MARCELLE ALCÂNTARA VIEIRA ROCHA

Planejamento estrutural, modelagem molecular e síntese de complexos de cobre (II) como potenciais inibidores da topoisomerase II alfa humana

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Neto

ARARAQUARA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Marcelle Alcântara
V657p Planejamento estrutural, modelagem molecular e síntese de complexos de cobre (II) como potenciais inibidores da topoisomerase II alfa humana / Marcelle Alcântara Vieira. – Araraquara : [s.n.], 2021
176 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Júnior
Coorientador: Adelino Vieira de Godoy Neto

1. Química medicinal. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Compostos de cobre. 4. Câncer. 5. Estudos de validação. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Planejamento estrutural, modelagem molecular e síntese de complexos de cobre (II) como potenciais inibidores da topoisomerase II alfa humana"

AUTORA: MARCELLE ALCÂNTARA VIEIRA
ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR
COORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Drª ROBERTA TESCH (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica, Química e Farmácia / Goethe University Frankfurt - Alemanha



Prof. Dr. ROBERTO SANTANA DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 05 de março de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Marcelle Alcântara Vieira Rocha

Nome em citações bibliográficas: Vieira, M. A.

Nascimento: 09/03/1993

Naturalidade: Volta Redonda/RJ – Brasil

E-mail para contato: marcelleav9@gmail.com

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Bioquímica e Química Orgânica - Laboratório de Química Medicinal Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM).

Rua Professor Francisco Degni, 55. CEP: 14800-060. Araraquara/SP - Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Química: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP. Período: julho 2018 – agosto 2020. Título da dissertação: PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE DE COMPLEXOS DE COBRE (II) COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA TOPOISOMERASE II ALFA HUMANA. Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior. Coorientador: Adelino Vieira De Godoy Neto. Bolsa: CAPES.

Graduação em Química: Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda/RJ. Período: fevereiro 2011 - dezembro 2016 Título do trabalho de conclusão de curso: ACÚMULO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Lippia alba* ADUBADAS COM COMPOSTO ORGÂNICO CONTENDO LODO DE ESGOTO. Orientador: Profa. Dra. Fabiana Soares dos Santos, Bolsa: PROGRAD.

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

1. **Trabalho publicado em periódico indexado:**

   Vieira M.A.; Farias R.L.; Netto A.V.G.; Nascimento-Júnior, N.M. **Phosphine- and Isatin-Copper Complexes: Anticancer Activity, Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship Examples from the Last Ten Years.** Med. & Analy. Chem. Int. J. Volume 3 Issue 3, 2019.

2. **Organização de evento científico:**

   Membro da comissão organizadora da 2ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp (EMMUnesp), organizada pelo Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM). Realizada entre 7 e 11 de janeiro de 2019. Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

   Membro da comissão organizadora da 3ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp (EMMUnesp), organizada pelo Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM). Realizada entre 11 e 15 de janeiro de 2021 de forma online.

3. **Resumo publicado em anais de evento científico:**

   Structural design and molecular modeling of copper(II) complexes as inhibitors of human Topoisomerase IIα. Marcelle A. Vieira, Renan L. Farias, Victor S. Batista, Adelino V. G. Netto, Nailton M. Nascimento-Jr. 9th The Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem) – Pirenópolis – Goiás (1 a 5 de Setembro de 2019).

4. Apresentação de trabalho

Semana da Monitoria ICEx/UFF – “O trabalho de monitoria como apoio no processo ensino-aprendizagem em Físico-Química I” **2014**.
Semana da Monitoria ICEx/UFF – “O trabalho de monitoria como apoio no processo ensino-aprendizagem em Físico-Química I” **2015**.
Semana da Monitoria ICEx/UFF – “O trabalho de monitoria como apoio no processo ensino-aprendizagem em Físico-Química I” **2016**.

5. Demais atividades acadêmicas

Programa de iniciação à docência – Monitoria acadêmica. Monitora da disciplina de Físico-química I (2014, 2015, 2016). Bolsa: PROGRAD UFF

À Deus, fonte inesgotável de ciência.

À minha família, por fazerem de mim e por mim muito mais do que eu mereço e por me ensinarem princípios inegociáveis.

À toda comunidade científica, apesar deste representar uma fração ínfima perante todo o conhecimento que há descrito na literatura.

À todos que aguardam uma molécula entre "dez mil".

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Os ensinamentos mais importantes não estão na universidade, embora esta transmita, de forma singular, um arcabouço de conhecimento. Aqui, vou listar os que me ensinaram princípios que me tornaram quem eu sou e que me movem, e também os que me ensinaram, através da universidade; a todos minhagratidão.

Agradeço a Deus, pela vida, amor e sustento, e por revelar Sua ciência na química e em toda natureza, a qual me inspira diariamente na carreira científica.

Agradeço a minha família: Ao marido, Áquila, por me apoiar e me inspirar através de sua inteligência. Ao pai, Wallace, por ter me dado educação e seu exemplo de trabalho, dedicação e amor. À mãe, Maria Célia, por seu carinho, amor, motivação e dedicação em todo tempo. À minha irmã, Tháyna, por me inspirar através da sua vida e amizade. Aos meus avós, Therezinha, Iracema e Zé, por todo amor e força demonstrado. Ao sogro e sogra, Antônio e Marta, por todo apoio e carinho. Aos amigos e colegas que fazem de Araraquara uma parte da minha família. A esses todos e aos demais familiares, minha eterna gratidão por tantas vezes, com palavras e ações, me ensinarem sobre fé, trabalho, amor, simplicidade e dedicação. A todos da minha família: obrigado por serem vocês.

Ao professor Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, por me inserir com muita dedicação na pesquisa científica e através de seus ensinos e conselhos contribuir de forma essencial para eu me tornar a pesquisadora que sou hoje, muito obrigada pela amizade e confiança.

Ao coorientador e professor Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, por toda orientação, apoio e dedicação, em especial na parte de síntese e nas discussões do artigo publicado, muito obrigada pela confiança.

Aos colegas do LaQMedSOMM, Victor Batista, Thaiz Ribeiro, Beatriz Vellosa, Leonardo Simões, Bruna Lopes e aos demais, com os quais trabalhei durante o projeto, seja em um longo ou curto período, agradeço pela amizade, discussões científicas e pelo compartilhar do conhecimento.

Ao Dr. Renan Lira de Farias pelos ensinamentos, apoio e direção no projeto desde a etapa computacional até a síntese, e a todos do Grupo Química de Coordenação e Organometálicos que em algum momento me apoiaram.

A todos professores e educadores que me inspiraram nessa jornada através do conhecimento, e à toda comunidade cientifica por fomentar a curiosidade e a busca de soluções para servir a sociedade.

Ao Instituto de Química (IQ-CAr) e à Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita” (UNESP), pelo suporte, pela qualidade de ensino e infraestrutura oferecidos.

À banca examinadora, pelas excelentes contribuições que possibilitaram um trabalho final mais completo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2018/00187-7) pelos recursos fornecidos.

“A gratidão é a memória do coração” - Muito obrigado!

“O livro da natureza é um belo e grande pedaço de tapeçaria enrolado, que não conseguimos ver de uma só vez, mas devemos nos contentar em esperar pela descoberta de sua beleza e simetria, aos poucos, à medida que gradualmente passa a ser cada vez mais desdobrado ou exibido. ”

- **Robert Boyle**
(Químico)

“Mas a vantagem do conhecimento é esta: a sabedoria preserva a vida de quem a possuí. ”

- **Rei Salomão**
(Bíblia Sagrada)

RESUMO

O câncer é considerado uma das principais causas de morte no mundo. É compreendido por mais de cem doenças que possuem características comuns, como a rápida proliferação celular e angiogênese. Embora haja fármacos disponíveis para o tratamento de diversos tipos de câncer, esses apresentam seletividade limitada e são consideravelmente tóxicos também para as células saudáveis. Compostos contendo platina, como cisplatina, estão entre os mais usados em quimioterapia, porém, podem resultar em resistência adquirida pelas células tumorais. Sendo assim, tem-se buscado o desenvolvimento de novos compostos que usem metais essenciais, que possam apresentar alto grau de seletividade, que não se liguem covalentemente ao DNA e com menor toxicidade para as células saudáveis. Neste contexto, o cobre, por estar presente no organismo, é biocompatível, o que pode o tornar potencialmente menos tóxico para as células saudáveis. Os complexos de cobre (II) com tiossemicarbazonas são investigados como metalofármacos para várias aplicações medicinais, incluindo seu uso como agentes anticâncer, onde seu mecanismo de ação é dado pela inibição da topoisomerase IIα humana. As topoisomerases são alvos das substâncias com atividade antitumoral, pois são enzimas essenciais que gerenciam o estado estrutural do DNA. A topoisomerase IIα humana (TOP IIα) é altamente expressa em muitas células tumorais, o que a torna um dos principais alvos das substâncias com atividade anticâncer. Neste projeto, foram planejados 180 complexos de cobre (II) tendo como ligantes tissemicarbazonas e isatinas. Inicialmente, foi realizada a validação de modelos *in silico* da topoisomerase IIα nos sítios do ATP e do etoposídeo, por redocagem. Em seguida, para ambos os sítios, foram ancorados compostos descritos na literatura encontradas no ChEMBL com atividade *in vitro* comprovada no sítio do ATPe no sitio do etoposídeo. As interações dos ligantes com os resíduos de aminoácidosdo sítio ativo foram analisadas, sistematicamente com os resíduos de tirosina 805(Y805), metionina 766 (M766) e a metionina 762 (M762) para o sitio do etoposídeo elisina 378 (K378) e asparagina 150 (N150) para o sítio do ATP. Na sequência, através da triagem virtual por ancoragem molecular das estruturas planejadas, foi possívelselecionar, dentre 180 complexos de cobre (II), os 20 mais promissores para a etapade síntese. A rota de síntese foi aplicada para a obtenção de um dos complexos que apresentava maior viabilidade sintética, o complexo (426) obtido foi o (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1- carbotioamidato)clorocobre(II), sendo que o não foi observado a troca de ligante entre o cloridro e a trifenilfosfina para obtenção do complexo 1 (70).

Palavras-chave: Ancoragem molecular. Topoisomerase IIα. Complexos de cobre (II). Química Medicinal. Agentes antitumorais.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world. It comprises of more than one hundred diseases that have common characteristics, such as rapid cell proliferation and angiogenesis. Although drugs are available for the treatment of several types of cancer, they have limited selectivity and are toxic to healthy cells. Platinum compounds, such as cisplatin, are among the most used in chemotherapy, however, they can result in resistance acquired by tumor cells. Therefore, the development of novel compounds that use essential metals can present a high degree of selectivity, no covalently bond with DNA, and reduced toxicity in normal cells, has been researched. In this context, copper, as it is present in the body, is biocompatible, which can potentially make it less toxic to healthy cells. Copper (II) complexes with thiosemicarbazones are studied by medicinal chemists for several applications, including their use as anti-cancer agents, where their mechanism of action is given by the inhibition of human topoisomerase IIα. Topoisomerases are targets of compounds with antitumor activity, as they are essential enzymes that play a role in the structural state of DNA. Human topoisomerase IIα (TOP IIα) is highly expressed in many tumor cells, making it one of the main targets of substances with anticancer activity. In this project, 180 copper (II) complexes were designed with thiosemicarbazones and isatins as ligands. First of all, the validation of topoisomerase IIα through in silico models at the ATP and etoposide sites was carried out by redocking. Then, for both sites, compounds described in the literature found in the ChEMBL with proven in vitro activity at the ATP site and the etoposide site were docked. The analysis of the interactions between the ligands and the key amino acid residues of the active site were systematically performed, highlighting tyrosine 805 (Y805), methionine 766(M766), and methionine 762 (M762) present in most of the interactions for theetoposide site. Also, lysine 378 (K378) and asparagine 150 (N150) were frequently observed in interactions for the ATP site. Subsequently, through the virtual screening by molecular docking, it was possible to select, among 180 copper (II) complexes, the20 most promising for the synthesis step. The synthesis route was applied to obtain one of the complexes that had greater synthetic viability, the complex (426) obtained was (Z) -2-(1- (2-morpholinoethyl) -2-oxoindolin-3-ylidene) -N-phenylhydrazine-1-carbothioamidate) chlorocopper (II), and the ligand exchange between hydrochloride and triphenylphosphine was not observed to obtain complex 1 (70).

Keywords: Molecular Docking. Topoisomerase IIα. Copper complexes. Medicinal Chemistry. Antitumor agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão celular normal e do câncer. 21

Figura 2: Incidência de câncer (azul) e mortalidade (vermelho), no ano de 2018 em todo mundo, para os sexos feminino e masculino, entre todas asidades 22

Figura 3: Distribuição percentual dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma 23

Figura 4: Representação do ataque nucleofílico da tirosina à ligação fosfodiéster de uma das fitas do DNA.....24

Figura 5: Distância entre o resíduo de lisina 378 e o grupo fosfato da ANP 25

Figura : A estrutura dimérica da topoisomerase IIα com DNA, seus domínios e regiões de ligação 26

Figura 7: Topoisomerase IIα co-cristalizada com o DNA e o etoposideo **(1)** com PDB ID:
5GWK..... 27

Figura 8: Ciclo catalítico da TOP IIA 28

Figura 9: Estrutura co-cristalográfica da TOP IIA no domínio ATPásico com PDB ID: 1ZXM. 28

Figura 10: Estrutura do etoposídeo **(1)** e doxorrubicina **(2)** veneno para TOPOIIα 29

Figura 11: Estrutura da novobiocina **(3)** e ICRF-187 (**4)**,inibidora catalítica da TOPOIIα 30

Figura 12: a) Estrutura da cisplatina **(5)** e b) modos de interação covalente entre a cisplatina e o DNA 32

Figura 13: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA..... 32

Figura 14: Representação do diagrama de energia dos orbitas d^9 para o íon cobre (II). 34

Figura 15: Representação da geometria tetraédrica **(a)** e quadrado planar **(b)** 34

Figura 16:O caminho do cobre nas células humanas. 36

Figura 17: Casiopeína® Cas-II-Gly **(6)** 40

Figura 18: Complexo bis (*N,N*-dietilditiocarbamato) de cobre (II). 40

Figura 19: Estrutura da isatina **(8)** e derivados **(9)** e **(10)** 41

Figura 20: Estrutura genérica das tiossemicarbazonas **(11)** e alguns derivados **(12,13)** 42

Figura 21: Estruturas dos complexos de cobre **(14)** e **(15)** , sintetizados por Ali A. Q. 43

Figura 22: Planejamento estrutural dos complexos de cobre (II) com a estrutura genérica **(16)** 45

Figura 23: Estrutura cristalográfica da topoisomerase IIα: (a) co-cristalizada com o DNA e etoposideo **(1)** (PDB ID: 5GWK) e (b) co-cristalizada com o ATP (PDB ID: 1ZXM) 47

Figura 24: Redocagem, para a toposiomerase IIα co-cristalizada com o etoposídeo **(1)** e com DNA 51

Figura 25: Redocagem para a toposiomerase IIα co-cristalizada com oANP. 52

Figura 26: Interações entre o complexo 1_1E_2C_3D_4C **(64)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 55

Figura 27: Interações entre o complexo 2_1D_2C_3D_4C **(57)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 56

Figura 28: Interações entre o complexo 3_1B_2B_3D_4A **(155)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 57

Figura 29: Interações entre o complexo 4_1D_2A_3D_4C **(160)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA 58

Figura 30: Interações entre o complexo 5_1C_2A_3D_4C **(135)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 59

Figura 31: Interações entre o complexo 6_1B_2B_3D_4C **(114)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 60

Figura 32: Interações entre o complexo 7_1A_2A_3D_4C **(89)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA..... 61

Figura 33: Interações entre o complexo 8_1D_2B_3D_4C **(166)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA 62

Figura 34: Interações entre o complexo 9_1A_2B_3D_4C **(70)** com os resíduos de aminoácidos e as bases doDNA 63

Figura 35: Interações entre o complexo 10_1B_2A_3D_4A **(103)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA..... 64

Figura 36: Padrão de substituintes que demostraram maior número deinterações. 65

Figura 37: Interações entre o complexo 1_1A_2A_3D_4A **(68)** com os resíduos de aminoácidos. 68

Figura 38 Interações entre o complexo 2_1E_2A_3C_4B **(177)** com os resíduos de aminoácidos. 69

Figura 39: Interações entre o complexo 3_ 1D_2A_3D_4A **(156)** com os resíduos de aminoácidos. 70

Figura 40: Interações entre o complexo 4_1A_2A_3C_4C **(88)** com os resíduos de aminoácidos. 71

Figura 41: Interações entre o complexo 5_1B_2B_3D_4C **(114)** com os resíduos de aminoácidos. 72

Figura 42: Interações entre o complexo 6_1E_2A_3D_4A **(176)** com os resíduos de aminoácidos. 73

Figura 43: Interações entre o complexo 7_1D_2A_3A_4C **(153)** com os resíduos de aminoácidos. 74

Figura 44: Interações entre o complexo 8_1E_2B_3C_4C **(186)** com os resíduos de aminoácidos. 75

Figura 45: Interações entre o complexo 9_1B_2A_3A_4C **(95)** com os resíduos de aminoácidos. 76

Figura 46: Interações entre o complexo 10_1E_2B_3D_4C **(191)** com os resíduos de aminoácidos. 77

Figura 47: Padrão de substituintes **(194)** que demostraram maior número de interações. 78

Figura 48: Complexo 1B_2B_3D_4C **(114)** obteve interação com os resíduos de aminoácidos de ambos sítios ativos.....79

Figura 49: Ligante **(196)** da literatura com CI_{50} = 0,044 μM (K562)..... 80

Figura 50: Ligante **(231)** da literatura com CI_{50} = 0,041 μM (K562)..... 81

Figura 51: Ligante **(246)** da literatura com CI_{50} = 2,18 μM (A549)..... 82

Figura 52: : Ligante **(233)** da literatura com CI_{50} = 9,44 μM (A549)..... 83

Figura 53: Ligante **(200)** da literatura com CI_{50} = 0,016 μM (K562)..... 84

Figura 54: Ligante **(354)** da literatura com CI_{50} = 2,60 μM (HCT-15). 85

Figura 55: Ligante **(358)** da literatura com CI_{50} = 1,37 μM (HCT-15). 86

Figura 56: Ligante **(353)** da literatura com CI50 = 2,83 μM (HCT-15). 87

Figura 57: Ligante **(345)** da literatura com CI50 = 2,62 μM (HCT-115). 88

Figura 58: Ligante **(348)** da literatura com CI50 = 3,84 μM (HCT-15). 89

Figura 59: Espectro de RMN ^{1}H para o Ligante 1 **(425)**.....98

Figura 60: Espectro no infravermelho do Ligante 1 **(425)** (linha preta) e do Complexo 1 **(70)** (linha vermelha) em pastilha de KBr.....; 99

Figura 61: **Complexo 1** sugerido como o obtido na síntese é o (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)clorocobre(II) **(426)** **.....** 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais tipos, ocorrência e função de biomoléculas de cobre. 35

Tabela 2: Faixa de inibição (CI_{50}) das estruturas retiradas da literatura. 48

Tabela 3: Valores obtidos por redocagem para cada função de pontuação (PDB ID: 5GWK). 50

Tabela 4: Valores obtidos por redocagem para cada função de pontuação (PDB ID:1ZXM) 51

Tabela 5: 10 melhores complexos com base na análise das interações em PDB ID: 5GWK 54

Tabela 6: 10 melhores complexos com base na análise das interações em PDB ID:1ZXM. 67

Tabela 7: Proporções (%) das interações dos ligantes da literatura “muito ativos”, “ativos” e “inativos” com os resíduos de aminoácidos e bases nitrogenadas do sítio da topoisomerase IIα co-cristalizada com o etoposídeo e o DNA 90

Tabela 8: Proporções (%) das interações dos ligantes da literatura “muito ativos”, “ativos” e “inativos” com os resíduos de aminoácidos do sítio da topoisomerase IIα co-cristalizada com ANP. 90

Tabela 9: Teste de solubilidade para o Ligante 1, (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida **(425)** 96

Tabela 10: Teste de solubilidade para o Complexo 1, (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfinacobre(II) **(70)** 96

Tabela 11: Condutância molar em etanol $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ do complexo 1 **(70)** 99

Tabela 12: Atribuições do infravermelho para Ligante **(425)** e Complexo **(70)** 102

Tabela 13: Valores (%) calculados e encontrados na análise elementar 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS: Organização Mundial da Saúde

INCA: Instituto Nacional do Câncer

DNA: Ácido desoxirribonucleico

TOP: Topoisomerase

RNA: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

Ctr: Transportadores de cobre

SOD: Superóxido dismutase

CCS: Chaperonas de cobre para a superóxido dismutase

DSV: *Discovery Studio Visualizer*

TSC: Tiossemicarbazona

PDB: *Protein Data Bank*

RMSD: *Root-mean-squared deviation*

CI_{50}: Concentração inibitória em 50%.

ROS: *Reactive Oxygen Species*

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolium

ANP: Éster adenilato do ácido fosfoaminofosfônico

ADP: Adenosina difosfato

RMN: Ressonância magnética nuclear

IV: Infravermelho

UV/vis: Ultravioleta-visível

TMS: Tetrametilsilano

MMFF: Campo de força molecular da Merck

Phen: Fenantrolina

Bipy: 2,2'-bipiridina

LISTA DE SÍMBOLOS

ppm: partes por milhão

Å: ångström

Nt: nucleotídeo

μ: micro

φ: phi

ψ: psi

n (UV-Vis): Orbital não-ligante

σ: Orbital sigma ligante

σ *****: Orbital sigma anti-ligante

π : Orbital pi ligante

π *****: Orbital pi anti-ligante

LINHAGEM CELULARES CITADAS:

MDA-MB-231: linhagem celular de câncer de mama metastático derivado de uma mulher caucasiana

HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano

SKOV-3: linhagem celular de câncer de ovário derivado de uma caucasiana

A549: linhagem de células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas

K562: linhagem celular de leucemia mielóide humana

HeLa: linhagem celular de câncer do colo do útero de afro-americana

HT-115: linhagem celular de carcinoma do cólon humano

B16F10: linhagem celular de melanoma de um camundongo

MÊS-5A/Dx5: linhagem celular de sarcoma uterino humano multirresistente

HCT116: linhagem celular de carcinoma colorretal humano de homem adulto

MCF7: linhagem celular de câncer de mama isolada derivado de uma mulher caucasiana

SUMÁRIO

1) Introdução. 21
1.1) Câncer: Aspectos gerais 21
1.2) Topoisomerase IIα humana: Aspectos gerais 24
1.2.1) Explorando os sítios catalíticos da Topoisomerase IIα 29
1.3) Complexos metálicos como agentes anticâncer. 31
1.4) Escolha do centro metálico – o cobre 33
1.5) Complexos de cobre (I) e (II) bioativos 38
1.6) Escolha dos ligantes 40
1 6.1) Derivados de isatina (8-10) 40
1 6.2) Derivados da tiossemicarbazona (11-13) 41
1.7) Complexos de cobre (II) com derivados de isatina e tiossemicarbazona (14-15). 43
2) Objetivos e Justificativa 44
3) Desenvolvimento das etapas computacionais 45
3.1) Substituintes de (16) planejados para a síntese (17-193) 45
3.2) Metodologia computacional. 46
4) Resultados obtidos *in silico* 49
4.1) Redocagem dos dois sítios ativos da TOP2α 49
4.2) Ancoragem molecular dos 180 complexos de cobre (II) planejados 52
4.2.1) Resultados para a toposiomerase IIα co-cristalizada com o etoposideo (1) e com DNA. 54
4.2.2) Resultados para a topoisomerase IIα co-cristalizada com o ANP 66
4.2.3) Possível inibição dual ATP/etoposídeo. 79

4.3) Ancoragem molecular das substâncias da literatura..... 80

5) 5) Desenvolvimento das etapas de síntese para o complexo de maior viabilidade..... 91

5.1) Materiais, instrumentação e métodos. 91

5.1.1) Materiais.....91

5.1.2) Instrumentação.....92

5.2)Métodos..... .92

5.2.1) Síntese do Ligante 1 (425): (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida 93

5.2.2) Síntese do Complexo 1 (70): (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfinacobre(II) 94

5.3) Testes de solubilidade do Ligante 1 (425) e Complexo 1 (70) 95

6) Caracterização dos produtos obtidos 96

6.1) Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN ^{1}H) do Ligante 1 (425)..... 98

6.2) Espectro na região do infravermelho para o Ligante 1 (425) e Complexo 1 (70). 99

6.3) Análise Elementar (%) de CHN.....102

7) Conclusão e Perspectivas 103

8) Referências bibliográficas..... 104

9) Anexos 112

9.1) Anexo 1: Complexos de cobre (ii) planejados. 112

9.2) Anexo 2: Gráficos de Ramachandran..... 132

9.3) Anexo 3: Ligantes da literatura (195-316) com atividade no sítio do etoposídeo (1).....133

9.4) nexo 4: Ligantes da literatura (317-420) com atividade no sítio da ATPase 148

9.5) Anexo 5: Interações das 40 melhores poses da ancoragem molecular (PDB ID:5GWK). 160

