coincidem com as avaliações feitas *in vitro*. O melhor resultado de docking foi obtido para o composto **5g** com energia de ligação $-9,93\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o receptor 1Z3F, $-10,68\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o receptor 1BNA e $-10,8\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a topoisomerase II α (5GWK). Este composto apresentou inibição do crescimento de tumores de 95% (Mama), 96% (Fígado), 98% (COLO-205), 90% (502713), 84% (Pulmão) e por fim 67% (Neuroblastoma). O ligante **3m** apresentou o segundo melhor resultado nas energias de ligação $-9,88\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o receptor 1Z3F, $-10,93\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o receptor 1BNA e $-10,28\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a topoisomerase II α , tendo um menor percentual de inibição dos tumores quando comparado ao composto **5g**, apresentando melhores resultados para o neuroblastoma (99%) e Colo (HCT-15) (91%). O composto que apresentou resultados menos promissores foi com o ligante **3c**, que além de ter maiores energias de ligação, também possui menor percentual experimental na inibição dos tumores. Os resultados do estudo de docking para os derivados em análise sugerem que um mecanismo plausível de inibição do crescimento tumoral é através da intercalação com o DNA da topoisomerase II α , atentando-se principalmente aos compostos **3m** e **5g**, os quais têm os melhores resultados, podendo ser uma proposta interessante para o desenvolvimento de possíveis fármacos com este tipo de atividade antitumoral.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os ligantes do estudo obedecem às regras para fármacos proposto por Veber, além de se enquadrarem nos parâmetros propostos por Lipinski. No que se refere às propriedades físicoquímicas relacionadas ao perfil farmacocinético, foi observado que todos os ligantes possuem alta probabilidade de permeação nas células Caco-2, e também apresentaram bom percentual de absorção através do intestino sendo o ligante **5g** o que apresentou menor percentual e o ligante **3c** maior percentual. A análise do volume de distribuição indica que apenas o ligante **3m** possui maior probabilidade de se distribuir no plasma, já os ligantes **3g**, **3j** e **5f** têm maior probabilidade de se distribuir no tecido, os demais ligantes podem se distribuir tanto no plasma como no tecido. Os compostos também apresentaram baixa probabilidade de atravessar a BHE, sendo o ligante **3c** o único que possui moderada probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos com o docking molecular, é possível observar que os ligantes apresentaram boa afinidade com os três receptores. Uma vez que as interações desses compostos com as estruturas 1BNA e 1Z3F do DNA apresentaram energias de ligação inferiores a $-8,00\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, esta interação pode estar relacionada a pose a qual os compostos interagiram, quando para a estrutura 1Z3F os ligantes intercalaram na dupla fita. Já para a estrutura 1BNA os ligantes se ligaram no sulco menor, já que este possui uma geometria favorável para ligação com moléculas pequenas.

O estudo de docking também apontou que os ligantes possuem grande potencial para formação de um complexo ternário estabilizado com a DNA-topoisomerase II α , mostrando que há possibilidade de inibição da mesma por envenenamento. Os ligantes **3m** e **5g** os que formaram complexos com menor energia, $-10,28\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $-10,8\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

Os valores obtidos de docking molecular sugerem que os derivados da acridina apresentam um potencial de atuar como intercalador, devido sua boa afinidade de ligação com o complexo DNA-topoisomerase II α , impedindo a religação da dupla fita podendo induzir morte celular programada.

Além disso, foi possível concluir para esse teste *in silico*, que os resultados de docking coincidem com o resultado experimental, visto que os ligantes possuem estruturas que favorecem a formação de complexos estáveis com os receptores utilizados nesse estudo e apresentam bons potenciais de inibição, mostrando assim sua promissora capacidade de atuar

como agente antitumoral. Como perspectivas faz-se necessário a realização do teste experimental por meio de eletroforese em gel de agarose para observar os efeitos dos derivados da acridina contra a topoisomerase II α .

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. M. V. DE. **Síntese, Elucidação Estrutural, Avaliação Da Interação Com Dna, Atividades Antiproliferativa E Anti-Topoisomerase De Novos Derivados De Acridina**. 2015. 227 f. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde). Universidade Federal De Pernambuco, 2015.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.
- BRITO, M. A. DE. Avaliação De Propriedades Toxicológicas De Fármacos in Silico No Curso Experimental De Química Medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 4, p. 22–29, 2011.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017.
- FEDERICO, M. P. et al. Noções sobre parâmetros farmacocinéticos / farmacodinâmicos e sua utilização na prática médica. **Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 15, n. 3, p. 201–205, 2017.
- GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.
- GOUVEIA, R. G.; MOURA, R. O. DE. Derivados de acridina como intercaladores de DNA: uma revisão. **Congresso Brasileiro de Ciencias da Saúde**, n. 83, 2016.
- HARDJONO, S.; SISWANDONO, S.; ANDAYANI, R. Evaluation of N-benzoylthiourea derivatives as popssible analgesic agents by predicting their hysicochemical and pharmacokinetic properties, toxicity, and analgesic activity. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 76, 2018.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. **O que é câncer**. 2019. Disponível em <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 21 de outubro de 2019.
- LAFAYETTE, E. A. **Síntese De Derivados Indólicos/Acridínicos E Avaliação Da Interação Com Dna Através De Técnicas De Espectroscopia Utilizando Brometo De Etídio Como Sonda Fluorescente**. 2016. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal De Pernambuco, 2016.
- LAMBERTUCCI, C. et al. New potent and selective A1 adenosine receptor antagonists as potential tools for the treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 199–213, 2018.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.
- MATOS, K. S. **Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos**. 2016. f 119. Tese (Doutorado em Física Biomolecular). Universidade De São Paulo Instituto De Física De São Carlos, v. 3, n. 1, p. 1–217, 2016.

MENDONÇA, M. C. P. **Óxido De Grafeno E Sistema Nervoso Central: Avaliação Dos Efeitos Na Barreira Hematoencefálica E Perfil nanotoxicológico**. 2016. f 123. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Estadual De Campinas Faculdade De Ciências Médicas, 2016.

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.

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

OLIVEIRA, M. L. G. DE. **Avaliação in silico do potencial farmacológico e toxicológico de friedelanos, lupanos e derivados**. 2014. f 380. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal De Minas Gerais, 2014.

PIRES, D. E. V; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM : predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 4066–4072, 2015.

RODRIGUES, L. M. D. S. **Estudos de docking molecular de derivados tiazóis como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II**. 2019. f 62. Monografia (Licenciatura em Química). Universidade Federal Rural De Pernambuco, p. 1–62, 2019.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222–227, 2011.

SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES, A. DE A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem Didática Para O Desenvolvimento De Moléculas Bioativas: Regra Dos Cinco De Lipinski E Preparação De Heterociclo 1,3,4-Oxadiazol Em Forno De Micro-Ondas Doméstico. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1–6, 2017.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. **Journal Heterocyclic Chemistry**. v. 47, p. 491-502, 2010.

SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555–563, 2010.

SOUZA, A. S. DE. **Estudos em quimioinformática baseados na estrutura do ligante e do receptor de candidatos a agentes antichagásicos**. 2019. f 198. Tese (Doutorado em Física Aplicada Biomolecular). Universidade De São Paulo Instituto De Física De São Carlos, p. 1–196, 2019.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1–2, p. 3–13, 2007.

SUNDBERG, R.J. Review on electrophilic substitution reactions of indoles. **Topics Heterocyclic Chemistry**. Editor Springer. v. 26, p. 47-115, 2010.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.