9.6) Anexo 6: Interações das 40 melhores poses da ancoragem molecular

(PDB ID: 1ZXM)..... 161

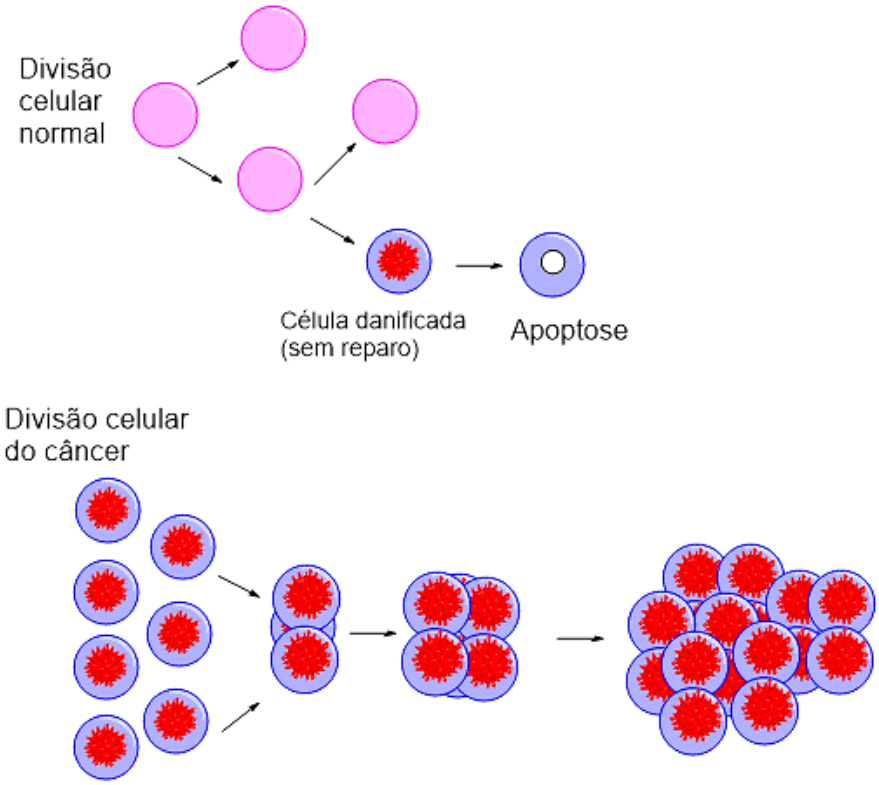
9.7) Anexo 8: Artigo publicado na “Medicinal & Analytical Chemistry International Journal” - Phosphine- and Isatin-Copper Complexes: Anticancer Activity, Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship Examples from the Last Ten Years.....162

1) Introdução

1.1) Câncer: Aspectos gerais

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de cem doenças que apresentam como característica comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo, se infiltrando em tecidos e ganhando acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos, através dos quais serão transportadas para outras partes do corpo, processo nomeado de metástase.[1,2] Esta última, diferencia os diversos tipos de câncer entre si, pois estes podem apresentar diferentes velocidades de multiplicação das células, mas todos apresentam capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes. Quando estas células se dividem rapidamente (**Figura 1**), o tipo de câncer tende a ser muito agressivo e incontrolável, levando à formação de tumores (concentração elevada de células tumorais) ou neoplasias malignas.[1,3]

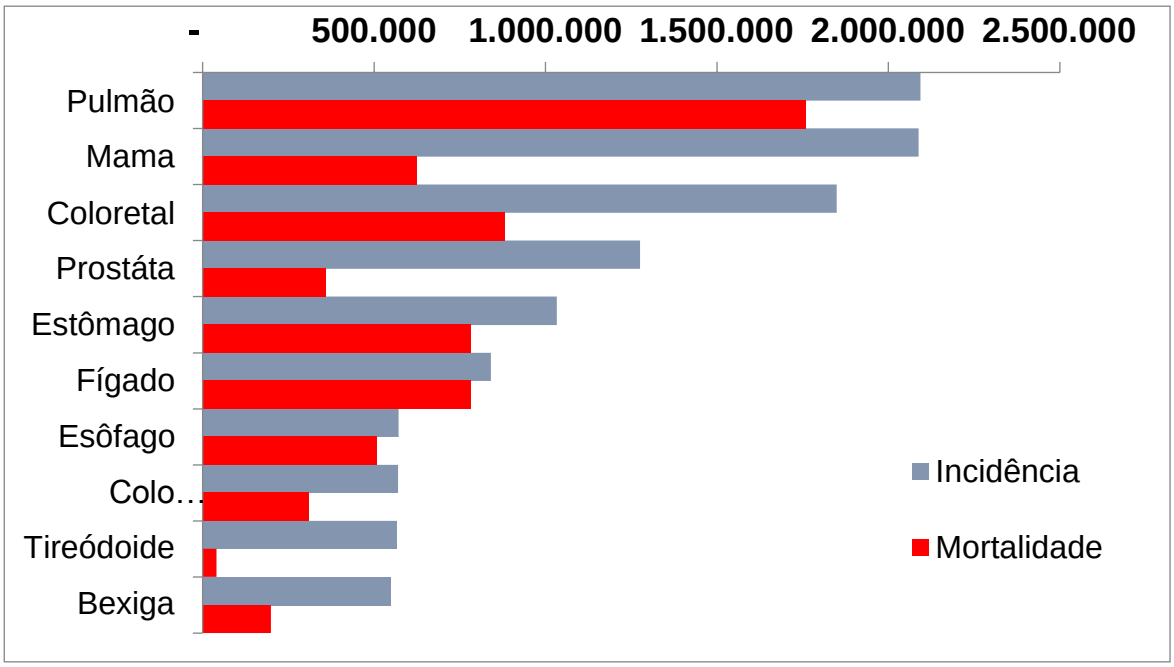
Figura 1: Divisão celular normal e do câncer (Adaptada de Khamenehfar, Avid).[4] (Figura feita em: *PerkinElmer ChemDraw Pro 15.0*)



O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países da América do Norte e da Europa. A mais recente estimativa mundial, de 2018, aponta que ocorreram, no mundo, 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos.[5] Segundo a OMS, o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Globalmente, cerca de 1 a cada 6 mortes ocorre devido ao câncer.[6]

A **Figura 2** representa a incidência de câncer (azul) e a mortalidade (vermelho), no ano de 2018 em todo mundo, para os sexos feminino e masculino, entre todas as idades.

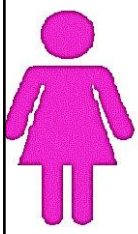
Figura 2: Incidência de câncer (azul) e mortalidade (vermelho), no ano de 2018 em todo mundo, para os sexos feminino e masculino, entre todas as idades (extraído de *Global Cancer Observatory)*.[6]



A análise da **Figura 2** revela a alta incidência do câncer de mama e pulmão, sendo o de pulmão o de maior taxa entre todos. É necessário observar que a mortalidade do câncer de mama é aproximadamente 30% enquanto o câncer de fígado é de aproximadamente 93% passando a porcentagem de mortalidade até do câncer de pulmão que é 84,1%, ou seja, o câncer de fígado, embora não tão incidente como o de mama e de pulmão é o que apresenta a maior relação de mortalidade sobre incidência, seguido do câncer de esôfago que apresenta uma relação de aproximadamente 88,9%. No Brasil, uma estimativa foi levantada pelo Instituto

Nacional de Câncer (INCA) e o Ministério da Saúde para o ano 2020, e está representada na Figura 3:

Figura 3: Distribuição percentual dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma. (Adaptada de INCA)[5]

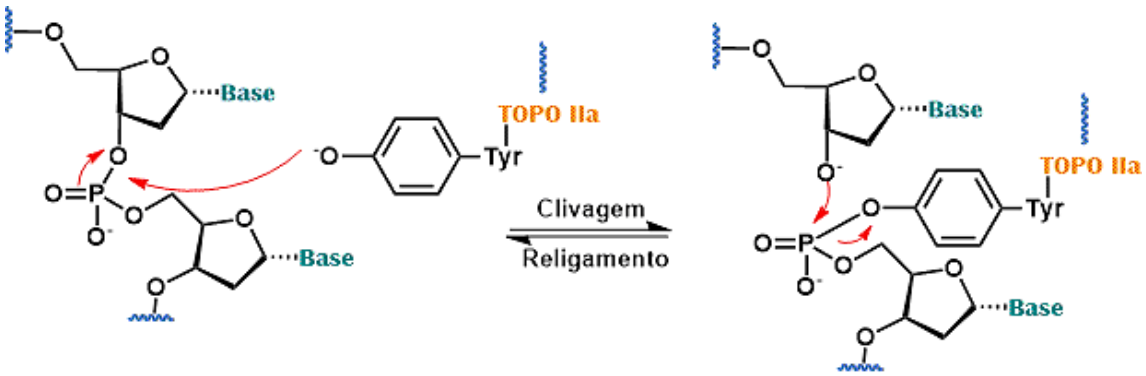
	Localização primária	Casos	%
Mulher 	Mama	66.280	29,70%
	Cólon e Reto	20.470	9,20%
	Colo do utero	16.710	7,50%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,60%
	Glândula Tireóide	11.950	5,40%
	Estômago	7.870	3,50%
	Ovário	6.650	3,00%
	Corpo do útero	6.540	2,90%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,40%
	Sistema Nervoso Central	5.220	2,30%
Homem 	Próstata	65.840	29,20%
	Cólon e Reto	20.540	9,10%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,90%
	Estômago	13.360	5,90%
	Cavidade Oral	11.200	5,00%
	Esôfago	8.690	3,90%
	Bexiga	7.590	3,40%
	Linfoma não Hodgkin	6.580	2,90%
	Laringe	6.470	2,90%
	Leucemias	5.920	2,60%

Na **Figura 3** é possível observar a alta estimativa para a incidência de diversos tipos de câncer, o que está relacionado com os hábitos de vida, como alimentação e sedentarismo, e aumento da expectativa de vida na população.[5] A maior incidência para homens é o câncer de próstata e para mulheres é o câncer de mama. Contudo, vale destacar, como foi analisado na **Figura 2**, que embora esses dois tipos de câncer possuem alta taxa de incidência, eles não apresentam as maiores porcentagens de mortalidade que são para câncer de mama de aproximadamente 30% e para o câncer de próstata 28,13%.

1.2) Topoisomerases IIα humana: aspectos gerais

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero longo, de forma que um único genoma de mamíferos corresponde a aproximadamente 2 metros de comprimento, que carrega toda informação genética das células e é através dele que os cromossomos passam as informações para o funcionamento da célula. Devido ao seu tamanho, o DNA é altamente compactado, o que cria muitas alças nos domínios (*loops*) e pontos de contato entre esses domínios. Durante seu processo de replicação e transcrição, é necessário que o DNA seja superenovelado, como consequência da rotação limitada dos seus domínios. Porém, o acúmulo do DNA superenovelado gera bloqueio de processos essenciais, como replicação e transcrição, além da geração de nós no material genético que quando se acumulam, impedem a separação da fita dupla de DNA.[7,8,9] Assim, as topoisomerases (TOPs) são enzimas essenciais que gerenciam a ordem do estado estrutural do DNA, e possuem como principal função a resolução de problemas topológicos nas fitas. Clivando seletivamente, rearranjando e religando cadeias de DNA, as TOPs podem alterar o estado superélico, permitindo um relaxamento que possibilita a separação das fitas de DNA para replicação e transcrição.[7,10] Dessa forma, a importância funcional desta enzima está na manutenção da integridade genômica.[11] Além disso, apresentam como característica comum à sua atividade catalítica, o ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster existente entre os nucleotídeos de uma fita de DNA, através de um resíduo catalítico de tirosina, resultando assim numa ligação covalente entre o fosfato e a tirosina (**Figura 4**).[12]

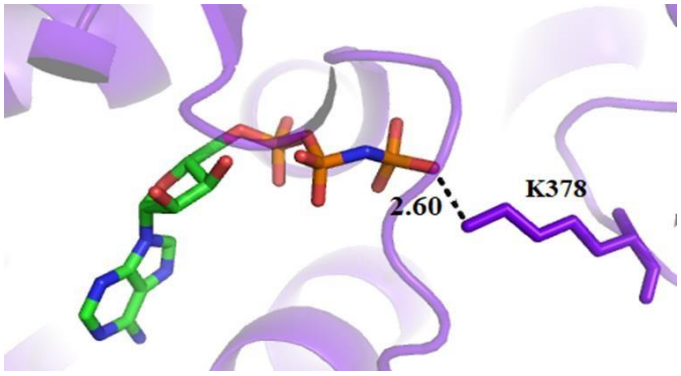
Figura 4: Representação do ataque nucleofílico da tirosina à ligação fosfodiéster de uma das fitas do DNA.



O alongamento pode ser um processo rápido, ocorrendo a uma taxa de aproximadamente 40 nucleotídeos por segundo. Para que o alongamento ocorra, o DNA deve ser continuamente desenovelado, de forma que a fita molde esteja acessível à RNA polimerase. As DNAs topoisomerases I e II, enzimas associadas ao complexo de transcrição, movem-se ao longo do molde com a RNA polimerase, separando as fitas de DNA para que elas estejam livres para a síntese de RNA.[10,13,14]

Há dois tipos principais de topoisomerases e tais enzimas são diferenciadas e classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação em duas classes: **(i)** TOP I, que induzem a quebra de apenas uma fita, sendo que nenhum cofator de energia é necessário para realizar esta reação; **(ii)** TOP II, que promovem a quebra das duas fitas do DNA, fazendo-se necessário o uso de ATP (adenosina trifosfato).[15] O resíduo de aminoácido da cadeia lateral lisina 378 é conservado no sítio ativo do ATP, e acredita-se que ao realizar uma ponte de salina com o AMPPNP (**Figura 5**), ele estabilize o estado de transição da reação de hidrólise, sendo assim essencial para o funcionamento da enzima.[16]

Figura 5: Distância entre o resíduo de lisina 378 e o grupo fosfato da ANP (Figura feita em: *PyMOL(TM) 1.0*)

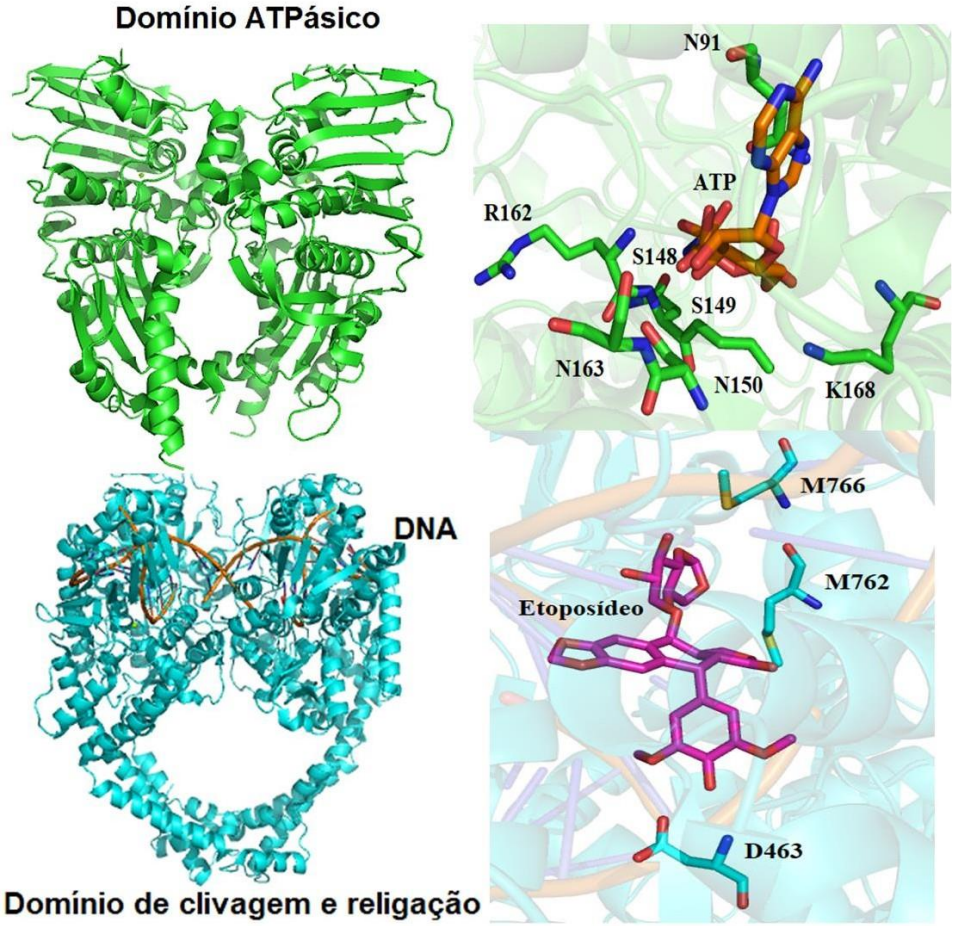


Existem duas isoformas da TOP II (alfa e beta) que se diferem, principalmente, pela sua produção durante o ciclo celular. A TOPIIα está primordialmente envolvida na regulação do enovelamento do DNA durante as fases de replicação e durante a fase de segregação cromossômica, permitindo assim que as células-filhas recebam os cromossomos adequadamente.[15] Dessa forma, elas são necessárias para reduzir o nível de nós do DNA, que é esperado que ocorra pela alta compactação do DNA, sendo que estas formas de nós são nocivas se ficarem acumulados. As TOPIIα são

encontradas nos tecidos de proliferação rápida, indicando que esta isoforma possuí a responsabilidade principal por eventos associados com a replicação do DNA e da segregação dos cromossomos. Além disso, ela está presente no ciclo celular, tendo seu aumento na fase S da mitose (M) e seu pico na fase G2/M, e por isso, são encontradas em grande quantidade em tecidos de proliferação rápida, enquanto a TOPIIβ é independente do ciclo celular.[11,17]

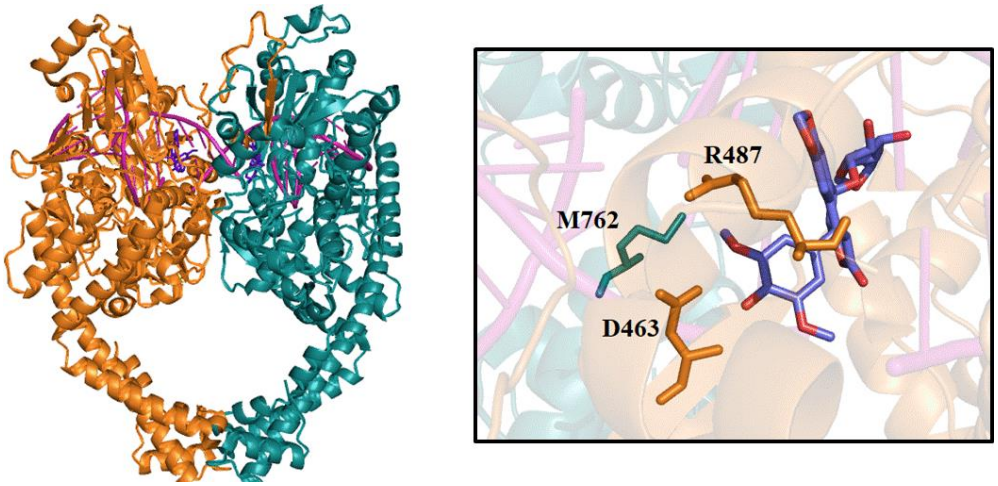
A TOPIIα é uma molecula dimérica, como representado na **Figura 6**, com dois domínios cataliticamente importantes: (i) o domínio ATPásico N-terminal, que catalisa a hidrólise das moléculas de ATP, fornecendo energia para os processos catalíticos (verde) e (ii) o domínio central, localizado no centro do domínio de clivagem e da religação, compreendendo os resíduos catalíticos importantes para cliavagem e captura do DNA (azul).[8,9]

Figura 6: A estrutura dimérica da topoisomerase IIα com DNA, seus domínios e regiões de ligação. (Adaptada de MAHALAPBUTR, Panupong)[8] (Figura feita em: *PyMOL(TM) 1.0*)



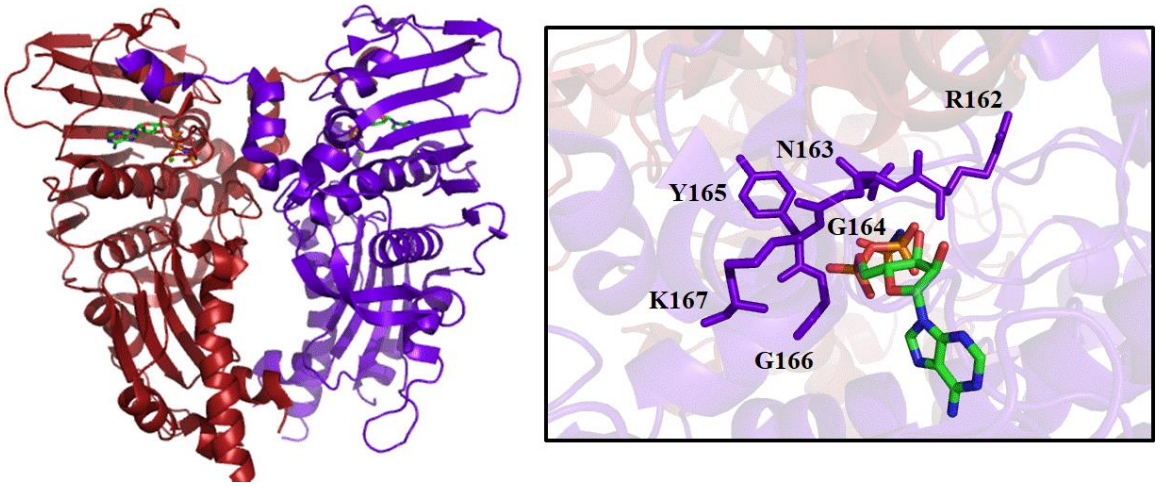
Como observado na **Figura 6**, no domínio de clivagem e religação está o sítio de interação do etoposídeo, um fármaco classificado com inibidor interfacial da TOPIIα. Utiliza-se a estrutura co-cristalográfica dele para predizer as interações com os resíduos de um dos sítios ativos (**Figura 7**).[18,19]

Figura 7: Topoisomerase IIα co-cristalizada com o DNA e o etoposideo **(1)** com PDB ID: 5GWK. (Extraído do *Protein Data Bank*)[20] (Figura feita em: *PyMOL(TM) 1.0*)



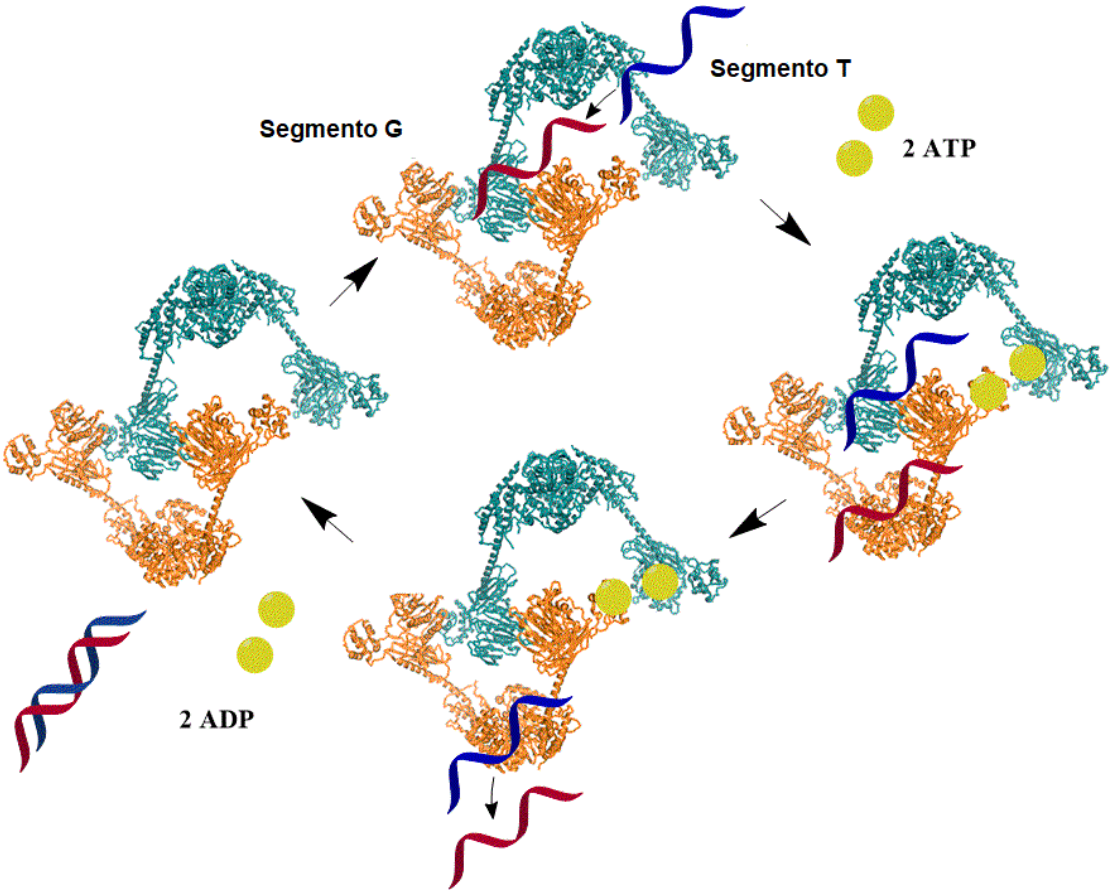
No domínio acima atuam os inibidores que são chamados de venenos para TOPIIα. Da mesma forma, na **Figura 6**, há o domínio ATPásico representado em verde. A estrutura co-cristalográfica da TOPIIα com o ANP (um análogo não hidrolisado do ATP) é usada para predizer as interações com os resíduos desse sitio ativo, e está representada na **Figura 8**.[22]

Figura 8: Estrutura co-cristalográfica da TOPIIα no domínio ATPásico com PDB ID: 1ZXM. (Extraído do *Protein Data Bank)*[20] (Figura feita em: *PyMOL(TM) 1.0*)



Nesse domínio atuam os inibidores catalíticos que atuam em alguma etapa do ciclo catalítico. O ciclo catalítico da TOPIIα está representado na **Figura 9**.

Figura 9: Ciclo catalítico da TOPIIα (Figura feita em: *PerkinElmer ChemDraw Pro 15.0*)



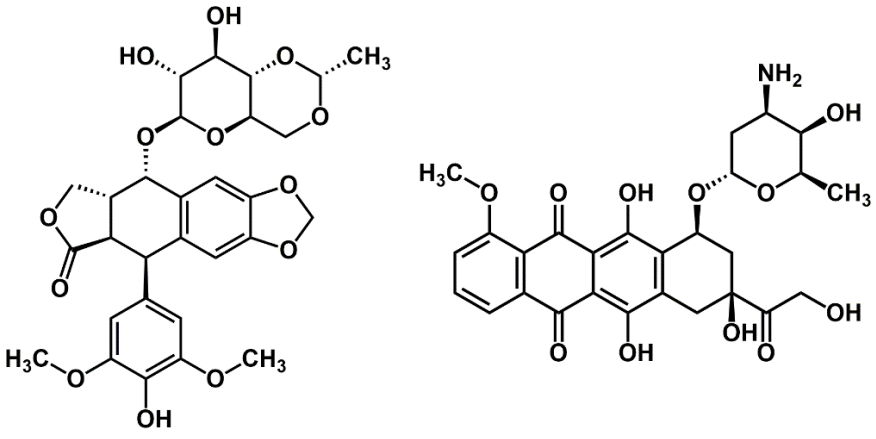
O ciclo começa com a ligação da enzima a dois segmentos de DNA de fita dupla (G e T). Em seguida, duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) se ligam à enzima levando à dimerização do domínio ATPase. Na sequência, o segmento G é

clivado, e o segmento T é transportado através do segmento G clivado, que é acompanhado pela hidrólise de uma molécula de ATP. O segmento G é religado e a molécula de ATP restante é hidrolisada. Após a dissociação das duas moléculas de ADP (difosfato de adenosina), o segmento T é transportado através do domínio nuclear aberto. No estágio final do ciclo, o domínio nuclear é fechado e os domínios ATPase reabrem, permitindo que as fitas de DNA se dissociem. Assim, com o término do ciclo a tensão superficial é aliviada e a fita de DNA liberada. [21,23,24]

1.2.1) Explorando os sítios catalíticos da Topoisomerase IIα

Os fármacos que possuem a TOPIIα como alvo podem atuar em diferentes etapas do ciclo. Contudo, eles são divididos em duas categorias distintas: **(i)** os venenos, também chamados de inibidores interfaciais e **(ii)** os inibidores catalíticos.[3,19] Os fármacos que atuam no domínio de clivagem e religação ciclo são chamados de venenos para TOPIIα. Os venenos para TOPIIα são responsáveis pela formação de um composto ternário estável fármaco-DNA-TOPIIα. Este composto aumenta a quebra das fitas do DNA, gerando intermediários tóxicos para as células, desencadeando o processo de morte celular, a aptoptose.[10,14] São fármacos com ação de veneno o etoposídeo **(1)** e a doxorrubicina **(2)**, representados na **Figura 10**. [25,26]

Figura 10: Estrutura do etoposídeo **(1)** e doxorrubicina **(2)** veneno para TOPIIα.[26,27]



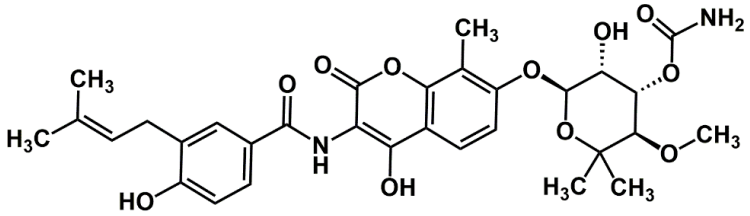
(1) CI_{50} = 2,56 nM (A549)

(2) CI_{50} = 2 µM (HCT116)

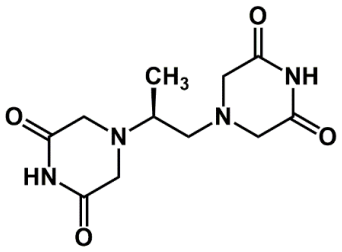
Estes fármacos possuem elevada toxicidade, com efeitos colaterais como: mielossupressão (etoposídeo **(1)**) e cardiotoxicidade (doxorrubicina **(2)**), além do desenvolvimento de tumores secundários.[28] No entanto, as topoisomerases tipo II também são alvos de alguns dos medicamentos anticâncer mais amplamente prescritos no mundo.[29] Nesse sentido, faz-se necessário a busca de novos fármacos capazes de atenuar os efeitos adversos e diminuir os riscos de tumores secundários.

Portanto, visando uma classe de compostos capazes de interagir com a TOPOIIα de uma forma diferente dos venenos, foram desenvolvidas substâncias conhecidas como inibidores catalíticos.[25] Os inibidores são compostos que podem agir em diversas etapas do ciclo catalítico da enzima, afetando o funcionamento da proteína por diferentes vias. São exemplos de inibidores catalíticos a novobiocina **(3)**, que é responsável pela inibição da ligação DNA-TOPIIα, e o ICRF-187 **(4)**, que estabiliza o complexo não covalente DNA-TOPIIα e inibe a ligação do ATP-TOPIIα (**Figura 11**).[25,30]

Figura 11: Estrutura da novobiocina **(3)** e ICRF-187 **(4)**,inibidora catalítica da TOPIIα.[30,31]



(3) CI_{50}= 85 µM (MCF7)



(4) CI_{50}= 24,4 µM (MCF7)

Inibidores catalíticos normalmente apresentam menor toxicidade ao corpo, por não formarem o complexo DNA-TOPIIα por ligação covalente. Contudo, inibidores catalíticos podem causar falhas nas mitoses das células, impedindo o TOPIIα de aliviar a tensão através da inibição da hidrolise do ATP.[9,13] O ICRF-187 **(4)** possui,

além da atividade frente à enzima, capacidade de atenuar a cardiotoxicidade gerada pela doxorrubicina **(2)**.[28]Outra vantagem dos inibidores catalíticos é a seletividade entre as isoformas alfa e beta da topoisomerase II.[27]

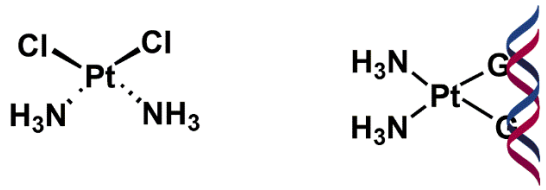
Grande parte dos tipos de câncer em tratamento possui alta chance de regressão, se a proliferação de células tumorais for evitada, interrompendo a replicação do DNA, o que desencadeia eventos celulares, induzindo a apoptose, um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas.[32] Entretanto, uma das maiores dificuldades no tratamento do câncer está em distinguir as células tumorais das normais no corpo, pois ambas possuem semelhanças. Os agentes utilizados no tratamento do câncer resultam em danos tanto para as células normais como para asneoplásicas, mas em proporções diferentes. Esses agentes causam maior dano às células malignas devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares.[23] Uma das formas mais usuais no combate de neoplasias se baseia na utilização de medicamentos, a chamada quimioterapia, método citotóxico que utiliza compostos químicos no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de antineoplásica.[33] Um dos maiores problemas do uso da quimioterapia antineoplásica é a quantidade significativa de efeitos colaterais, o que está relacionado principalmente com os alvos dos fármacos utilizados. Por exemplo, os fármacos cujosalvos consistem em processos universais como a síntese de DNA, tendem a apresentar efeitos colaterais graves. Este é o caso de diversos agentes quimioterápicos disponíveis.[27,34] Em geral, os fármacos são administrados por via endovenosa, podendo também serem administrados por via oral, intramuscular e subcutânea; chegam à corrente sanguínea e são levados à todas partes do corpo, destruindo as células tumorais que estão formando o tumor e impedindo, também, queelas se espalhem pelo corpo.[32]

1.3) Complexos metálicos como agentes anticâncer

O planejamento de compostos com atividade anticâncer se baseia, principalmente, nos complexos metálicos de platina. A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina(II)) **(5)** teve sua atividade descoberta na década de 60 pelo

biofísico Barnett Rosenberg e desde o início do seu uso contra o câncer de testículo, mais de 90% dos casos foram tratados com sucesso.[35] A cisplatina **(5)** (**Figura 12**) possui estrutura quadrática plana podendo se ligar covalentemente ao DNA via coordenação de bases nitrogenadas ao íon metálico. A estrutura *cis* dessas moléculas (isto é, a presença dos dois grupos reativos no mesmo lado da molécula, em lugar de extremidades opostas) proporciona a capacidade de fazer ligação cruzada com guaninas adjacentes na mesma fita de DNA (ligação cruzada intrafita) ou, com menos frequência, em fitas opostas de DNA (ligação cruzada interfita). Essa ligação provoca modificações químicas ao DNA, levando as células ao processo de apoptose.[34,36]

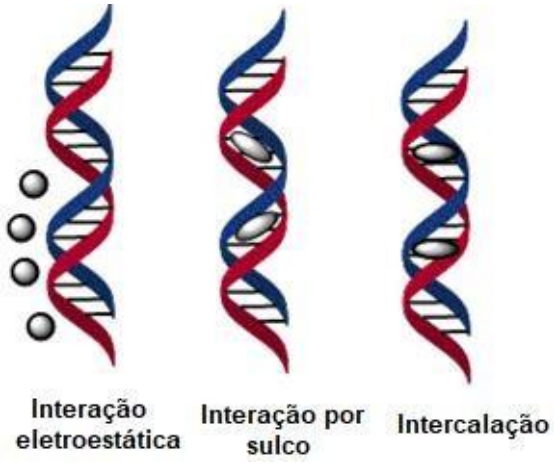
Figura 12: a) Estrutura da cisplatina **(5)** e **b)** modos de interação da cisplatina com o DNA.



a) (5) IC_{50} = 508,9 µM (K562) **b)**

Contudo, as células tumorais podem desenvolver resistência à cisplatina através do aumento na frequência do processo de reparo de lesões do DNA, diminuição da captação do fármaco ou potencialização da inativação do fármaco.[34] Sendo assim, a pesquisa científica busca por complexos metálicos estáveis nos meios fisiológicos, com maior seletividade e menor toxicidade para as células saudáveis.[28] Os complexos metálicos podem interagir com o DNA de três formas diferentes: por interação eletrostática, interação por sulco e por intercalação, mostradas na **Figura 13**:

Figura 13: Representação esquemática de possíveis modos de interação complexo-DNA. Adaptado de Barra, C. V.; Netto, A. V. G.[36] (*Figura feita em: PerkinElmer ChemDraw Pro 15.0*)



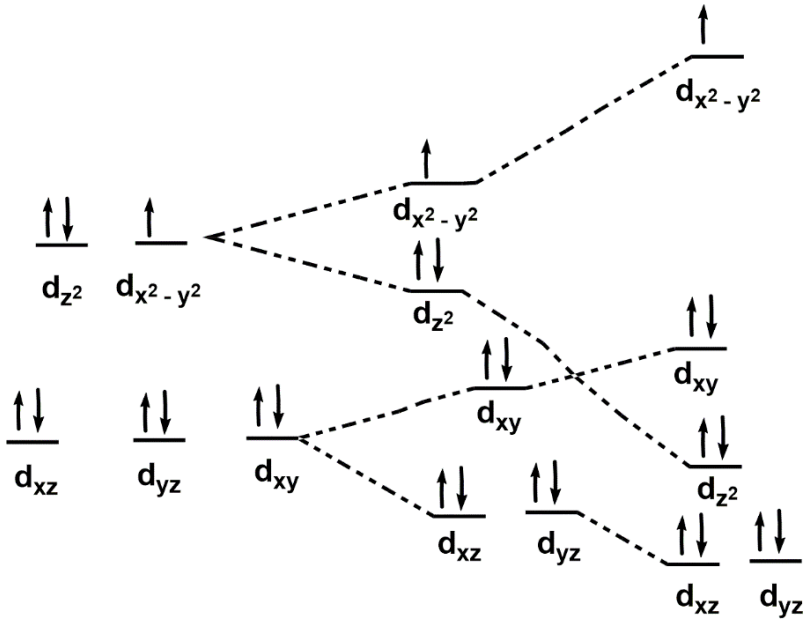
Os complexos metálicos se ligam ao DNA, por intercalação, entre os pares eletrônicos das bases do ácido nucléico, por interação eletroestática e por interação por sulco, sendo esta última, por meio de ligação covalente com as bases nitrogenadas e/ou a pentose, como ocorre no caso da cisplatina, amplamente usada na quimioterapia antineoplásica, para a qual se formam adutos Pt-DNA. Assim sendo, essa pode ser considerada o tipo de interação mais investigada.[36,37]

Os sulcos são cavidades por onde os complexos metálicos podem interagir mais facilmente com as bases nitrogenadas, já que nessas regiões a repulsão dos grupos fosfato é menor, de modo que as bases se apresentam mais expostas.[36] Dentre os tipos já mencionados de interação que ocorrem entre o DNA e os complexos metálicos, a interação eletrostática não específica ocorre devido a carga positiva dos metais e a carga negativa do esqueleto carbono-fosfato do DNA.[14,37] O fato é que as modificações estruturais que ocorrem nas interações podem levar a alterações funcionais, como frequentemente à inibição da replicação e transcrição e processos de reparo do DNA.[37]

1.4) Escolha do centro metálico para o planejamento estrutural – o cobre

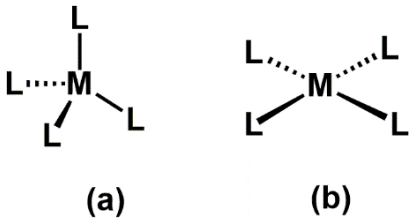
O íon cobre metálico (Cu^{2+}) tem a configuração eletrônica $3d^9$, restando apenas um orbital para o qual um elétron pode ser promovido. Os nove elétrons *d* se distribuem da seguinte maneira: $(t_{2g})^6(e_g)^3$. Os três elétrons e_g ocupam orbitais da seguinte forma: $(d_{x^2}\text{-}y^2)^2(d_{z^2})^1$, representado na **Figura 14**. Como o preenchimento do nível e_g não é simétrico, ocorre a distorção de *Jahn-Teller*. Assim, há a quebra da degenerescência dos orbitais e_g e t_{2g}, isto é, os dois orbitais e_g passam a não ter a mesma energia. Dessa forma, os ligantes que se aproximam segundo a direção z são impedidos de se aproximarem do cobre tanto quanto os ligantes que se aproximam ao longo das direções x e y.[38,39]

Figura 14: Representação do diagrama de energia dos orbitas d^9 para o íon cobre (II). (*Figura feita em: PerkinElmer ChemDraw Pro 15.0*)



Os dois estados redox mais adequados, Cu(I) e Cu(II), bem como as geometrias tetraédricas, quadráticas planas e octaédricas em torno do centro metálico, fazem do cobre um metal atraente para o projeto de novos metalofármacos.[40,41] A maioria dos complexos e compostos de Cu(II) apresentam uma estrutura octaédrica distorcida. Para o número de coordenação igual a quatro, podem ser assumidas as geometrias tetraédrica ou quadrado-planar, **Figura 15**.[39,42]

Figura 15: Representação da geometria tetraédrica **(a)** e quadrática plana **(b)**



Quanto à ação no organismo, a importância dos metais em sistemas biológicos é caracterizada por sua grande facilidade em trocar elétrons, formando íons metálicos capazes de interagir com diferentes biomacromoléculas.[37,41]A capacidade de atividade biológica dos complexos se relaciona principalmente com a natureza do íon metálico, seu estado de oxidação, sua geometria, número e tipos de ligantes. Tais características são planejadas para melhorar a potencialidade do complexo, que futuramente, poderá se tornar um fármaco, sendo que a introdução de complexos

metálicos em sistemas biológicos pode ser aprovada para fins terapêuticos ou diagnósticos. Os íons metálicos na forma de complexos, enquanto aumentam as funcionalidades e as orientações geométricas atribuídas à capacidade de quelação, enriquecem as aplicações medicinais.[41,42]

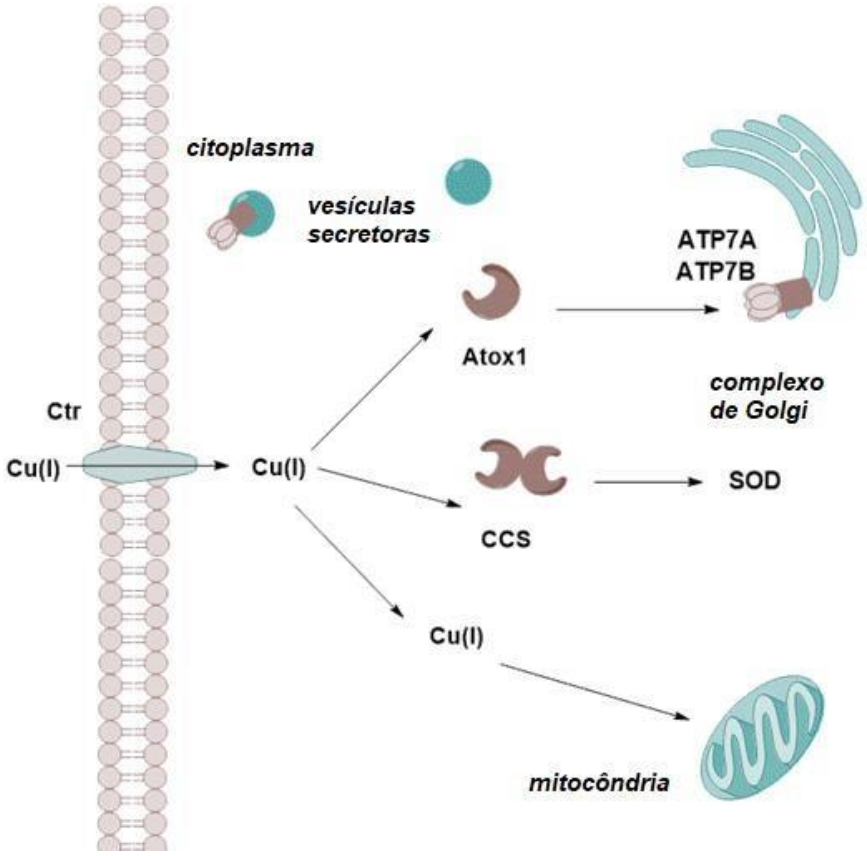
O cobre é um elemento essencial, com papéis vitais em vários processos biológicos no corpo.[43] Este metal pode ser encontrado em metaloenzimas, atuando como cofator em oxidases e hidroxilases, auxiliando no transporte de elétrons na citocromo oxidase, atuando como cofator em processos metabólicos envolvendo tecido articular/conectivo e sistema imunológico, entre outros.[43,44]

Tabela 1: Principais tipos, ocorrência e função de biomoléculas contendo cobre. [41,43,44]

Tipo	**Ocorrência**	**Função**
Citocromo c oxidase	mitocôndria	Oxidase terminal ($O_2 \rightarrow H_2O$)
Ceruloplasmina	Soro humano e animal	Transporte de Fe^{2+}
Hemocianina	Moluscos e artópodes	Transporte de O_2
Superóxido dismutase	Glóbulos vermelhos	Desproporcionamento do íon O_2^{2-}

Embora este metal possua dois estados redox acessíveis, a captação celular de espécies de cobre em células eucarióticas ocorre por membros da família de transportadores de cobre (Ctr) (**Figura 16**).[43]

Figura 16: O caminho do cobre nas células humanas. (Extraído de Vieira M.A.).[43] (*Figura feita em: PerkinElmer ChemDraw Pro 15.0*)



A combinação do SOD1 com íons de cobre ocorre principalmente no citosol, mas uma pequena quantidade de SOD1 pode ser localizada na mitocôndria se o CCS também estiver presente no espaço intermembranar. As chaperonas do tipo Atox1 transferem Cu(I) para a membrana de transporte, que em seguida fornece o cobre para as ATPases da doença de Menkes e Wilson (também conhecidas como ATP7A e ATP7B, respectivamente) para incorporação final na ceruloplasmina.[44] As proteínas transportadoras de cobre (Ctr) compreendem o sistema de absorção de cobre em células eucariotas. Elas são identificadas em leveduras, plantas e humanos (hCtr1), contendo três segmentos transmembranares C^- e N^- terminais localizados ao lado oposto da membrana plasmática. Como representado na **Figura 16**, a entrega de cobre ao Cu,Zn-superóxido dismutase 1 (SOD1) é realizado através das chaperonas de cobre para a superóxido dismutase (CCS).[43,46,47]

O SOD1 catalisa a conversão do íon superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Equação 1). Os superóxidos dismutase (SODs) pertencem à família de isoenzimas ligadas na eliminação de radicais livres de O_2 ocorridos na cadeia respiratória, sendo assim, um dos sistemas de proteção celular contra danos oxidativos.[45,47]

Equação 1: SOD-Cu^{2+} em reações de oxirredução

$$SOD\text{-}Cu^{2+} + O_2^{-} \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{+} + O_2$$

$$SOD\text{-}Cu^{+} + O_2^{-} + 2H^{+} \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

A função adequada de metaloproteínas importantes pode ser afetada pela atividade redox do cobre (Cu). O Cu está ligado à albumina, à ceruloplasmina (glicoproteína produzida no fígado) e à transcupreína (uma macroglobulina), todas no sangue.[45] Os distúrbios genéticos podem ser reflexos da desregulação da homeostase do cobre. Em humanos, a concentração dos níveis de cobre é controladanas células e órgãos. A distribuição de cobre ocorre no fígado através das proteínas ceruloplasmina e albumina quando é absorvida anteriormente no intestino delgado e no estômago. A ingestão de cobre em humanos recomendada está entre 1,5 e 3,0 mgCu / dia.[48] Em relação aos estados redox, o íon Cu(II) é tipicamente encontrado no sangue, enquanto o mecanismo de captação celular envolve a forma Cu(I) reduzida.[46,49]

Dessa forma, o cobre é importante para a atividade antioxidante, síntese de colágeno, transporte de ferro e peroxidação lipídica. A falta ou sobrecarga nos níveis de concentração de cobre pode ser responsável por diversos sintomas, como: anormalidades ósseas, mielopatia, neuropatia óptica, crescimento e progressão de doenças cardiovasculares, entre outros.[43,45] Um dos motivos para a redução da absorção de cobre no sangue é devido à doença genética de herança recessiva ligada ao sexo masculino (mutação no gene que codifica ATP7A), nomeada síndrome de Menkes, que afeta o sistema nervoso central. Por outro lado, o excesso nos níveis da concentração de cobre (Cu^{2+}) no fígado e tecidos cerebrais, degeneração hepatolenticular, pode ser oriundo da doença de Wilson, doença autossômica recessiva (mutação no gene ATP7B 2).[45,49] O cobre pode trazer estresse oxidativo, uma vez que o íon Cu(II) pode sofrer redução na presença de radical superóxido para

formar um íon Cu(I) e um oxigênio molecular. Em sequência, a produção de espécies de radical hidroxila pode ser catalisada por íons Cu(I). Assim, o nível de ROS pode aumentar significativamente.[49,50] Existem processos biológicos críticos que são afetados pela produção anormal de ROS, principalmente a morte celular programada (apoptose) e mutação na estrutura biomolecular do DNA (AT-GC e GC-AT). Além disso, o cobre endógeno desempenha papel vital nos processos biológicos, principalmente na transferência de oxigênio e elétrons e no dano oxidativo ao DNA, ambos relacionados com idosos.[43,51]

1.5) Complexos de cobre (I) e (II) bioativos

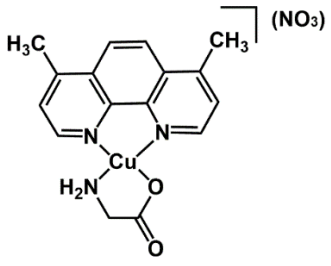
. Como exemplo de atividades biológicas, complexos de cobre(II), contendo furazolidina como ligante, apresentaram propriedades bactericidas promissoras frente aos micro-organismos *Pseudomonas mangiferae, Bacillus pumillus e Salmonela typhi*. Por exemplo, no caso de *S. tvphi* e *P. mangiferae*, a variação percentual sobre a droga de controle é -60,86 e -23,80, respectivamente.[52] Da mesma forma, há relatos de complexos de cobre (II) com atividade biológica antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus, Pseudomonas pyocyanea* e *Klebsiella aerogens* com zona de inibição no valor de 15,5 nM, 7,5 nM e 12,6 nM, respectivamente.[53,54]

Complexos à base de cobre (II) também têm sido investigados como antitumorais porque os metais endógenos podem promover menos efeitos colaterais em comparação com a cisplatina.[55] Os mecanismos de ação dos complexos de cobre podem ocorrer pela degradação do DNA, inibição da topoisomerase e / ou proteassoma.[43,55] As atividades biológicas desses complexos têm sido atribuídas ao sinergismo entre os íons metálicos Cu(I) ou Cu(II) e seus ligantes. Assim, diversos ligantes para vários complexos de cobre, podem ser explorados para encontrar candidatos ao tratamento do câncer.[43] Como segue, uma característica importante diz respeito ao estado de oxidação do centro metálico. Mesmo que as espécies Cu(I) sejam encontradas em proteínas Ctr para a internalização ativa do cobre biológico em células de mamíferos, esse mesmo agente antitumoral Cu(I) é raramente encontrado porque é dificilmente estabilizado, especialmente em meio aquoso, podendo sofrer hidrólise. Assim, Cu(I) é facilmente oxidado em Cu(II) na maior parte das aplicações.[49] Portanto, quando os íons Cu(I) são manipulados para o planejamento de novos complexos ativos, os ligantes capazes de estabelecer uma ligação metal-ligante

estável com Cu(I) são obrigatórios. Neste contexto, as fosfinas têm sido utilizadas para prevenir a hidrólise e degradação dos complexos.[35] Além disso, uma base doadora macia, como os átomos de S^-, P^-, C^- e aminas aromáticas, tem preferência para se ligarem aos ácidos macios de Pearson, como o Cu(I). Estes complexos são frequentemente coordenados de quatro maneiras, assumindo geralmente, geometria tetraédrica. Sua configuração eletrônica *[Ar] $3d^{10}$* faz com que esta orientação espacial seja preferida.[43,49]

Por outro lado, há muito mais complexos baseados em Cu(II) como agentes antitumorais na literatura, porque o Cu(II) é quimicamente mais estável em meio aquoso, permitindo que um alto número de ligantes possam ser explorados, e diversas geometrias possam ser adquiridas: quadrática plana (*sp*) ou tetraédrica (*td*) se for tetracoordenado, bipiramidal trigonal (*tbp*) para pentacoordenado e o octaédrico (*oc*) para hexacoordenados.[38,49] Há uma classe interessante de complexos de cobre (II) de fórmulas gerais $[Cu(NN)(ON)]NO_3$ e $[Cu(NN)(OO)]NO_3$ conhecidas genericamente como Casiopeínas® (**Figura 17**), em que NN é uma diimina aromática substituída (phen, bipy ou derivados), ON é um peptídeo ou α-aminoácido e OO é acetilacetonato ou salicilaldeído.[55,56] Esses complexos foram patenteados e registrados[57], e foram testados em vários modelos in vitro e in vivo, mostrando atividade antiproliferativa (10 µg/ml)[55], citotóxicas (CI_{50} = 1.6 ± 0.3 em MCF7)[60], genotóxicas (CI_{50} = 78.3 ± 4.5 em HeLa)[58] e antitumorais (CI_{50} = 2.1 (819.04) em MCF-7)[61], além de baixa toxicidade para células saudáveis, linfócitos e macrófagos.[56,59] As Casiopeínas®, como a Cas-II-Gly ([Cu (glicinato) (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)]NO_3) **(6)**, encontram-se na fase 2 de ensaios clínicos com pacientes pediátricos e adultos jovens que apresentam leucemia linfoblástica aguda de células B.[61]

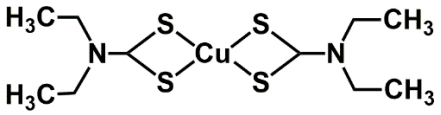
Figura 17: Casiopeína® Cas-II-Gly **(6)**



(6) CI_{50} = 2 µM (HCT-15)

Além desse, está também em fase II de ensaios clínicos, para tratamento de câncer de mama metastático, a combinação de cobre (II) com dissulfiram (**Figura 18**), tendo fortes evidências para a formação rápida do complexo bis (*N,N*-dietil ditiocarbamato) de cobre (II) *in situ*.[62,63] Esse mesmo complexo inibe a metástase no carcinoma hepatocelular e inibem células de carcinoma de pulmão (A549).[64,65,66]

Figura 18: Complexo bis (*N,N*-dietilditiocarbamato) de cobre (II) **(7)**



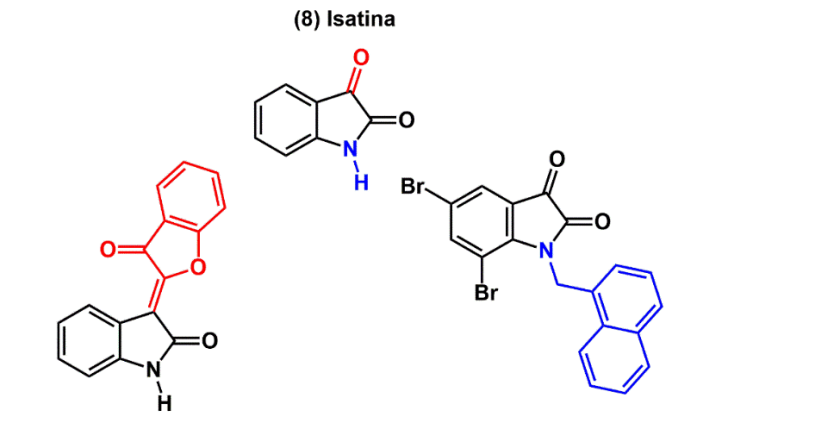
(7) CI_{50}= 3 ± 3 nM (A549)

1.6) Escolha dos ligantes para o planejamento estrutural

1.6.1) Derivados de isatina (8-10)

A subunidade isatina representada na **Figura 19** contém padrão estrutural derivado do indol, sendo este último presente na estrutura do aminoácido triptofano, substância endógena, tanto em humanos, como em outros tecidos e fluidos de mamíferos, relacionado com a via metabólica do triptofano. A versatilidade química da isatina a torna adequada para diversas modificações químicas, por exemplo: reação de N-alquilação (em azul), reação de condensação (em vermelho), reação de substituição eletrofílica aromática e reação de redução.[67]

Figura 19: Estrutura da isatina **(8)** e derivados **(9)** e **(10)**.



(8) Isatina

(9) CI_{50} < 0,01 µM (B16F10)

(10) CI_{50} = 0.311 ± 0.01 µM (MES-SA/Dx5)

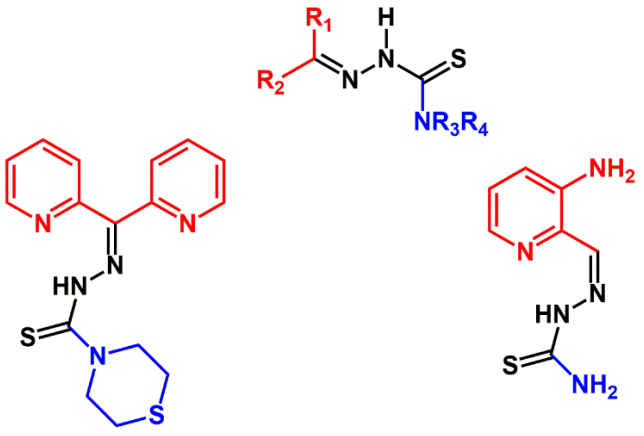
Há derivados de isatina que exibem uma ampla gama de atividades biológicas, como atividade anticâncer (CI_{50} = 0,79 µM em MCF-7)[68], antibactericidas (CIM = 6.25-50 µg/mL contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*)[69], antiprotozoárias (CI_{50} = 14,8 µM contra *Naegleria fowleri*)[70] e antivirais (CE_{50} = 0.23 µM contra DENV-2).[71] Isso ocorre, principalmente, pois o derivado indólico da isatina é reconhecido como uma estrutura privilegiada, ou seja, se trata de um esqueleto molecular com propriedades versáteis de interação com diferentes alvos moleculares. Assim, derivados da isatina podem interagir de forma potente e seletiva com diferentes alvos, como os mencionados acima.[67]

1.6.2) Derivados da tiossemicarbazonas (11-13)

As tiossemicarbazonas (TSC), como demonstrada na **Figura 20**, são formadas da reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas, e contêm átomos de nitrogênio e enxofre com forte capacidade de coordenação, que podem formar vários complexos com estruturas diferentes, como por exemplo, estruturas com geometria octaédrica se o número de coordenação for seis e estruturas com geometria tetraédrica se o número de coordenação for quatro.[72]

Figura 20: Estrutura genérica das tiossemicarbazonas **(11)** e alguns derivados **(12,13)**

(11) Estrutura genérica da TSC - R_1 à R_4= H, Alquil e aril



(12) CI_{50} = 0,18 ± 0,02 µM (HCT116) **(13) CI_{50} = 2,33 ± 0,43 µM (MCF-7)**

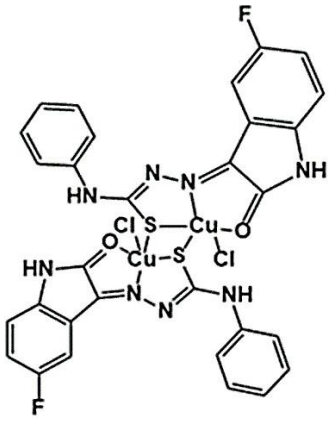
As tiossemicarbazonas possuem um extenso conjunto de ligantes N^- e S^- doadores, que provaram a sua importância na química de coordenação. Estes ligantes se tornaram atrativos devido à grande versatilidade, que é demonstrada pela capacidade de existir como duas formas (tiona-tiol) e pela capacidade de se ligar a íons metálicos na forma aniônica ou neutra. A versatilidade dentro da química de coordenação com TSC tem sido dada, pincipalmente, à presença de base de *Schiff* e também à capacidade de se realizar ligação de hidrogênio.[73] As TSC como ligantes têm sido exploradas devido à sua ação inibitória sobre a enzima DNA ribonucleotideo difosfato redutase.[74] Um atributo interessante da tiossemicarbazona é que no estado sólido, ela predomina na forma de tiona, enquanto em um estado de solução, exibem um tautomerismo tiona-tiol. A forma tiol predomina no estado de solução, e a desprotonação do enxofre torna a tiossemicarbazona um ligante aniônico, que pode efetivamente se coordenar com o átomo de metal.[73]

Quanto à ação da TSC sobre a TOPIIα, o efeito observado é intracelular e se espera que ela se ligue a essa enzima, que é essencial para manutenção do DNA, diminuindo assim sua ação e consequentemente impedindo a divisão celular.[75] O uso de complexos de cobre (II) tendo as subunidades tiossemicarbazona e isatina como ligantes podem adotar geometria quadrática plana e possuírem ligantes doadores tridentados, através dos átomos de oxigênio, de nitrogênio e de enxofre.[76] Ali Qasem e colaboradores verificaram, por exemplo, que complexos de cobre (II) com tiossemicarbazona podem produzir espécies reativas de oxigênio e agir contra a TOPIIα (CI_{50}= 0,08 – 8,6 μM em HCT11). [75,77]

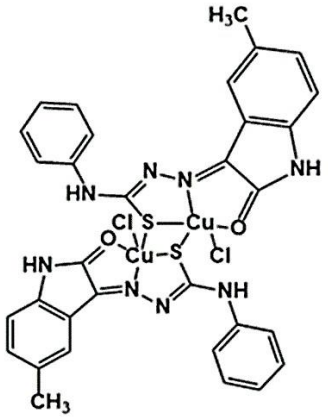
1.7) Complexos de cobre (II) com derivados de isatina e tiossemicarbazona (14-15)

Complexos de cobre (II), derivados de isatina e tiosiossemicarbazona (**Figura 21**), foram sintetizados por Ali A. Q. *et al* e demonstraram atividades antitumoral *in vitro*, ligação ao DNA e clivagem.[77]

Figura 21: Estruturas dos complexos de cobre **(14)** e **(15)** sintetizados por Ali A. Q. *et al*. [77]



(14) CI_{50} = 0,08 µM (HCT116)



(15) CI_{50} = 3,1 µM (HCT116)

Os ligantes de isatina-tiossemicarbazona são descritos como doadores k^2N,S- ou k^3O,N,S-, ou seja, podendo atuar como ligantes bidentados ou tridentados.[78] A isatina-*β*-tiossemicarbazona tem sido reconhecida como sendo mais potente para promover a morte celular por super expressão de células da glicoproteína-P, esta é transportadora-chave nas células tumorais resistentes a múltiplos fármacos (MDR).[79]

2) Objetivos e Justificativa

2.1) Objetivos gerais:

Realizar a construção de um modelo computacional da topoisomerase IIα validado para triagem dos 180 novos candidatos à inibidores, com posterior síntese de um dos melhores complexos de cobre (II) planejados em quantidade e grau de pureza adequados.

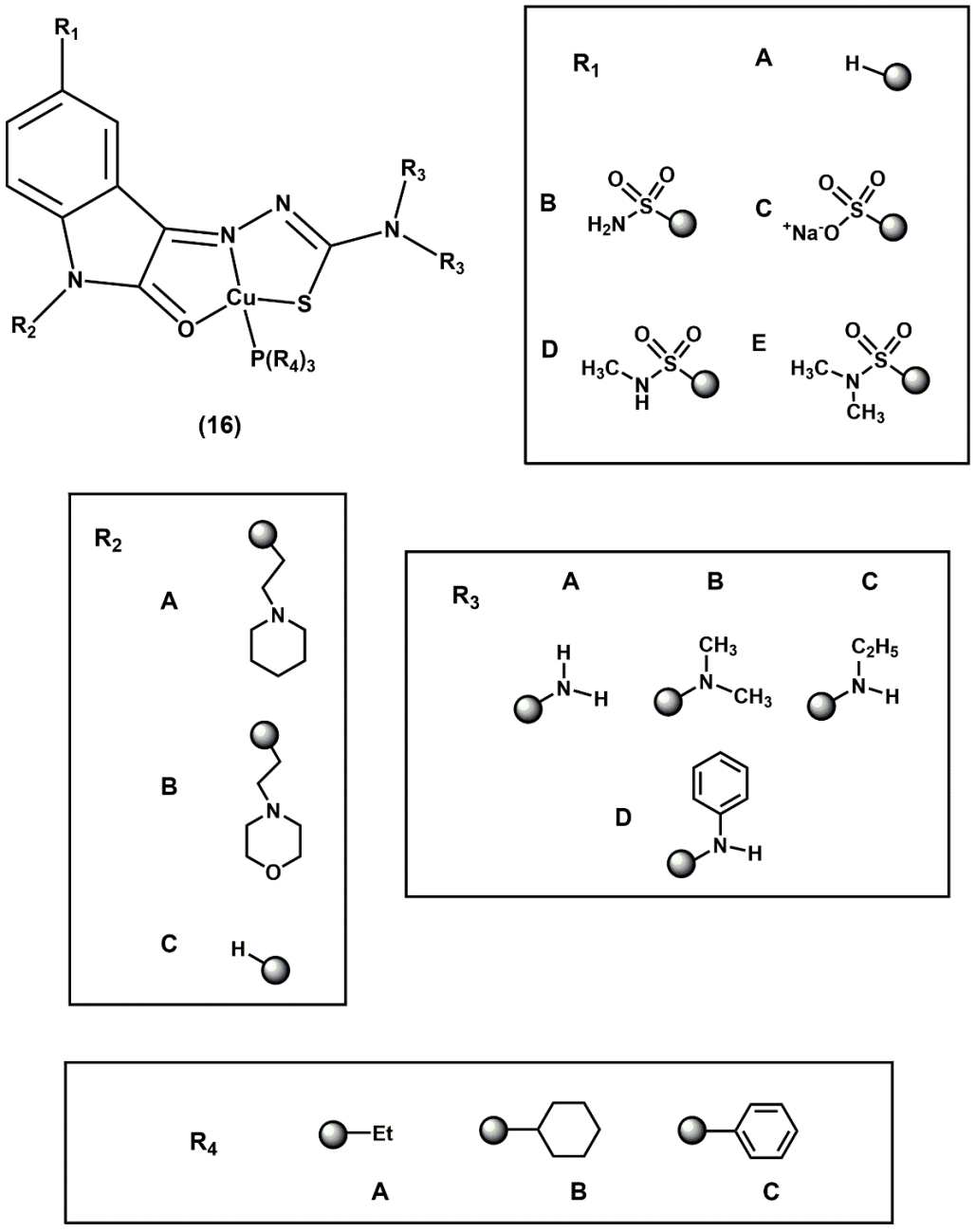
2.2) Objetivos específicos:

O presente projeto visa trazer para a química medicinal estudos in sílico de novas estruturas na enzima topoisomerase IIα humana, assim como para compostos descritos na literatura com atividade in vitro. Para isso, complexos de cobre (II)-isatina-TSC, inéditos, foram planejados, visando inibição dual, nos sítios do etoposídeo e do ATP da enzima. Partindo-se dos resultados obtidos na metodologia computacional, dará inicio a metodologia sintética e caracterizações. Assim, pretende-se contribuir para o estudo da topoismerase IIα humana como alvo para agente anticancer e agregar conhecimento à química inorgânica medicinal.

3) Planejamento estrutural

3.1) Os substituintes de (16) planejados para a síntese (17-193):

Figura 22: Planejamento estrutural dos complexos de cobre (II) com a estrutura genérica **(16)**.

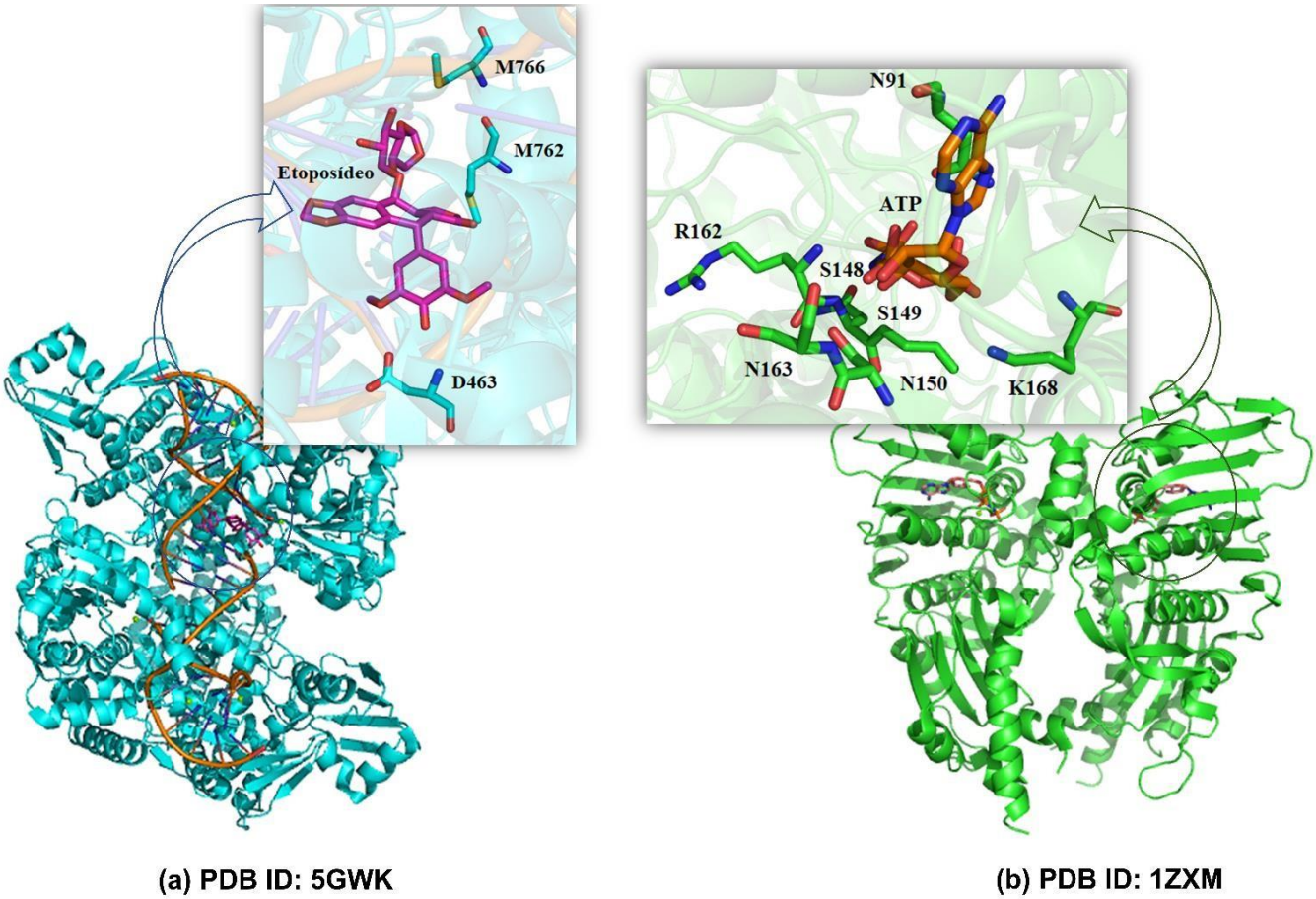


Sendo assim, afim de analisar fatores estereoeletrônicos e de solubilidade, planejou-se substituintes do tipo *N*-heterocíclicos, como a morfolina e piperidina; do tipo arila e alquila; como trifenilfosfina, trietilfosfina, triciclohexilfosfina; e do tipo sulfonas, como os sulfonato de sódio e as sulfonamidas. Os substituintes **R_1 (A-E)** e **R_2 (A-C)** são pertencentes à subunidade proveniente da isatina. Os substituintes **R_3 (A-D)** são pertencentes à tiossemicarbazona. O substituinte **R_4 (A-C)** é pertencente à fosfina. A escolha das fosfinas foi feita para garantir a estabilidade dos complexos devido ao efeito de retrodoação, sendo, as fosfinas caracterizadas por estabilizarem metais em baixo estado de oxidação.[49] Isso ocorre porque ela possui orbitais livres e pares eletrônicos isolados, de forma que os orbitais livres da fosfina podem aceitar elétrons dos orbitais metálicos e formar um tipo de ligação π que suplementa a ligação σ oriunda dos pares eletrônicos isolados do fósforo.[37] A escolha da trifenilfosfina como ligante também se baseou na sua capacidade de aumentar a lipofilicidade dos complexos, devido sua capacidade de ocupar bolsões hidrofóbicos nos sítios de várias enzimas.[80] Sendo assim, foram planejadas 180 substâncias **Anexo 1 (17-193)** com a combinação dos substituintes de **R_1** à **R_4** e de **A-E.**

3.2) Metodologia computacional

Como metodologia computacional escolheu-se a ancoragem molecular (docking), uma das ferramentas computacionais mais usadas na descoberta de fármacos.[81] Dessa forma, foram planejadas 180 substâncias, de modo a explorarmos diversas variações estereoeletrônicas e como estas podem resultar em interações relevantes com a TOPIIα. A ancoragem molecular, a partir das estruturas cristalográficas da topoisomerase IIα, uma delas co-cristalizada com o DNA e o etoposídeo **(1)** (PDB ID: 5GWK, com resolução de 3,152 Å, **Figura 23 (a)**) e a outra co-cristalizada com o ATP (PDB ID: 1ZXM, com resolução de 1,87 Å, **Figura 23 (b)**), foi empregada para a triagem dos 180 complexos. As estruturas cristalográficas supracitadas foram obtidas do sítio do *Protein Data Bank*.[19]

Figura 23: Estrutura cristalográfica da TOPIIα: **(a)** co-cristalizada com o DNA e etoposídeo **(1)** (PDB ID: 5GWK) e **(b)** co-cristalizada com o ATP (PDB ID: 1ZXM).



Foi realizado o tratamento das estruturas cristalográficas obtidas com o programa Swiss-PDB viewer, para completar os resíduos de aminoácidos faltantes. O gráfico de Ramachandran foi usado para verificar os ângulos diédricos phi (φ) e psi (ψ) em ambas as estruturas, sendo possível identificar os resíduos que se encontram nas regiões energicamente permitidas e não permitidas e orientando a avaliação da qualidade das estruturas cristalográficas, obtidas experimentalmente.[82] Pela análise do gráfico de Ramachandran, o modelo da enzima TOPIIα co-cristalizada com DNA e o etoposídeo (PDB ID: 5GWK) apresentou 89,7% dos resíduos nas regiões favoráveis, 10,1% nas regiões permitidas, 0,2% nas regiões adicionalmente permitidas e 0,1% em regiões desfavoráveis (**Anexo 2A**). De forma análoga, foi analizado o gráfico de Ramachandran para o domínio ATPase da Topo IIα humana, ligada ao AMP-PNP (PDB ID: 1ZXM). Foi observado que 87,6% dos resíduos estão nas regiões favoráveis,

12,1% nas regiões permitidas, 0,3% nas regiões adicionalmente permitidas e 0,0% em regiões desfavoráveis (**Anexo 2B**).

Foram retiradas da literatura 121 substâncias com estereoquímica bem definida e com inibição no sitio do etoposídeo **(1)** (**Anexo 3**) e 103 substâncias com inibição no sitio do ATP (**Anexo 4**). As estruturas foram escolhidas de acordo com a seguinte faixa de inibição, obtidas através do ensaio de viabilidade celular MTT e foram classificadas de acordo com a **Tabela 2**, sendo classificadas como: “muito ativas”, “ativas” ou “inativas”.

Tabela 2: Faixa de inibição (CI_{50}) das estruturas retiradas da literatura

Classificação	**Faixa (CI_{50})**
Muito ativas	< 100 nM
Ativas	100 nM ≤ IC_{50} ≤10 μM
Inativas	> 10 μM

Sendo assim, totalizou-se no projeto 404 estruturas (180+121+103), que foram construídas e inspecionadas visualmente no programa *ChemDraw v15.1* e no *Discovery Studio Visualizer v17.2* (DSV). No *MarvinSketch v6.3* os estados de protonação em pH fisiológico (pH = 7,4) foram analisados, de modo a selecionar as microespécies majoritárias. Na sequência, foi utilizado o programa *Discovery Studio Visualize v17.2,* a fim de otimizar, por mecânica molecular (MMFF), os ligantes de interesse com o comando “Clean Geometry”. Posteriormente, as estruturas dos complexos foram otimizadas, de forma complementar, por meio do programa *Gabedit v2.5*, para que fosse mantida a geometria quadrática plana no centro metálico. Por fim, o programa MOPAC2016 foi utilizado para a realização do cálculo semiempírico MP7, utilizando a interface gráfica do programa Mercury CSD. .

Na etapa de ancoragem molecular, foi utilizado o programa *GOLDSuite v.5.6*, sendo necessária a escolha de uma função de pontuação, usada para classificar as soluções encontradas através do uso de um algoritmo genético. O *GOLDSuite* apresenta quatro funções de pontuação pré-definidas: ChemPLP (Piecewise Linear Potential), ChemScore, ASP (Astex Statistical Potential) e GoldScore. Para a escolha da melhor função, foi feita a redocagem como etapa de validação, de modo a selecionar a função de pontuação mais adequada para a predição da orientação dos

ligantes co-cristalizados, assim como as interações com os resíduos de aminoácidos chave.

4. Resultados obtidos in silico

4.1) Redocagem nos dois sítios ativos da TOP2α

Foi realizada a redocagem como método de validação, para os ligantes co-cristalizados com a topoisomerase IIα (VP-16 e ANP), com a finalidade de avaliar a capacidade preditiva do modelo in silico em relação à orientação espacial do ligante (RMSD, *Root Mean Square Deviation*), assim como as interações com resíduos de aminoácidos relevantes para a atividade. Ao carregar as proteínas com PDB ID 5GWK e 1ZXM, escolheu-se a ancoragem molecular em modo rígido e o programa *GOLD* foi utilizado para a adição dos átomos de hidrogênio a ambas as estruturas. Em ambos os casos, extraiu-se o ligante co-cristalizado, o qual foi utilizado como ligante de referência (F_1 para o VP-16 e A para o ANP); e definido o raio como 10 Á com base no ligante co-cristalizado para restringir o espaço amostral em ambos os sítios. Assim, foi feita a validação da metodologia realizando a redocagem da molécula do etoposídeo, retirada da estrutura cristalográfica com PDB ID: 5GWK e em seguida, fez-se a redocagem com a molécula do ANP, retirada da estrutura cristalográfica com PDB ID: 1ZXM.

A função de pontuação que reproduz melhor a orientação do ligante exibirá os menores valores de RMSD, para ambos, e mostrará apenas uma pequena diferença nos valores de RMSD, para a mesma função. Entretanto, estes dados devem ser correlacionados com os resíduos envolvidos nas interações com o ligante na estrutura cristalográfica. Na **Tabela 3** é possível observar os valores obtidos para a redocagem do etoposídeo **(1)**. Nela está apresentado para cada função de pontuação selecionada: o valor com o menor RMSD (ex.: ChemPLP-RMSD) e o valor da função de maior pontuação (ex.: ChemPLP-Score).

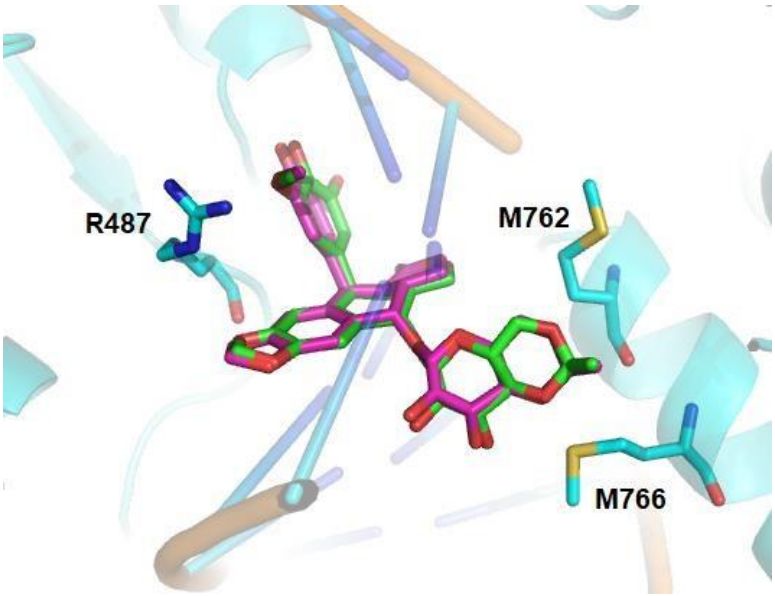
Tabela 3: Valores obtidos, por redocagem, para cada função de pontuação (PDB ID: 5GWK).

Função de pontuação	***RMSD em A***	***Score***
ChemPLP-RMSD*	**0,3841**	**102,9937**
ChemPLP-Score*	**0,4533**	**104,7668**
ASP- RMSD	0,3390	52,5918
ASP- Score	2,3431	56,9994
ChemScore-RMSD	0,7170	18,0850
ChemScore- Score	9,7232	22,1202
GoldScore-RMSD	0,3089	94,0506
GoldScore- Score	0,5595	98,1179

***Função com o menor valor de RMSD.
****Função com o maior valor de pontuação.

Sendo assim, escolheu-se a menor diferença de RMSD, entre: a função de maior pontuação e a de menor valor de RMSD. Nesse sentido, a ChemPLP foi escolhida por apresentar o menor valor de RMSD e o maior valor de pontuação para a TOPO IIα co-cristalizada com o etoposídeo **(1)** (PDB ID: 5GWK). Além disso, foi observado no sítio ativo a presença do aminoácido histidina (HIS759A), o qual está envolvido na atividade enzimática.[83] Sendo assim, foi realizada o redocagem com os dois possíveis tautômeros deste resíduo, sendo que o primeiro estado de protonação (ND1) capaz de fornecer o menor valor de RMSD. Na **Figura 24** é possível observar a pose obtida por meio da redocagem, com os átomos de carbono destacados em rosa. Já o ligante com os átomos de carbono em verde, se referem ao ligante de referência. Observou-se que a porção central policíclica intercala entre os pares de bases nitrogenadas do DNA, como com a guanina 1481 (DG1481) e adenina 1480 (DA1480), por interações do tipo empilhamento-π; enquanto a subunidade 1,2,3-trimetoxi-5-metilbenzeno interage por meio de ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido arginina 487 (R487) e a porção glicosídica interage com resíduos circundantes importantes para a atividade catalítica, são eles a metionina 766 (M766) e a metionina 762 (M762).[84]

Figura 24: Redocagem, para a TOPIIα co-cristalizada com o etoposídeo **(1)** e com o DNA.



Em seguida, de forma similar, foi realizada a redocagem para a topoisomerase IIα co-cristalizada com o ANP (PDB ID: 1ZXM). Na **Tabela 4** é possível observar os valores obtidos, por redocagem, do ANP.

Tabela 4: Valores obtidos, por redocagem, para cada função de pontuação (PDB ID: 1ZXM).

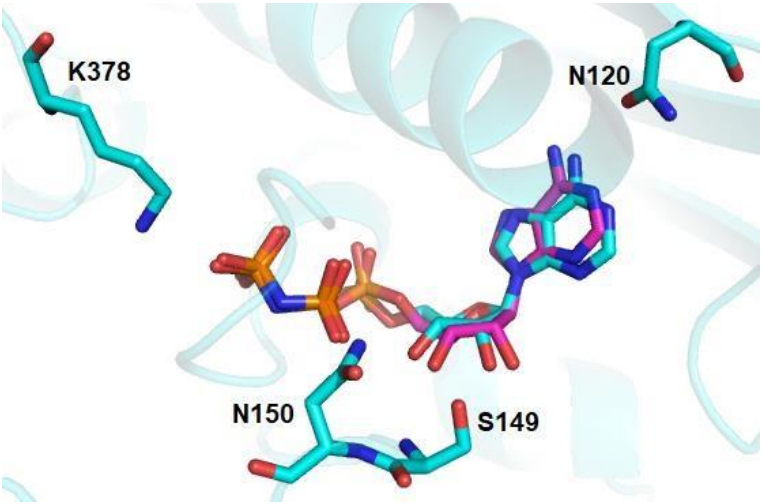
Função (RMSD e score)	***RMSD em A***	***Score***
ChemPLP-RMSD*	**0,3310**	**123,8503**
ChemPLP-Score*	**0,6383**	**133,4822**
ASP- RMSD	0,4147	70,6289
ASP- Score	0,7308	74,3185
ChemScore-RMSD	0,4302	35,7881
ChemScore- Score	0,6019	43,0797
GoldScore-RMSD	0,4900	113,1099
GoldScore- Score	0,8247	122,4283

***Função com o menor valor de RMSD.
****Função com o maior valor de pontuação.

Para a pose do ligante ANP, obtida por redocagem, no sítio ativo da TOPIIα, foi escolhida a função ChemPLP, pois esta apresentou o menor valor de RMSD e o maior valor de pontuação. Na **Figura 25**, os átomos de carbono do ligante redocado estão em rosa, enquanto que os átomos de carbono do ligante de referência (co-cristalizado)

estão em azul. Foi possível observar que a pose do ligante, obtido por redocagem, consegue reproduzir interações com os resíduos de aminoácidos no sitio ativo, que são importantes para a atividade, são eles ligação de hidrogênio clássica através do grupamento fosfato pertencente ao ANP com a função amina do resíduo de lisina 378 (K378), com a função hidroxila do resíduo de serina 149 (S149) e com o resíduo da asparagina 150 (N150). O anel de adenina pertencente ao ANP é estabilizado por meio de ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da cadeia lateral da asparagina 120 (N120).[85]

Figura 25: Redocagem para a toposiomerase IIα co-cristalizada com o ANP.



Após a identificação da função de pontuação ChemPLP, como a melhor para ambos os sítios, realizou-se a ancoragem molecular para as 180 substâncias planejadas.

4.2) Ancoragem molecular dos 180 complexos de cobre (II) planejados

Para a ancoragem na estrutura PDB ID: 5GWK, foi definido o mesmo sítio de ligação utilizado na redocagem (F_1) e definido o raio como 10 Å com base no ligante co-cristalizado, o etoposídeo, para restringir o espaço amostral. Na escolha dos possíveis tautômeros da histidina, a ancoragem foi realizada com o que apresentou menor RMSD, ou seja, com ND1. Paralelamente, para a ancoragem na estrutura PDB ID: 1ZXM, foi definido o mesmo sítio de ligação utilizado na redocagem (A) e definido

o raio como 10 Á com base no ligante co-cristalizado, o ANP, para restringir o espaço amostral.

Após a ancoragem molecular, foi realizada a análise criteriosa da orientação das moléculas construídas (no sítio ativo do receptor) e análise sistemática dos resíduos de aminoácidos com os quais estas moléculas interagem nas simulações computacionais. Para as análises das interações com os resíduos de aminoácidos foram utilizados os programas *PyMol* e o *Discovery Studio*.

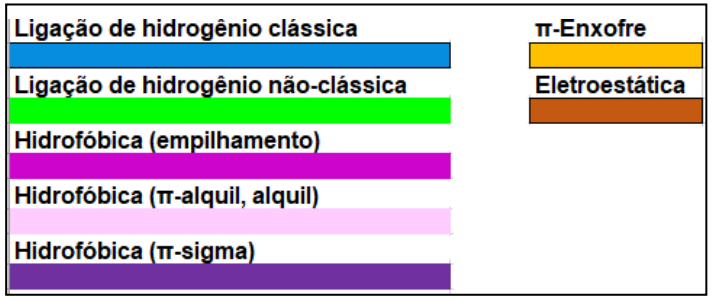
4.2.1) Resultados para a topoisomerase IIα co-cristalizada com o etoposídeo (1) e com DNA

Foram realizadas as análises das interações com os resíduos de aminoácidos e bases do DNA através do ranqueamento dos valores de pontuação gerados por meio da ancoragem molecular. Após o ranqueamento, foram obtidos os 40 melhores resultados com base nos valores de pontuação gerados pela função ChemPLP. Para os 40 melhores complexos foram analisadas as interações com os resíduos do sitio ativo (**Anexo 5**). Em seguida, foram escolhidos os 10 melhores complexos que obtiveram maior número de interações com os resíduos do sitio ativo e com as bases do DNA, assim como os que apresentaram maiores valores de pontuação na função escolhida. Para estes, foi realizada a análise criteriosa das interações que estão representadas na **Tabela 5**.

Tabela 5: 10 melhores complexos com base na análise das interações em PDB ID: 5GWK.

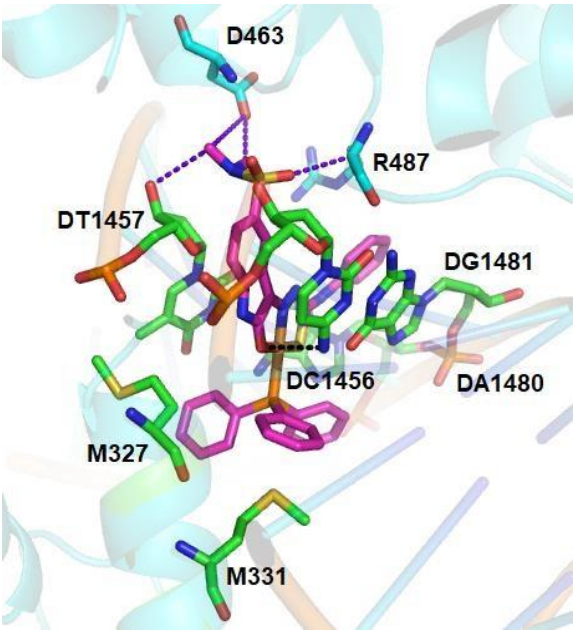
Ligante	CHEMPLP	Nº de interações	A-D463	A-M762		M766	A-R487			D-T1457			D-G1481				D-G1458	D-C1456			
5gwk F_1																					
'1E_2C_3D_4C'	116.61	8																			
'1D_2C_3D_4C'	114.07	7																			
'1B_2B_3D_4A'	110.66	7																			
'1D_2A_3D_4C'	121.07	6																			
'1C_2A_3D_4C'	117.35	6																			
'1B_2B_3D_4C'	116.66	6																			
'1A_2A_3D_4C'	116.31	6																			
'1D_2B_3D_4C'	115.43	6																			
'1A_2B_3D_4C'	115.92	5																			
'1B_2A_3D_4A'	110.24	5																			

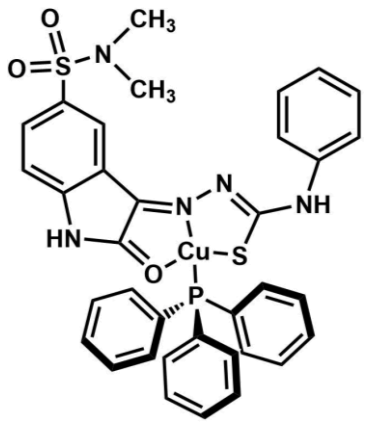
Ligante	CHEMPLP	Nº de interações	D-A1480			E461	G462	D-G1455		G488	A-S328		A-Y805	
5gwk F_1														
'1E_2C_3D_4C'	116.61	8												
'1D_2C_3D_4C'	114.07	7												
'1B_2B_3D_4A'	110.66	7												
'1D_2A_3D_4C'	121.07	6												
'1C_2A_3D_4C'	117.35	6												
'1B_2B_3D_4C'	116.66	6												
'1A_2A_3D_4C'	116.31	6												
'1D_2B_3D_4C'	115.43	6												
'1A_2B_3D_4C'	115.92	5												
'1B_2A_3D_4A'	110.24	5												



Estão representadas, a seguir, as figuras para os 10 melhores complexos planejados, ou seja, os que apresentaram o maior número de interações com os resíduos do sítio ativo e com as bases de DNA. São considerados resíduos importantes para a atividade catalítica: tirosina 805 (Y805), metionina 766 (M766) e a metionina 762 (M762).[83,84]

Figura 26: Interações entre o complexo 1_1E_2C_3D_4C **(64)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





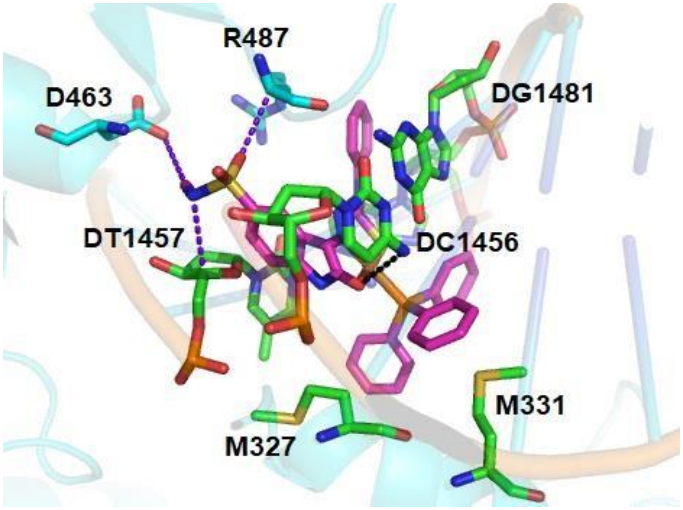
1_1E_2C_3D_4C

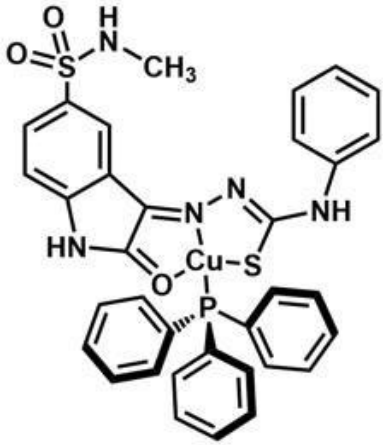
(64)

Observou-se interação de hidrogênio clássica através do átomo da função carbonila na isatina com a base pirimídicas citosina 1456. Ocorre também interação de hidrogênio não clássica através da função amida pertencente à sulfonamida com a hidroxila do resíduo de aspartato 463. Da mesma forma ocorre com a base pirimídica timina 1457. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função amina substituída na tiossemicarbazona para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da base purínica adenina 1480. O anel aromático da trifenilfosfina presente no complexo, faz interação eletroestática do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação hidrofóbica eletroestática do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico do derivado de isatina com a base pirimídica da citosina 1456, assim como ocorre com a base timina 1457. Ocorre também este tipo de interação através do anel aromático substituído na tiossemicarbazona com a base purínica da guanina 1481. Ocorre interação

hidrofóbica do tipo π-alquila através da amina substituída com o anel aromático na tiossemicarbazona com o resíduo de arginina 52. Ocorre também através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do resíduo de metionina 327.

Figura 27: Interações entre o complexo 2_1D_2C_3D_4C **(57)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





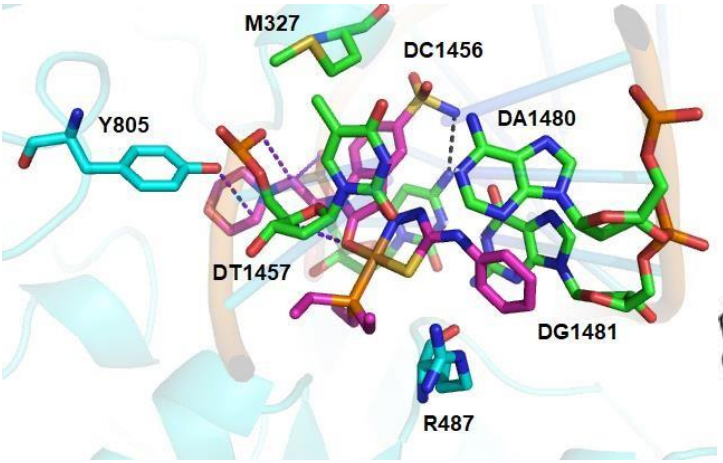
2_1D_2C_3D_4C

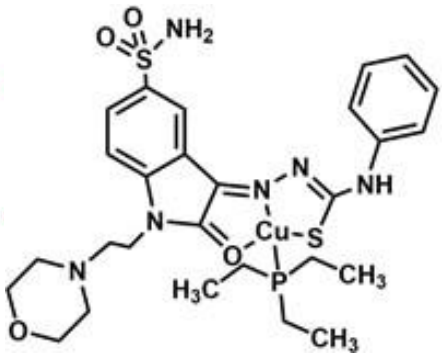
(57)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função amina pertencente à tiossemicarbazona com o grupamento carbonila do resíduo de aspartato 463. A carbonila da sulfonamida no composto faz interação de hidrogênio não clássica com o resíduo de arginina 487. Da mesma forma ocorre através da função amida presente na sulfonamida substituída com a base pirimídica timina 1457. Ocorre também interação de hidrogênio clássica através da função carbonila presente no derivado de isatina com hidrogênio pertencente à base pirimídica da citosina 1456. Ocorre interação de hidrogênio não clássica oriunda da função amina substituída na tiossemicarbazona para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da base purínica adenina 1480. O anel aromático da trifenilfosfina faz interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivado da isatina com a base pirimídica da timina 1457 e citosina 1456. Ocorre também, através do anel aromático da amina substituída na tiossemicarbazona com a base purínica guanina 1481. O anel aromático da trifenilfosfina faz interação do tipo empilhamento-T com a base purínica

da adenina 1480. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático substituído na amina com o grupo alquila do resíduo de arginina 52, e através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do resíduo de metionina 327.

Figura 28: Interações entre o complexo 3_1B_2B_3D_4A **(115)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.



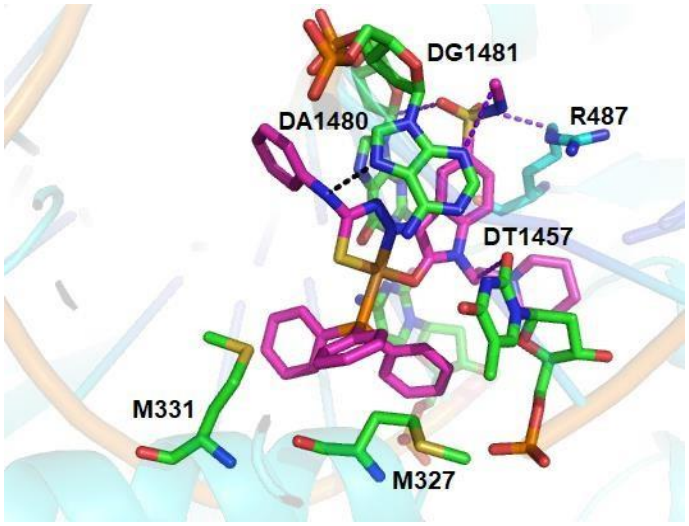


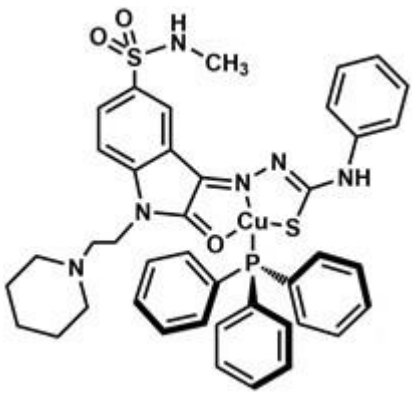
3_1B_2B_3D_4A

(115)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do substituinte morfolina com resíduo da tirosina 805. Através do grupo amida pertence à sulfonamida, ocorre interação de hidrogênio clássica com a base pirimídica da citosina 1456. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo alquila no complexo com o átomo de oxigênio do grupo fosfato da base pirimídica timina 1457. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo amina do resíduo de aspartato 487 com os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático do grupo amina substituída. O enxofre oriundo da tiossemicarbazona, faz interação do tipo π-enxofre com a base pirimídica da timina 1457, assim como o enxofre presente na sulfonamida faz com a base pirimídica da citosina 1456. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático da amina substituída no complexo com a base purínica da guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do grupo C-C da trietilfosfina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52, interação hidrofóbica do tipo π-alquila através da morfolina com o grupo alquila do resíduo da tirosina 805 e através do anel aromático substituído na amina com o grupo alquila do resíduo de arginina 52 e da metionina 327.

Figura 29: Interações entre o complexo 4_1D_2A_3D_4C **(160)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.



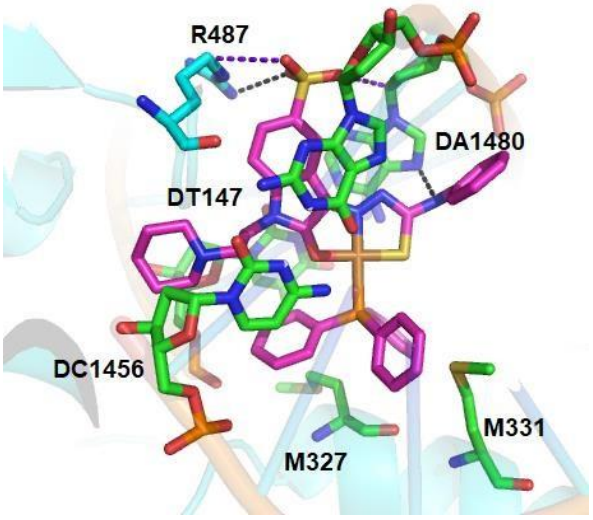


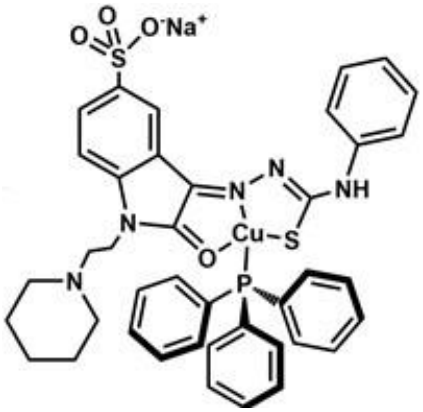
4_1D_2A_3D_4C

(160)

Ocorre interação de hidrogênio através da função carbonila na sulfonamida com o resíduo de arginina 487. Ocorre interação de hidrogênio não clássica do grupoalquila com a carbonila da base pirimídica timina 1457. Ocorre também interação de hidrogênio com átomo de nitrogênio base purínica adenina 1480. O anel aromático da trifenilfonina presente no complexo, faz interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331.Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivada de isatina com a base purínica da adenina 1480 e guanina 1481, assim como com a base pirimídica da timina 1457. O anel aromático da trifenilfosfina faz interação do tipo empilhamento-T com a bases purínicas da adenina 1454 e guanina 1455. Ocorre também com as bases pirimídicas da citosina 1456 e timina 1457. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico derivado da isatina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52. Ocorre também através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo C-C do resíduo de metionina 327.

Figura 30: Interações entre o complexo 5_1C_2A_3D_4C **(135)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





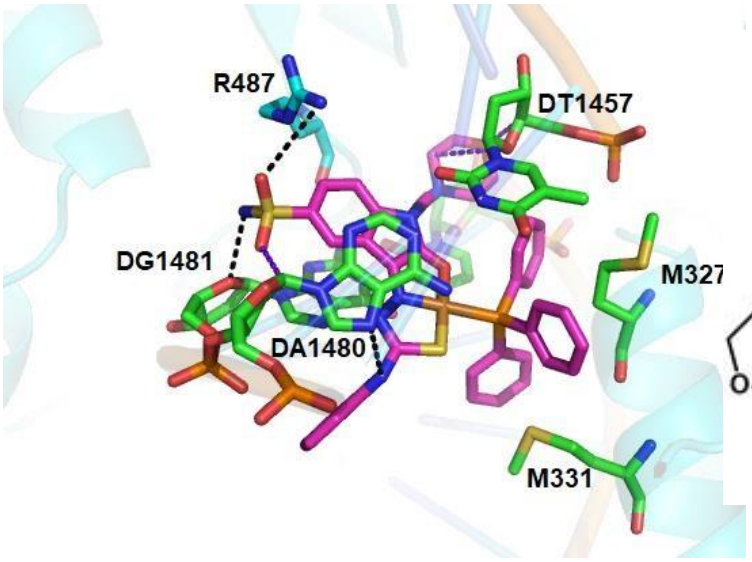
5_1C_2A_3D_4C

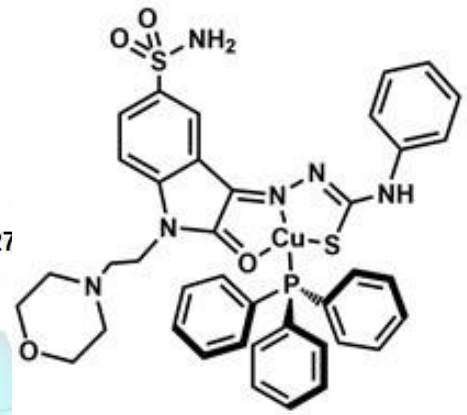
(135)

Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função carbonila na sulfonamida com o resíduo de arginina 487. Ocorre interação de hidrogênio não clássica oriunda do átomo de hidrogênio pertence a função amina da base pirimídica citosina 1456 para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina. O átomo de hidrogênio do grupo amina substituído na TSC faz interação de hidrogênio clássica com o nitrogênio da base purínica adenina 1480, assim como com a carbonila pertencente a sulfonamida. Ocorre interação eletroestática através da função carbonila da sulfonamida com o resíduo de arginina 52. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através do anel aromático substituído na tiossemicarbazona com o grupo fosfato pertencente a base purínica guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através do anel aromático da trifelifosfina para o resíduo de metionina 327. O anel aromático da trifenilfonina presente no complexo, faz interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivado da isatina com a base purínica da adenina 1480 e guanina 1481, assim como com a base pirimídica da timina 1457.O anel aromático da trifenilfosfina faz interação do tipo empilhamento-T com a base purínica da adenina 1454 e guanina 1455. Ocorre também com as bases pirimídicas da citosina 1456 e timina 1457.Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico derivado da isatina

com o grupo C-C do resíduo de arginina 52. Ocorre também através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do resíduo de metionina 327.

Figura 31: Interações entre o complexo 6_1B_2B_3D_4C **(114)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.



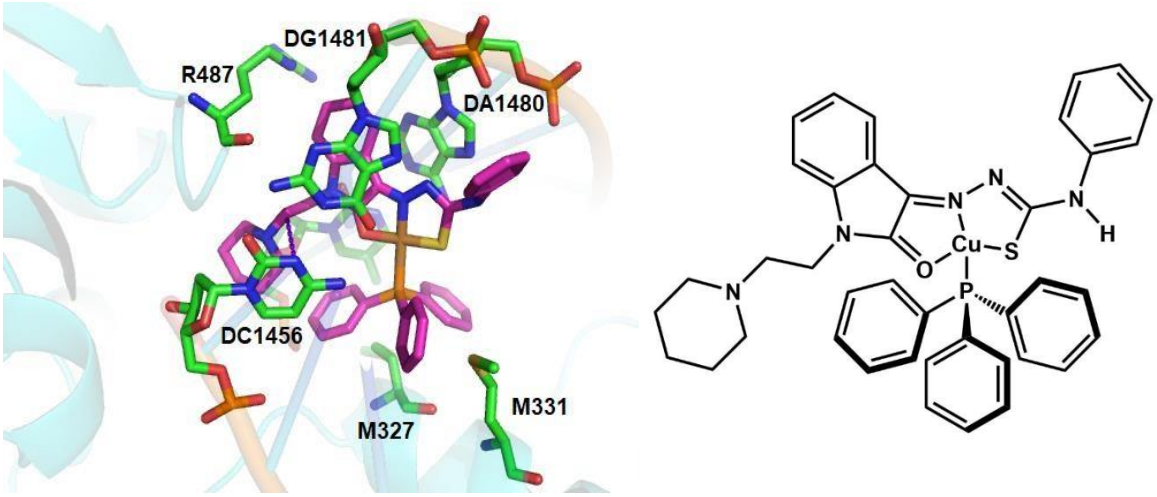


6_1B_2B_3D_4C
(114)

Ocorre interação de hidrogênio clássica através do átomo de oxigênio da porção da sulfona presente sulfonamida com o resíduo de arginina 487 e através da morfolina com a base pirimídica timina 1457. A função amina substituída na tiossemicarbazona faz interação de hidrogênio clássica com a carbonila da pentose da base purínica guanina 1481. Ocorre interação de hidrogênio não clássica oriunda do átomo de hidrogênio pertence a função amina da base pirimídica citosina 1456 para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através da amina substituída na TSC com o anel aromático com o grupo fosfato pertencente a base purínica guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através do anel aromático da trifelifosfina para o resíduo de metionina 327. O anel aromático da trifenilfonina presente no complexo, faz interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivado da isatina com a base purínica da adenina 1480 e guanina 1481, assim como com a base pirimídica da timina 1457. O anel aromático da trifenilfosfina

realiza interação do tipo empilhamento-T com a base purínica da guanina 1455. Ocorre também com a base pirimídica da timina 1457.

Figura 32: Interações entre o complexo 7_1A_2A_3D_4C **(89)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.

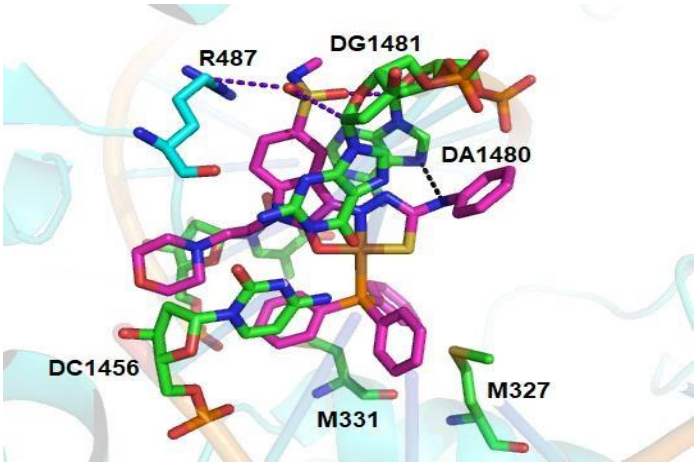


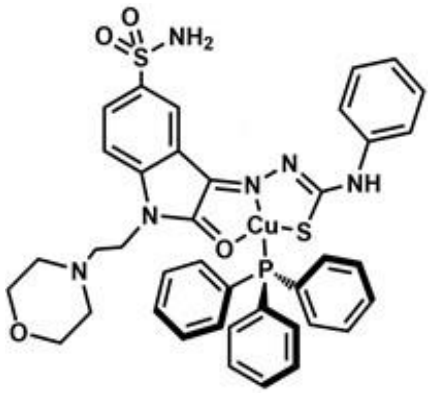
7_1A_2A_3D_4C

(89)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função amina da base pirimídica citosina 1456 para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-πatravés da amina substituída na tiossemicarbazona com o grupo fosfato pertence a base purínica guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através doanel aromático da trifelifosfina para o resíduo de metionina 327. O anel aromático da trifenilfosfina realiza interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivado da isatina com a base purínica da adenina 1480 e guanina 1481, assim como com a base pirimídica da timina 1457. O anel aromático da trifenilfosfina faz interação do tipo empilhamento-T com a base purínica da guanina 1455 e da adenina 1454. Ocorre também com a base pirimídica da timina 1457.Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila a através do anel aromático indólico derivado da isatina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52, através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do resíduo de metionina 327. Ocorre também através do anel aromático presente na amina da TSC com a base pirimídica da citosina 1456.

Figura 33: Interações entre o complexo 8_1D_2B_3D_4C **(166)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





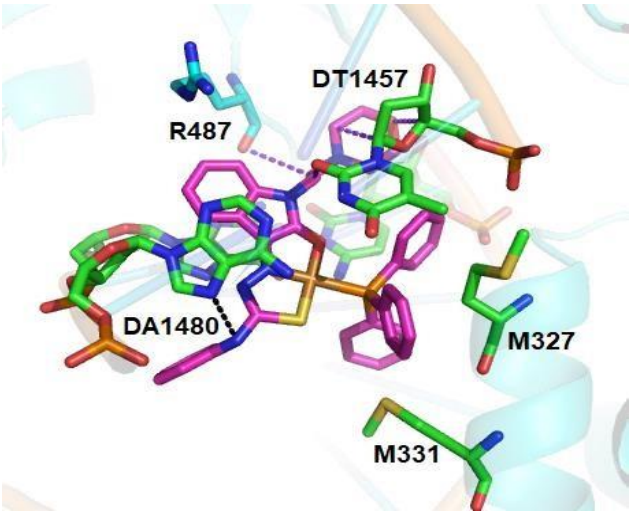
8_1D_2B_3D_4C

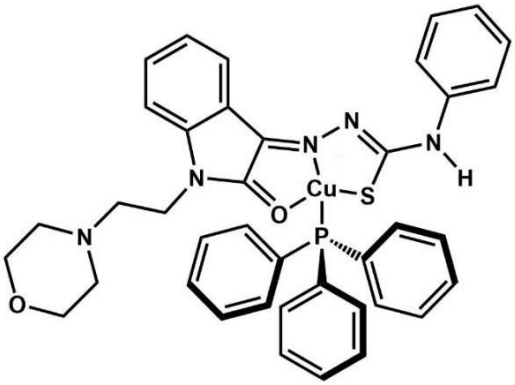
(166)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função carbonila da sulfonamida com o resíduo de arginina 487. O átomo de oxigênio na porção morfolina faz interação de hidrogênio não clássica com a base pirimídica timina 1457. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila da sulfonamida do complexo com a base purínica guanina 1481. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função amina da base pirimídica citosina 1456 para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina. Ocorre interação de hidrogênio clássica com a base purínica adenina 1480 e a função amina pertencente a tiossemicarbazona. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através da amina substituída com o anel aromático com o grupo fosfato pertence a base purínica guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através do anel aromático da trifenlifosfina para o resíduo de metionina 327. O anel aromático da trifenilfosfina realiza interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático do derivado de isatina com a base purínica da adenina 1480 e guanina 1481, assim como com a base pirimídica da timina 1457. O anel aromático da trifenilfosfina realiza interação do tipo empilhamento-T com a base purínica da guanina 1455 e da adenina 1454. Ocorre também com as bases pirimídicas da timina 1457 e com a citosina 1456. Ocorre

interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico derivado da isatina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52, através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do resíduo de metionina 327. Ocorre também através da morfolina presente no complexo com a base pirimídica da citosina 1456.

Figura 34: Interações entre o complexo 9_1A_2B_3D_4C **(70)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





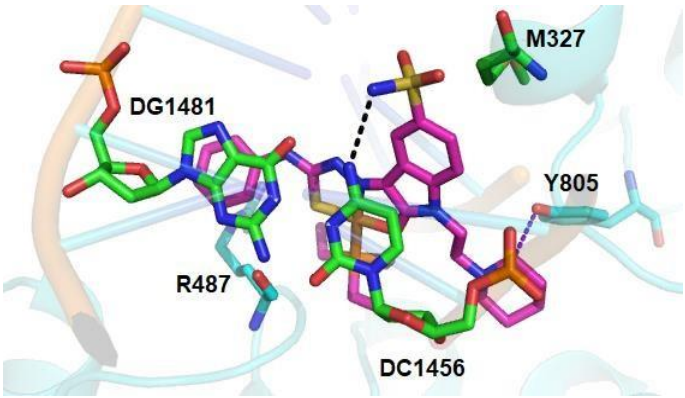
9_1A_2B_3D_4C

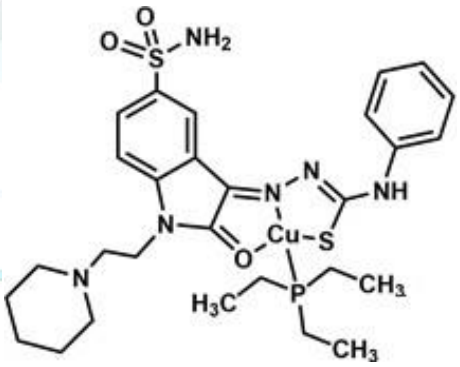
(70)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da porção morfolina com a função carbonila na base pirimídica timina 1457. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através função amina pertencente à base pirimídica citosina 1456 para os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina. Ocorre também interação de hidrogênio clássica com a base purínica adenina 1480. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através da amina substituída na tiossemicarbazona com o grupo fosfato pertence a base purínica guanina 1481. O anel aromático da trifenilfosfina realiza interação do tipo π-enxofre com o resíduo de metionina 331. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático indólico derivado da isatina com a base purínica adenina 1480 e guanina 1481, e com a base pirimídica timina 1457. Ocorre também, interação do tipo empilhamento-T através da trifenilfosfina com a base purínica guanina 1455 e adenina 1454, e com a base pirimídica da timina 1457. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico derivado da isatina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52, e através do anel aromático presente na trifenilfosfina com o grupo alquila do

resíduo de metionina 327. Ocorre também através da porção morfolina com a base pirimídica citosina 1456.

Figura 35: Interações entre o complexo 10_1B_2A_3D_4A **(103)** com os resíduos de aminoácidos e as bases do DNA. As interações de hidrogênio estão representadas.





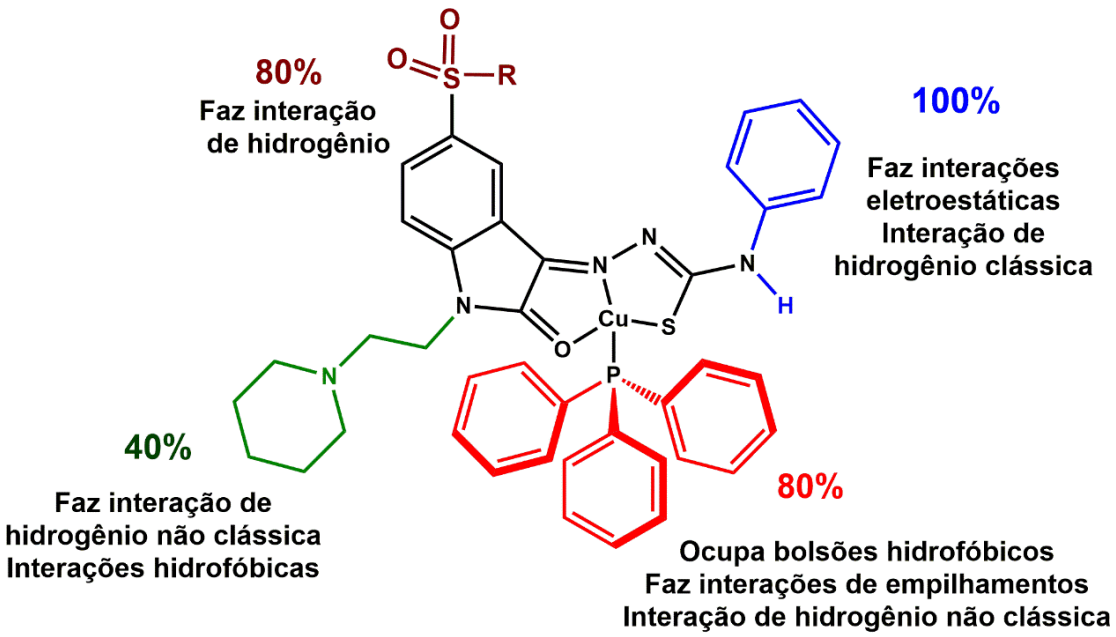
10_1B_2A_3D_4A

(103)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica com os orbitais π que acumulam concentrações de carga no anel aromático substituído na tiossemicarbazona com a função amina do resíduo de arginina 487. O grupamento da sulfonamida faz interação de hidrogênio clássica com a base pirimídica citosina 1456. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do substituinte piperidina com resíduo da tirosina 805. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático substituído na tiossemicarbazona com a base purínica da guanina 1481. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do grupo C-C da trietilfosfina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52, e ocorre também do tipo π-alquila através do anel aromático substituído na amina com o grupo C-C do resíduo de arginina 52 e através do anel aromático indólico derivado da isatina com o resíduo da metionina 327.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar subunidades estruturais que forneceram maior número de interações com os resíduos e bases do DNA no sítio ativo, sendo estas destacadas a seguir.

Figura 36: Padrão de substituintes **(194)** que demostraram maior número de interações.



(194)

Todos os dez complexos escolhidos por apresentarem maior número de interações com os resíduos do sítio ativo contêm como substituintes: 80% a trifenilfosfina (vermelho), 100% a amina substituída com anel aromático (azul), 40% a piperidina (verde) e 80% as sulfonas (marrom). Tal padrão seguido está relacionado com a presença do grupo doador e aceptor de ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletroestáticas do tipo de empilhamento-π e empilhamento-T que os anéis aromáticos realizam, interações do tipo π-enxofre e interações de hidrogênio não clássica do tipo *π···H-C* com os orbitais π que acumulam concentrações de carga nos anéis aromáticos e ainda, a presença do substituinte N-heterocíclico possibilitou interação hidrofóbica do tipo π-alquila . [86,87]

4.2.2) Resultados para a topoisomerase IIα co-cristalizada com o ANP

Mediante o ranqueamento dos valores de pontuação gerados na ancoragem molecular, foram realizadas as análises das interações com os resíduos de aminoácidos. Após o ranqueamento, obteve-se os 40 melhores resultados com base nos valores de pontuação gerados pela função ChemPLP. Para os 40 melhores complexos (**Anexo 6**) foram analisadas as interações com os resíduos do sítio ativo. Em seguida, foram escolhidos os 10 melhores complexos que obtiveram maiornúmero de interações com os resíduos do sítio ativo, assim como os que apresentaram maiores valores de pontuação na função escolhida. Para estes, foi realizada a análise criteriosa das interações que estão representadas na **Tabela 6**.

Tabela 6: 10 melhores complexos com base na análise das interações em PDB ID:1ZXM

			A-	A-	A-		A-	A-	A-	A-	A-					A-	A-						A-	A-	A-	A-
Ligante	ChemPLP	Nº de interações	N150	K168	N91		S148	S149	N95	I125	R98					Y379	Q97			K157				E155	P98	I378	V130
1ZXM																											
1A_2A_3D_4A	65.75	5																									
1E_2A_3C_4B	73.40	4																									
1D_2A_3D_4A	73.28	3																									
1A_2A_3C_4C	62.45	3																									
1B_2B_3D_4C	81.83	3																									
1E_2A_3D_4A	81.76	3																									
1D_2A_3A_4C	64.40	3																									
1E_2B_3C_4C	62.45	3																									
1B_2A_3A_4C	62.38	3																									
1E_2B_3D_4C	88.43	2																									

			A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-	A-
Ligante	ChemPLP	Nº de interações	A-K378			R162	N163	G164	Y165	G166	G166	A167	A167	N120	Q376	G161
1ZXM																
1A_2A_3D_4A	65.75	5														
1E_2A_3C_4B	73.40	4														
1D_2A_3D_4A	73.28	3														
1A_2A_3C_4C	62.45	3														
1B_2B_3D_4C	81.83	3														
1E_2A_3D_4A	81.76	3														
1D_2A_3A_4C	64.40	3														
1E_2B_3C_4C	62.45	3														
1B_2A_3A_4C	62.38	3														
1E_2B_3D_4C	88.43	2														

Ligação de hidrogênio clássica

Ligação de hidrogênio não-clássica

Hidrofóbica (empilhamento)

Hidrofóbica (π-alquil, alquil)

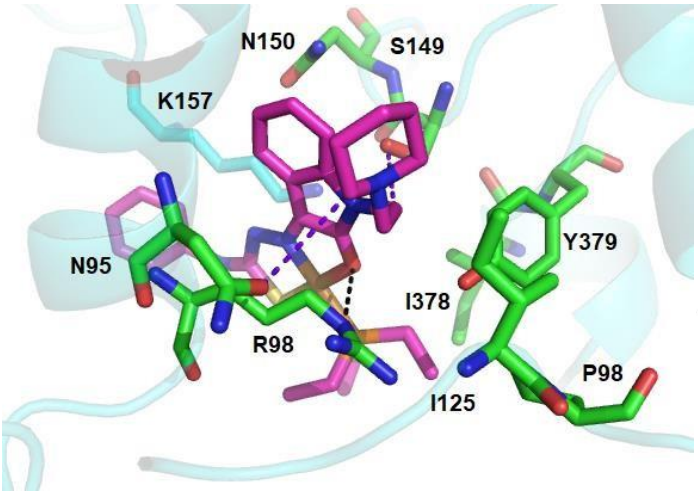
Hidrofóbica (π-sigma)

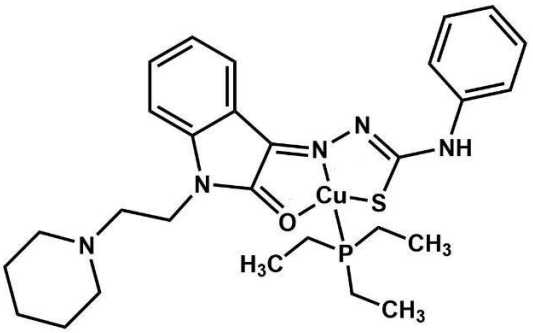
π-Enxofre

Eletroestática

Estão representadas a seguir as figuras com as estruturas dos 10 melhores complexos planejados, ou seja, os que apresentaram o maior número de interações com os resíduos do sítio ativo e com as bases de DNA. São considerados resíduos importantes para a atividade catalítica: são eles lisina 378 (K378) e asparagina 150 (N150).[85]

Figura 37: Interações entre o complexo 1_1A_2A_3D_4A **(68)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



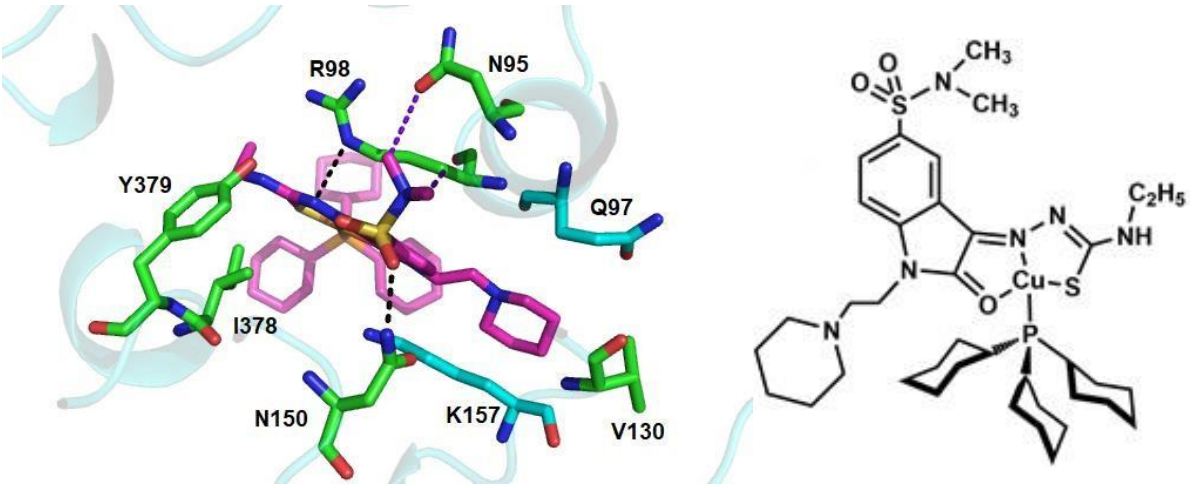


1_1A_2A_3D_4A

(68)

Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função cabonila pertencente à isatina com o grupo amina do resíduo de arginina 98. Ocorre interação de hidrogênio não clássica do tipo π-doador decorrente das concentrações de carga no anel aromático da isatina com a função amida presente no resíduo de asparagina 150. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da amina pertencente à isatina com o grupo hidroxila do resíduo da serina 149. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da piperidina com a carbonila do resíduo de asparagina 95. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, e ocorre também através do grupo alquila substituído na fosfina para o anel aromático pertencente à tirosina 379. Ocorre ainda do substituinte arila na amina para o resíduo da lisina 157. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte piperidina com o grupo alquila pertencente ao resíduo isoleucina 125, através do substituinte alquila da fosfina para o resíduo da prolina 98 e da isoleucina 378.

Figura 38: Interações entre o complexo 2_1E_2A_3C_4B **(177)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.

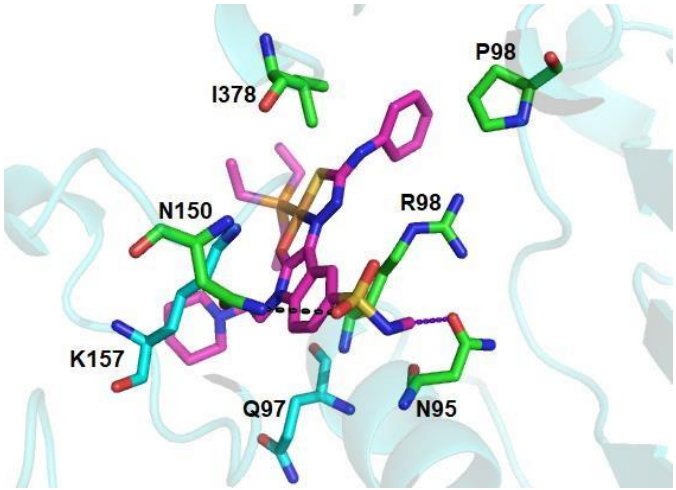


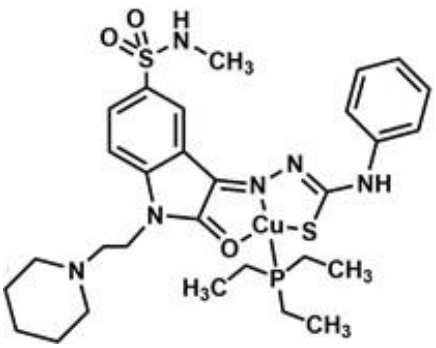
2_1E_2A_3C_4B

(177)

O átomo de nitrogênio pertencente a porção da base de Schiff da tiossemicarbazona faz interação de hidrogênio clássica com o grupo amina presente no resíduo da arginina 98. A sulfona da porção sulfonamida realiza interação de hidrogênio clássica com o grupo amida pertencente ao resíduo da asparagina 150. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo metil substituído na porção sulfonamida com a carbonila do resíduo de asparagina 91. O mesmo ocorre com o resíduo de asparagina 95. Ocorre interação do tipo empilhamento amida-π através do resíduo de arginina 98 com anel da isatina. Ocorre interação do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através do substituinte da isatina para o resíduo da lisina 157. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte da piperidina para o resíduo da lisina 157 e valina 130, assim como do anel aromático da trifenilfosfina para o resíduo da isoleucina 378.

Figura 39: Interações entre o complexo 3_ 1D_2A_3D_4A **(156)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



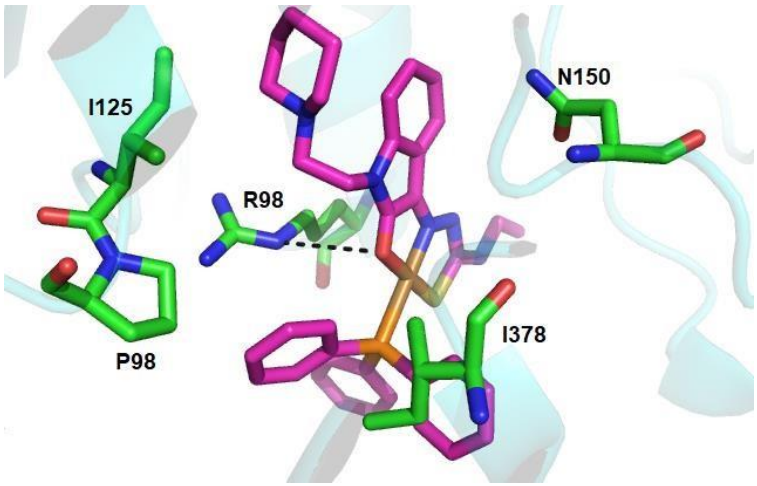


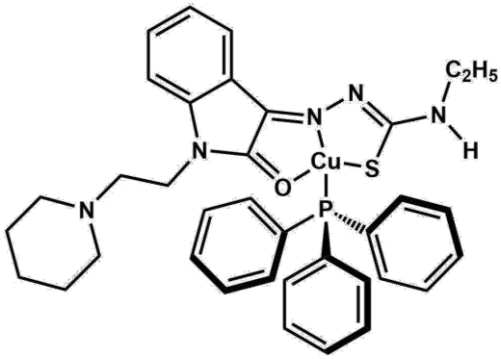
3_1D_2A_3D_4A

(156)

. A sulfona da porção sulfonamida realiza interação de hidrogênio clássica com o grupo amida pertencente ao resíduo da asparagina 150. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo metil substituído na sulfonamida com a carbonila do resíduo de asparagina 95. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila pertencente ao grupo amida do resíduo da glutamina 97 com o grupo alquila do substituinte da piperidina. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através da anilina substituída na TSC com o grupamento imina pertencente ao resíduo da arginina 98, assim como através da isatina com a função amina pertencente ao resíduo de lisina 157. Ocorre interação eletroestática tipo σ-π através do anel pertencente à isatina com o resíduo de arginina 98. Ocorre interação eletroestática do tipo empilhamento amida-π através do resíduo de arginina 98 e da glutamina 97, com o anel da isatina no complexo. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel indol pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, assim como através do anel substituído na TSC com o grupo alquila do resíduo da prolina 98 e da isoleucina 378. Ocorre ainda interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte da piperidina com o grupo alquila da lisina 157.

Figura 40: Interações entre o complexo 4_1A_2A_3C_4C **(88)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



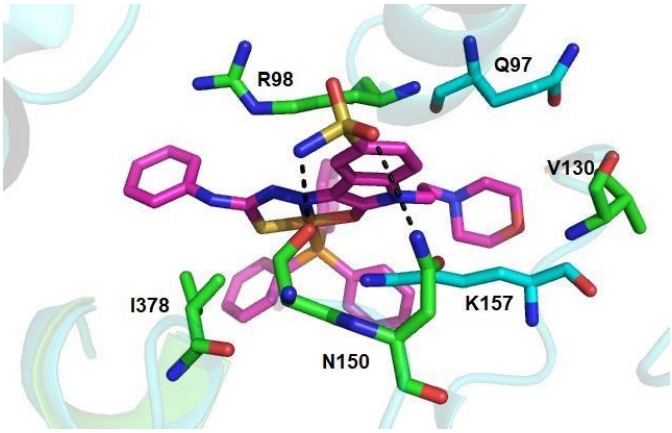


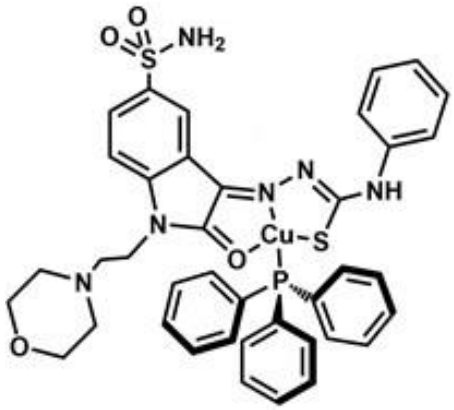
4_1A_2A_3C_4C

(88)

Ocorre interação de hidrogênio clássica através da carbonila pertencente à isatina com o grupo amina do resíduo de arginina 98. Interação de hidrogênio não clássica do tipo π-doador decorrente das concentrações de carga no anel aromático pertencente à trifenilfosfina do complexo com a função amina presente no resíduo de arginina 98. Interação de hidrogênio não clássica do tipo π- doador decorrente das concentrações de carga no anel aromático indólico da isatina com a função amida presente no resíduo de asparagina 150. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através da trifenilfosfina com o grupamento imina pertencente ao resíduo da arginina 98. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte piperidina com o grupo alquila pertencente ao resíduo isoleucina 125. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, assim como através da trifenilfosfina para o resíduo da prolina 98 e isoleucina 378.

Figura 41: Interações entre o complexo 5_1B_2B_3D_4C **(114)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



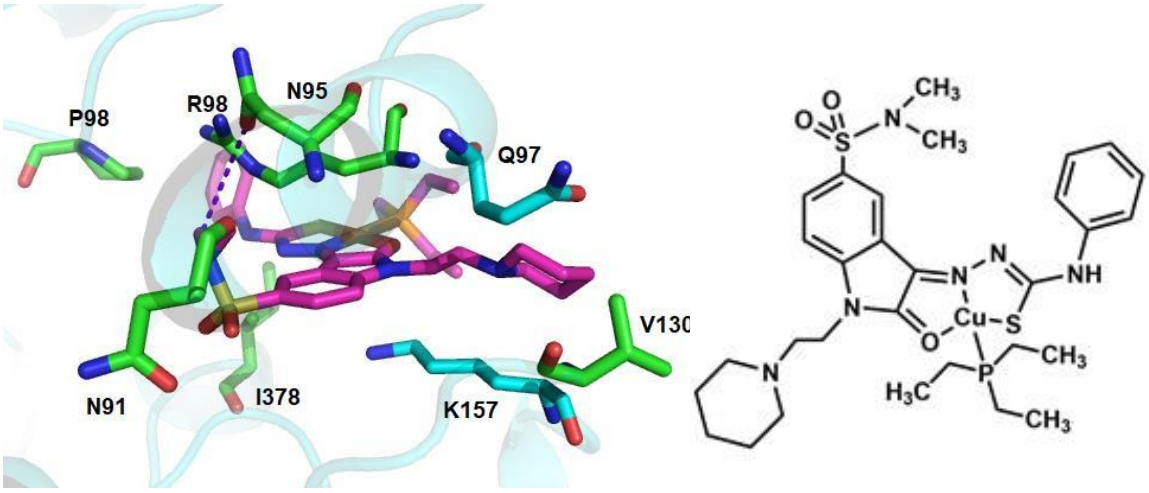


5_1B_2B_3D_4C

(114)

. A sulfona da porção sulfonamida realiza interação de hidrogênio clássica com o grupo amida pertencente ao resíduo da asparagina 150. A amida presente na sulfonamida substituída faz interação de hidrogênio clássica com o átomo de oxigênio presente no grupo hidroxila do resíduo da serina 149. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila no resíduo da glutamina 97 para o grupo alquila do substituinte da morfolina, assim como da porção morfolina para o grupo alquila do resíduo da lisina 157. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, ocorre também através da substituinte amina na TSC e da trifenilfosfina para o resíduo da isoleucina 378. Ocorre interação eletroestática do tipo σ-π através do anel derivado da isatina com o resíduo de arginina 98. Ocorre também interação eletroestática do tipo empilhamento amida-π através do resíduo de arginina 98 que está paralela ao anel pertencente à isatina. Este mesmo resíduo faz interação eletroestática do tipo cátion-π através da amina substituída na tiossemicarbazona. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila, do substituinte da morfolina para o grupo alquila do resíduo da lisina 157 e da valina 130.

Figura 42: Interações entre o complexo 6_1E_2A_3D_4A **(176)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas

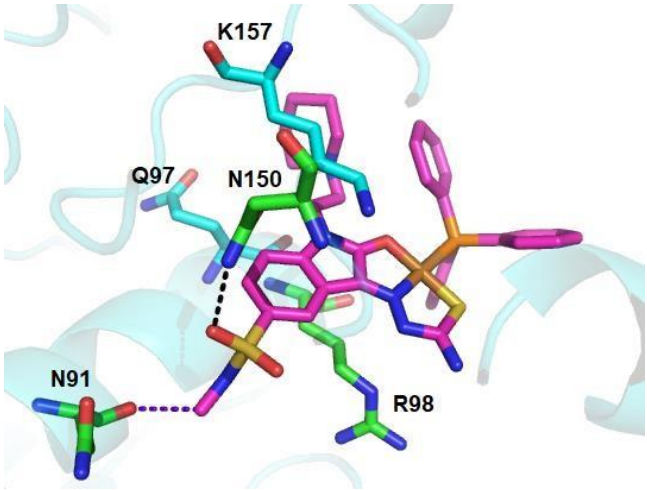


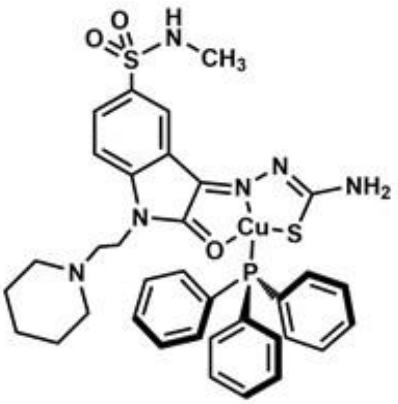
6_1E_2A_3D_4A

(176)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do substituinte presente na sulfonamida com o grupo carbonila do resíduo de asparagina 95. O mesmo ocorre com o resíduo da asparagina 91. Ocorre interação eletroestática do tipo σ-π através do anel pertencente à isatina com o resíduo de arginina 98. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel de cinco membros pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através da isatina com a função amina pertencente ao resíduo de lisina 157. Ocorre ainda interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte da piperidina com o grupo alquila da lisina 157. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do substituinte na TSC para o grupo alquila do resíduo da prolina 98 e da isoleucina 378. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila, do substituinte da piperidina para o grupo alquila do resíduo da valina 130.

Figura 43: Interações entre o complexo 7_1D_2A_3A_4C **(153)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



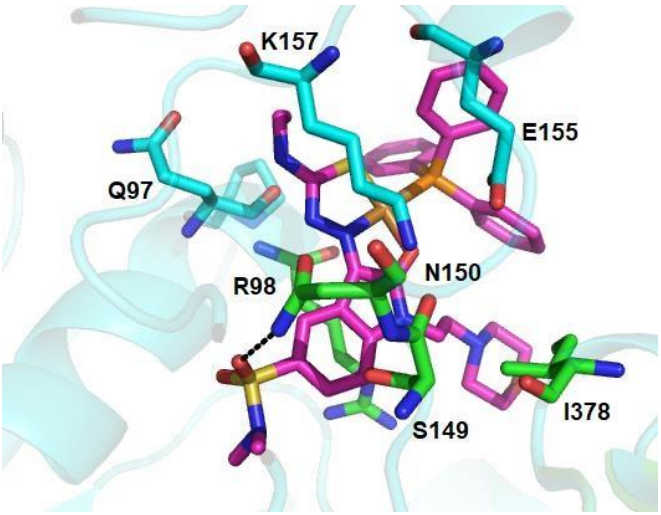


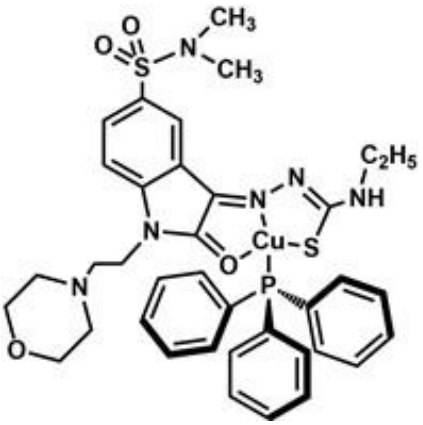
7_1D_2A_3A_4C

(153)

A sulfona da porção sulfonamida realiza interação de hidrogênio clássica com o grupo amida pertencente ao resíduo da asparagina 150. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo metila substituído na sulfonamida com a carbonila do resíduo de asparagina 91. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila na função amida pertencente ao resíduo da glutamina 97 com o grupo alquila do substituinte da piperidina. Ocorre interação eletroestática do tipo empilhamento amida-π através do resíduo de arginina 98 e da glutamina 97 junto com anel da isatina. Ocorre interação eletroestática do tipo σ-π através do anel pertencente à isatina com o resíduo de arginina 98. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através da isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98 e lisina 157. Ocorre interação do tipo cátion-π através da isatina com a função amina pertencente ao resíduo de lisina 157.

Figura 44: Interações entre o complexo 8_1E_2B_3C_4C **(186)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



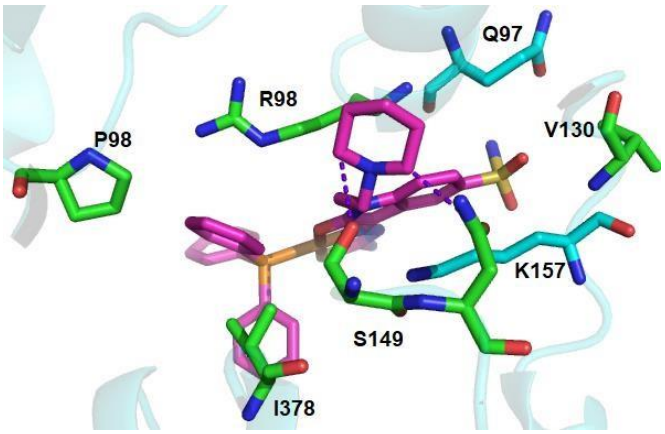


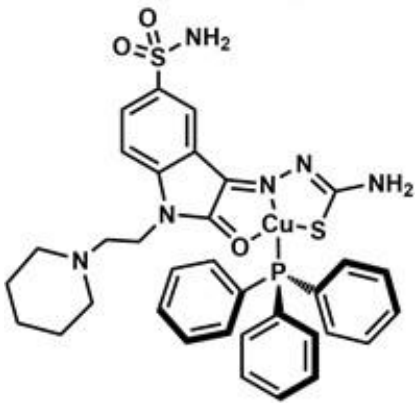
8_1E_2B_3C_4C

(186)

A sulfona da porção sulfonamida realiza interação de hidrogênio clássica com o grupo amida pertencente ao resíduo da asparagina 150. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, assim como com o anel de cinco membros pertencente na isatina. A hidroxila presente no resíduo da serina 149 faz interação eletroestática com o anel presente na isatina. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através do anel indólico da isatina com o resíduo da lisina 157, e ânion-π através da trifenilfosfina para o resíduo da glutamato 155. Ocorre ainda interação hidrofóbica do tipo alquila através do substituinte da morfolina com o grupo alquila da prolina 98 isoleucina 378.

Figura 45: Interações entre o complexo 9_1B_2A_3A_4C **(95)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.



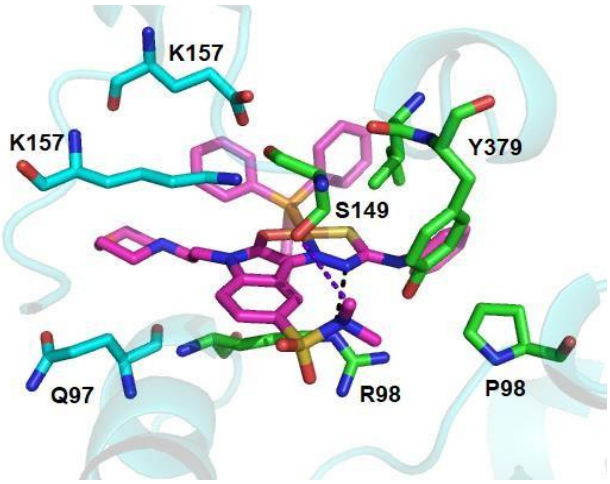


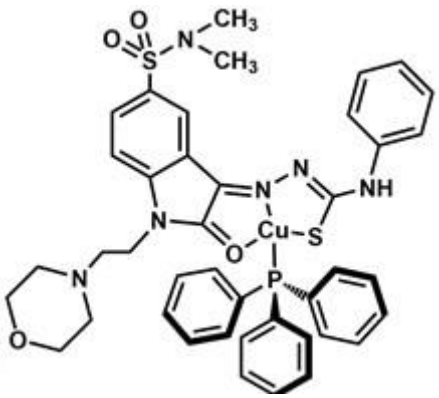
9_1B_2A_3A_4C

(95)

Ocorre interação de hidrogênio clássica através da sulfona pertencente a porção sulfonamida com a amina do resíduo da valina 130. Ocorre interação de hidrogênio clássica através da sulfonamida com a carbonila da glutamina 97. O grupo alquila da piperidina faz interação de hidrogênio não clássica com a carbonila do resíduo de asparagina 150. Da mesma forma, o grupo alquila da piperidina faz interação de hidrogênio não clássica com o resíduo da serina 149. A porção sulfona faz interação de hidrogênio não clássica com o grupo alquila do resíduo da lisina 157. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do substituinte trifenilfosfina para o grupo alquila do resíduo da prolina 98 e da isoleucina 378. Interação de hidrogênio não clássica do tipo π-doador decorrente das concentrações de carga no anel aromático da trifenilfosfina com a função amina presente no resíduo de arginina 98. Ocorre interação eletroestática do tipo empilhamento amida-π através da amida pertencente ao resíduo de arginina 98 que está paralela ao anel da isatina. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, assim como com o anel de cinco membros pertencente na isatina e o anel da piperidina substituída.

Figura 46: Interações entre o complexo 10_1E_2B_3D_4C **(191)** com os resíduos de aminoácidos. As interações de hidrogênio estão representadas.





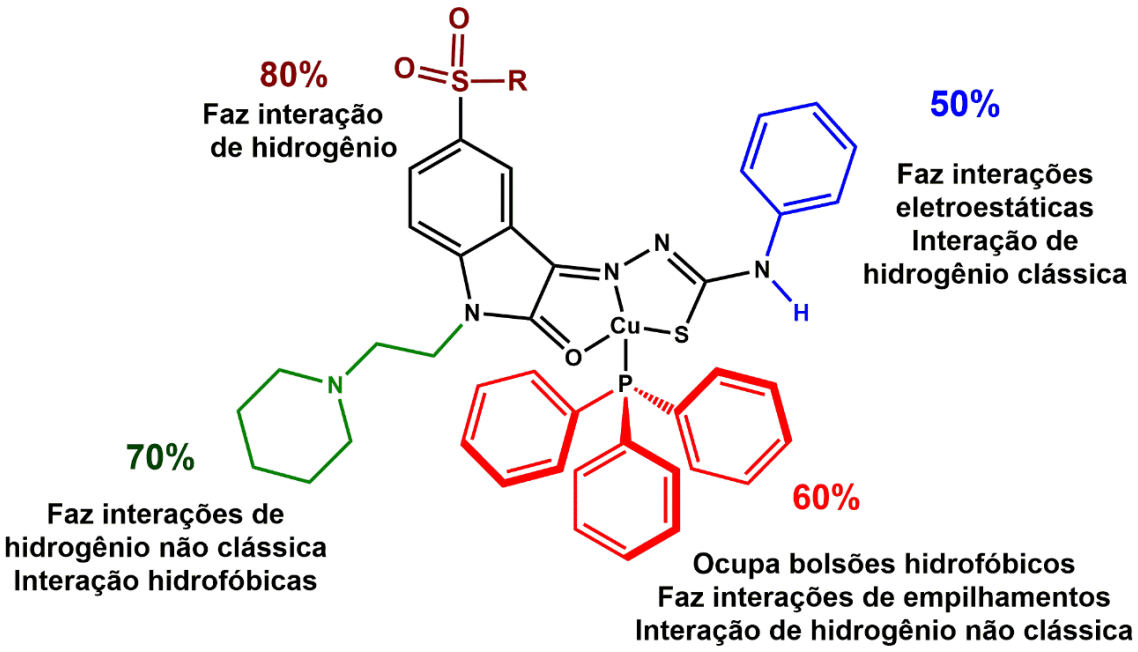
10_1E_2B_3D_4C

(191)

A imina da base de Schiff oriunda da TSC faz interação de hidrogênio clássica com o grupo amina pertencente ao resíduo da arginina 98 e tirosina 379. O grupo alquila presente no substituinte da sulfonamida realiza interação de hidrogênio não clássica com o átomo de oxigênio da função hidroxila do resíduo da serina 149. O grupo alquila do substituinte da morfolina faz interação de hidrogênio não clássica com a carbonila da função amida pertencente ao resíduo da glutamina 97. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do anel aromático indólico pertencente à isatina com o grupo alquila do resíduo de arginina 98, ocorre o mesmo através do anel de cinco membros. Ocorre, também, através do anel substituído na TSC para o grupo alquila do resíduo da prolina 98. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através do anel da morfolina com o grupo alquila do resíduo da lisina 157. Ocorre interação eletroestática do tipo cátion-π através do anel aromático indólico com o resíduo da lisina 157, e ânion-π através da trifenilfosfina para o resíduo da glutamato 97.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar subunidades estruturais que forneceram maior número de interações com os resíduos do sítio ativo, sendo estas destacadas a seguir.

Figura 47: Padrão de substituintes **(194)** que demostraram maior número de interações.



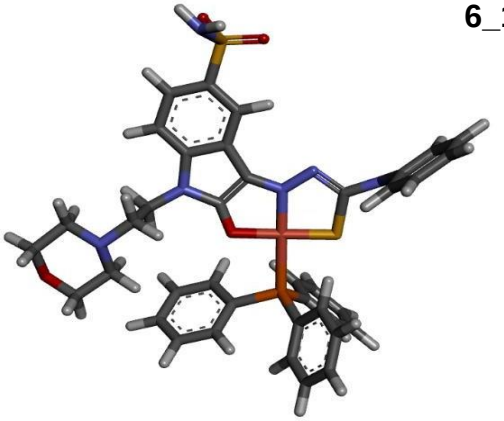
(194)

Todos os dez complexos escolhidos por apresentarem maior número de interações com os resíduos do sítio ativo contêm como substituintes: 60% a trifenilfosfina (vermelho), 50% a amina substituída com anel aromático (azul), 70% a piperidina (verde) e 80% as sulfonas (marrom). Tal padrão seguido está relacionado com a presença do grupo doador e aceptor de ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletroestáticas do tipo de empilhamento-π e empilhamento-T que os anéis aromáticos realizam, interações do tipo π-enxofre e interações de hidrogênio não clássica do tipo *π···H-C* com os orbitais π que acumulam concentrações de carga nos anéis aromáticos e ainda, a presença do substituinte N-heterocíclico possibilitou interação hidrofóbica do tipo π-alquila . [86,87]

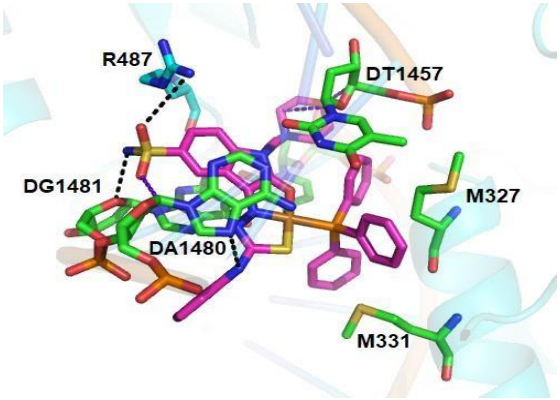
4.2.3) Possível inibição dual ATP/etoposídeo

Dos 10 complexos eleitos como melhores para o sítio do etoposídeo **(1)** e dos 10 melhores para o sítio ativo do ANP, o 1B_2B_3D_4C (**Figura 48**) foi ranqueado em ambos os sítios, sendo o sexto melhor ranqueado no sítio do etoposídeo e o quinto melhor ranqueado no sítio do ANP. Caracterizando assim, possível inibição dual frente a topoisomerase IIα.

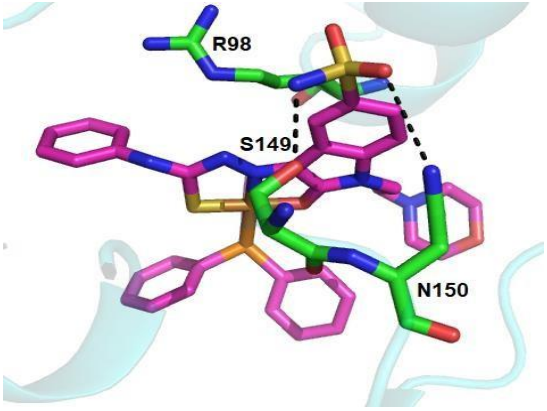
Figura 48: Complexo 1B_2B_3D_4C **(114)** obteve interação com os resíduos de aminoácidos de ambos sítios ativos. (Figura feita em: *PyMOL(TM) 1.0*)



5GWK com 6_1B_2B_3D_4



1ZXM com 5_1B_2B_3D_4C

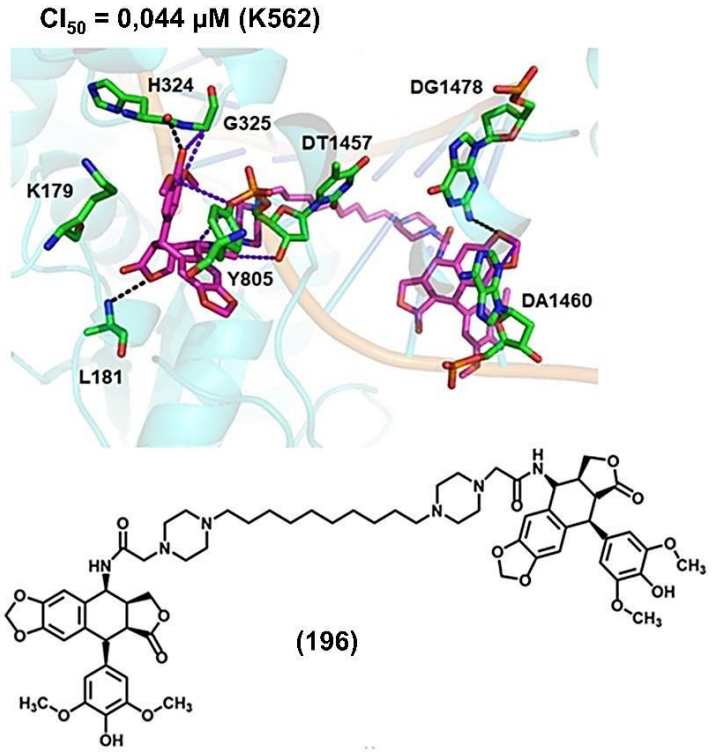


4.3) Ancoragem molecular das substâncias da literatura

Da mesma forma, foram analisadas 94 substâncias retiradas da literatura usando o banco de dados ChEMBL com atividade no sitio do etoposídeo e 98 substâncias com atividade no sitio do ATP. Todas as estruturas para o sítio do etoposídeo se encotram no **Anexo 3 (195-316)** e para o sítio do ATP se encontram no **Anexo 4 (317-420)**.

Para a estrutura da topoisomerase IIα co-cristalizada com etoposideo (PDB ID: 5GWK), estão descritos abaixo os cinco maiores valores de função de pontuação obtido para as substâncias da literatura.[88,89]

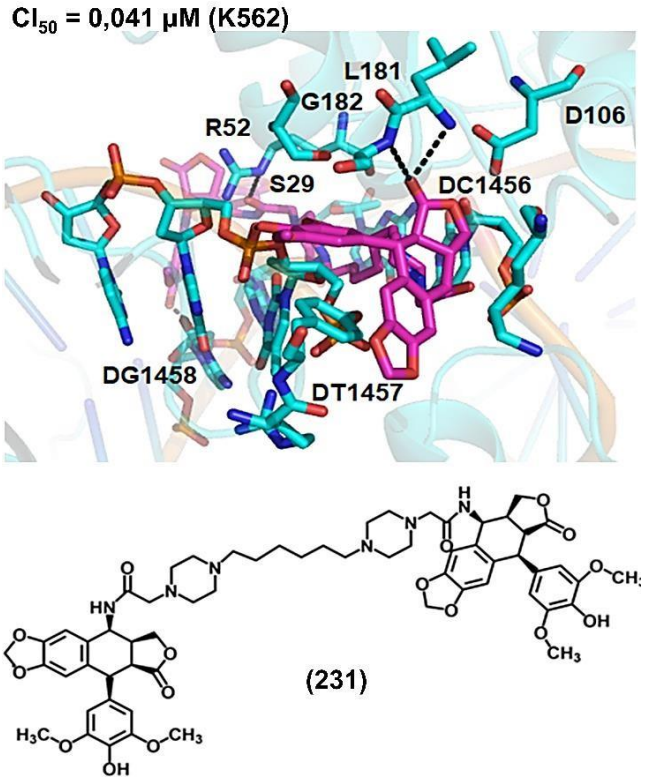
Figura 49: Ligante **(196)** da literatura com CI_{50} = 0,044 μM (K562)



Ocorre interação de hidrogênio clássica através do átomo de nitrogênio da função amina presente no resíduo de leucina 181 com a função éter do ligante **(196)**. Ocorre interação de hidrogênio clássica através da carbonila do resíduo de histidina 324 com a carbonila presente no ligante **(196)**. Ocorre também, interação de hidrogênio clássica através da função amina da base nitrogenada guanina 1478 com

o átomo de oxigênio da função éter. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do carbono presente no resíduo de aminoácido da glicina 325 com o átomo de oxigênio pertencente a hidroxila do ligante **(196)**. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do nitrogênio imínico pertencente à base nitrogenada da adenina 1460, ocorre também através da carbonila da base timina 1457 com o carbono do ligante **(196)**. Ocorre interação de hidrogênio não clássica a partir da função hidroxila do resíduo de tirosina 805 com o ligante **(196)**. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através dos anéis aromáticos pertencente ao resíduo de tirosina 805 e pertencente ao ligante. Ocorre também interação hidrofóbica do tipo π-alquila com o anel aromático pertence ao ligante **(196)** e o grupamento alquila do resíduo de aminoácido lisina 179.

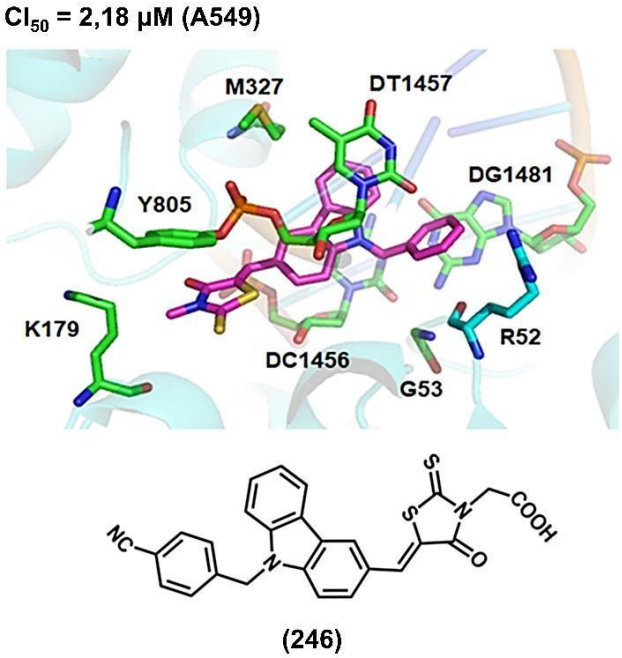
Figura 50: Ligante **(231)** da literatura com CI_{50} = 0,041 μM (K562)



Ocorre interação de hidrogênio clássica através da guanidina do resíduo de arginina 52 com a carbonila pertencente ao ligante **(231)**. Ocorre também através da função amina do resíduo da leucina 181 e glicina 182 com o grupamento carbonila pertencente ao ligante **(231)**. Ocorre ainda interação de hidrogênio clássica através da base guanina 1458 com a grupo hidroxila do ligante **(231)**. Ocorre interação de

hidrogênio não clássica através da carbonila do ligante **(231)** e o carbono pertencente ao resíduo de serina 29. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila do resíduo de aspartato 106 com o carbono do ligante **(231)**. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila da base nitrogenada timina 1457. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da hidroxila pertencente a base nitrogenada citosina 1456. Ocorre também através da base guanina 1481. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila da base nitrogenada citosina 1479. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através do anel aromático da base citosina 1456 com o grupamento alquila do ligante **(231)**, da mesma forma ocorre com a base nitrogenada guanina 1481. Ocorre interação do tipo empilhamento-π com o anel aromático do resíduo de tirosina 805 e o anel aromático do ligante **(231)**. Interação hidrofóbica do tipo alquila ocorre com grupamentos alquilas pertencente ao resíduo de arginina 52 e do ligante **(231)**. Ocorre também interação hidrofóbica do tipo π-alquila com a anel aromático pertence ao ligante **(231)** e o grupamento alquila do resíduo de aminoácido lisina 179. Ocorre interação, interação hidrofóbica do tipo π-alquila com os anéis das bases nitrogenadas adenina 1480 e guanina 1481.

Figura 51: Ligante **(246)** da literatura com CI_{50} = 2,18 μM (A549)

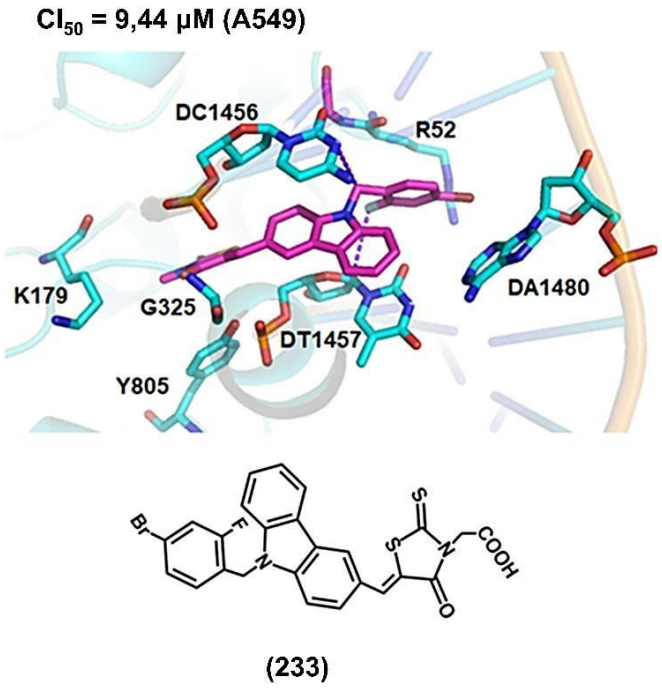


(246)

Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através do grupamento fosfato da base citosina 1456 e o anel aromático pertencente ao ligante **(246)**. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através da aproximação paralela de anéis

aromáticos da base citosina 1456 e timina 1457. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do anel aromático pertencente ao resíduo de tirosina 805 e o anel aromático do ligante **(246)**. Ocorre também através da base guanina 1481. Ocorre ainda, interação do tipo empilhamento amida-π através dos resíduos de arginina 52 e glicina 53 com o anel aromático existente no ligante **(246)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila decorrente do grupamento alquila do resíduo de lisina 179 e o grupamento alquila do ligante **(246)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila com o anel aromático pertencente ao resíduo de tirosina 805 e através dos grupamentos alquilas existentes nos resíduos de arginina 52 e metionina 327.

Figura 52: Ligante **(233)** da literatura com CI_{50} = 9,44 μM (A549)

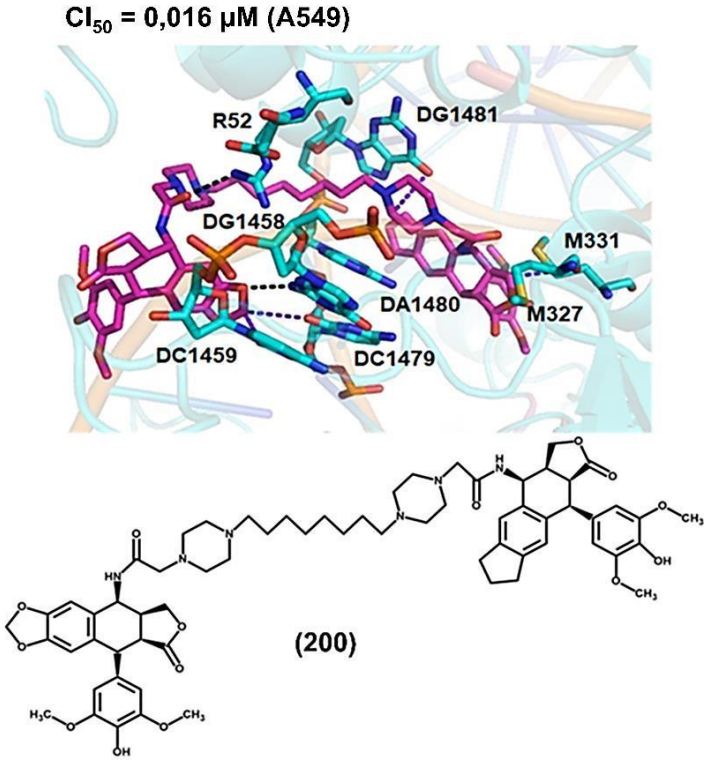


(233)

Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do resíduo de glicina 325 para a carbonila pertencente ao ligante **(233)**. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da função amida da base nitrogenada citosina 1456 com o grupamento alquila do ligante **(233)**. Da mesma forma, ocorre com a base nitrogenada da timina 1457 com o átomo de flúor presente no ligante **(233)**. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através do grupamento fosfato pertencente à base timina 1457 com o anel aromático pertencente ao ligante **(233)**. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através da aproximação paralela dos anéis aromáticos pertencentes ao ligante **(233)** e a base nitrogenada citosina 1456, da mesma forma ocorre com a base timina 1457. Ocorre interação do tipo empilhamento-π através do

anel aromático pertencente ao resíduo de tirosina 805. Ocorre também através da base guanina 1481. Ocorre ainda, interação do tipo empilhamento π-amida através da função amida pertencente aos resíduos de arginina 52 e glicina 53 com o anel aromático existente no ligante **(233)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila com o anel aromático pertencente ao resíduo de tirosina 805 com o ligante **(233)**, e através dos grupamentos alquilas existentes no resíduo de arginina 52. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila decorrente do grupamento alquila do resíduo de lisina 179 e o grupamento alquila do ligante **(233)**.

Figura 53: Ligante **(200)** da literatura com CI_{50} = 0,016 μM (K562)

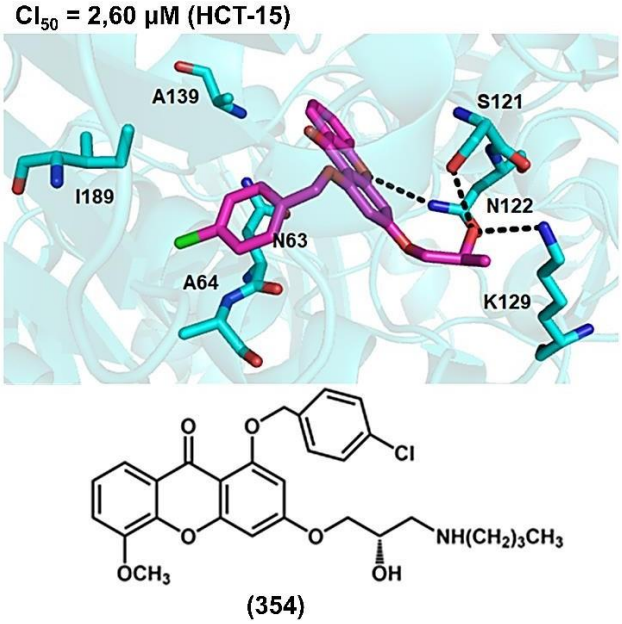


Ocorre interação de hidrogênio clássica através da carbonila presente no ligante **(200)** com a guanidina pertencente ao resíduo de arginina 52. Ocorre interação de hidrogênio clássica através da amina da base nitrogenada guanina 1458 com o átomo de oxigênio da função éter pertencente ao ligante **(200)**. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila da base citosina 1459 com o grupo alquila do ligante **(200)**, assim como com a base nitrogenada citosina 1479 e guanina 1481. Ocorre também através da carbonila do resíduo de metionina 327 com o grupo alquila do ligante. Ocorre interação eletroestática do tipo π-enxofre através do resíduo da metionina 331 com anel aromático do ligante **(200)**. Ocorre interação do tipo

empilhamento-T através da base adenina 1480 com o anel aromático do ligante **(200)**. Ocorre interação, interação do tipo π-alquila a com os anéis das bases nitrogenadas adenina 1480 e guanina 1481.

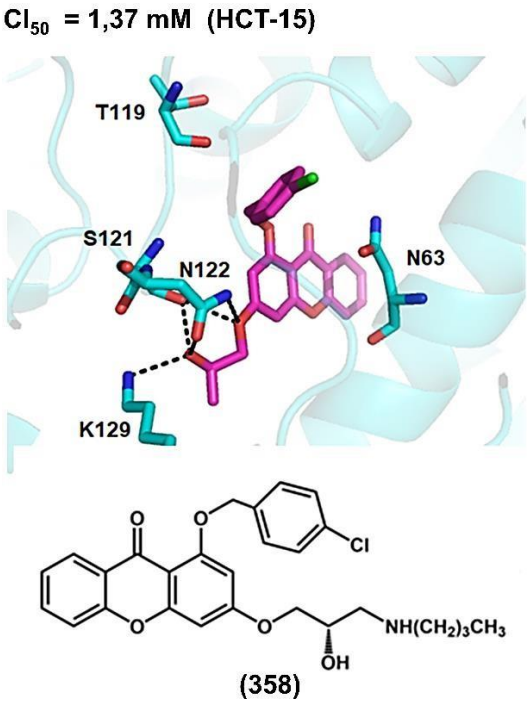
Para a estrutura da topoisomerase IIα co-cristalizada com o ANP (PDB ID: 1ZXM), estão descritos abaixo os cinco maiores valores de função de pontuação obtido para as substâncias da literatura.[90]

Figura 54: Ligante **(354)** da literatura com CI_{50} = 2,60 μM (HCT-15)



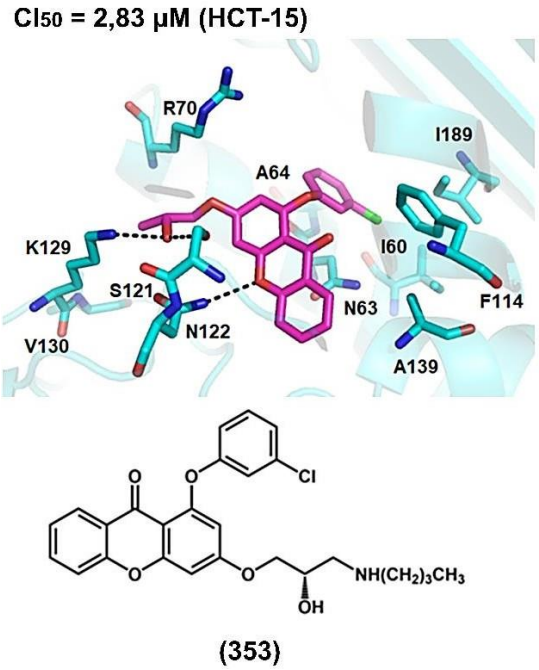
Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função hidroxila do resíduo de serina 121 com o grupo carbonila do ligante **(354)**. Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função amina do resíduo de asparagina 122 e a carbonila do ligante **(354)**. Ocorre também através do função amina do resíduo de lisina 129 e o grupamento hidroxila do ligante **(354)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-sigma através do grupamento alquila do resíduo de asparagina 63 com o anel aromático do ligante **(354)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila através dos grupos alquilas dos resíduos de alanina 64 e isoleucina 189, com grupo alquila do ligante **(354)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila a com o anel aromático pertencente aoligante **(354)** e o resíduo de aminoácido alanina 139.

Figura 55: Ligante **(358)** da literatura com CI_{50} = 1,37 μM (HCT-15)



Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função hidroxila do resíduo da serina 121 com a carbonila do ligante **(358)**. Ocorre interação de hidrogênio através da função amina do resíduo asparagina 122 com a função hidroxila do ligante **(358)**, da mesma forma ocorre com o resíduo de lisina 129. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através da carbonila pertencente ao resíduo de treonina 119 com o grupo alquila do ligante **(354)**. Ocorre interação do tipo π-sigma através do grupamento alquila do resíduo de asparagina 63 com o anel aromático do ligante **(354)**.

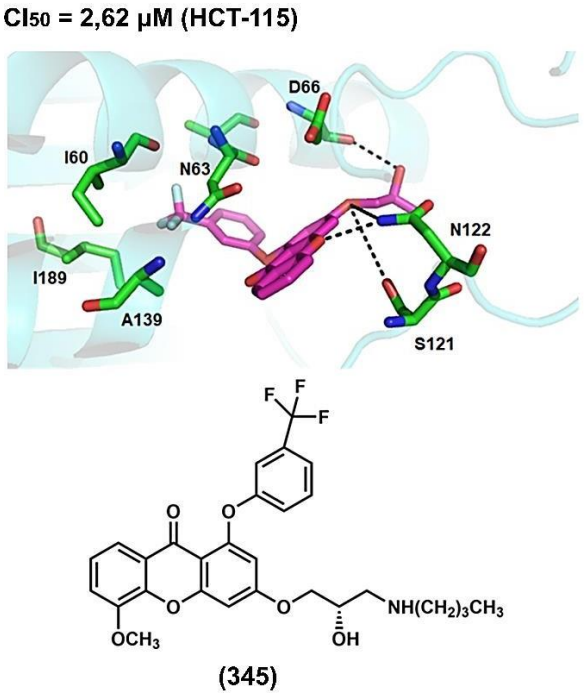
Figura 56: Ligante **(353)** da literatura com CI_{50} = 2,83 μM (HCT-15)



(353)

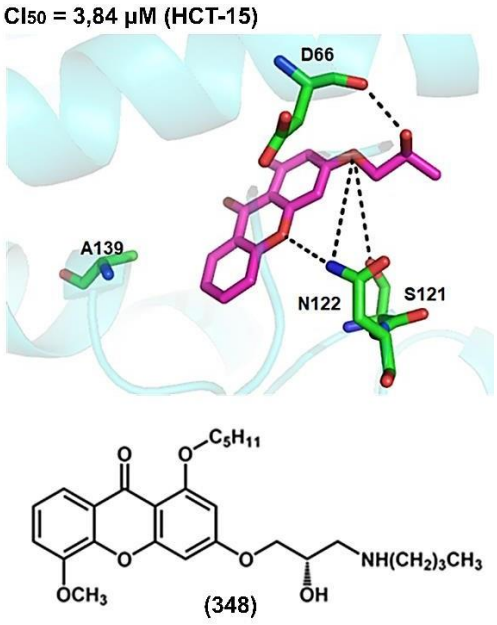
Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função hidroxila do resíduo da serina 121 com a carbonila do ligante **(353)**. Ocorre interação de hidrogênio através da função amina do resíduo asparagina 122 com a função hidroxila do ligante **(353)**, da mesma forma ocorre com o resíduo de lisina 129. Ocorre interação de hidrogênio não clássica através do grupo alquila do resíduo de arginina 70 com a carbonila do ligante **(353)**. Ocorre interação do tipo empilhamento amida-π com o anel aromático do ligante **(353)** com os resíduos de aminoácidos asparagina 63 e alanina 64. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila com os grupamentos alquilas dos resíduos dos aminoácidos: isoleucina 60, isoleucina 189 e valina 130, com grupamentos alquilas pertencentes aos ligante **(353)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila a com o anel aromático pertencente ao ligante **(353)** e o resíduo de aminoácido alanina 139 e fenilalanina 114.

Figura 57: Ligante **(345)** da literatura com CI_{50} = 2,62 µM (HCT-115)



Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função hidroxila do resíduo da serina 121 com o grupo éter no ligante **(345)**. Ocorre interação de hidrogênio através da função amina do resíduo asparagina 122 com a função hidroxila do ligante **(345)**, ocorre também através da carbonila do resíduo de aspartato 66 com a hidroxila do ligante **(345)**. Ocorre interação de halogênio através do átomo de flúor no ligante com a carbonila pertencente aos resíduos de isoleucina 60 e asparagina 63. Ocorre interação do tipo empilhamento amida-π com o anel aromático do ligante **(345)** com os resíduos de aminoácidos asparagina 63 e alanina 64. Ocorre interação hidrofóbica do tipo alquila com os grupamentos alquilas do resíduo de aminoácido isoleucina 189. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila a com o anel aromático pertencente ao ligante **(345)** e o resíduo de aminoácido alanina 139.

Figura 58: Ligante **(348)** da literatura com CI_{50} = 3,84 µM (HCT-15)



Ocorre interação de hidrogênio clássica através da função hidroxila do resíduo da serina 121 com o grupamento éter no ligante **(348)**. Ocorre interação de hidrogênio através da função amina do resíduo asparagina 122 com a função hidroxila do ligante **(348)**, ocorre também através da carbonila do resíduo de aspartato 66 com a hidroxila do ligante **(348)**. Ocorre interação eletroestática do tipo ânion-π através do resíduo de aspartato 66 com o anel aromático do ligante **(348)**. Ocorre interação hidrofóbica do tipo π-alquila através do resíduo de aminoácido alanina 139 com o ligante **(348)**.

Dessa forma, para a topoisomerase IIα co-cristalizada com o etoposídeo, obteve-se as seguintes proporções dos ligantes (substâncias da literatura) com os resíduos e bases nitrogenadas expressa na **Tabela 7**:

Tabela 7: Proporções (%) das interações dos ligantes da literatura “muito ativos”, “ativos” e “inativos” com os resíduos de aminoácidos e bases nitrogenadas do sítio da TOPIIα co-cristalizada com o etoposídeo e o DNA.

	M766	**R487**	**D-T1457**	**D-G1481**	**D-A1480**	**D-C1456**
Muito ativos	86%	71%	100%	71%	85%	0%
Ativos	0%	78%	88%	86%	52%	76%
Inativos	0%	65%	89%	91%	51%	86%

Assim, observa-se pela **Tabela 7** que as substâncias da literatura classificadas como “muito ativos” fazem interação com o resíduo de metionina 766 (M766) e os demais não, sendo esse um resíduo chave o sítio ativo. Assim como fazem interações com outros resíduos chave, a arginina 487 (R487) e com as bases nitrogenadas.

Da mesma maneira, foi estabelecida a relação dos ligantes (substâncias da literatura) com os resíduos no sítio do ANP. Observa-se através da **Tabela 8** que as substâncias da literatura classificadas como “muito ativo” e “ativos” apresentaram interação com os resíduos N91, S149 e R98; enquanto os “inativos” não apresentaram.

Tabela 8: Proporções (%) das interações dos ligantes da literatura “muito ativos”, “ativos” e “inativos” com os resíduos de aminoácidos do sítio da TOPIIα co-cristalizada com ANP.

	N91	**S149**	**N120**	**I125**	**R98**	**K157**	**I113**	**F114**	**I90**	**I60**	**I189**	**A64**
Muito ativos	75%	50%	75%	50%	50%	50%	75%	75%	50%	50%	0%	0%
Ativos	58%	50%	0%	0%	50%	0%	50%	0%	0%	0%	56%	53%
Inativos	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	56%	59%

Dessa forma, foi possível concluir através das relações demonstradas acima que os resíduos chaves de ambos sítios ativos da TOPIIα apresentam proporções significativas com os ligantes da literatura classificados com “muito ativos” e “ativos” , da mesma forma que os complexos de cobre (II) planejados e ranqueados pelo modelo in sílico.

5) Desenvolvimento das etapas de síntese para o complexo de maior viabilidade

Após as análises das interações dos modelos in sílico em ambos os sítios e do ranqueamento dos vinte (dez para cada sítio) complexos planejados que apresentaram maior número de interações com os resíduos-chave dos sítios ativos, foi feito o estudo da viabilidade sintética para os cinco melhores ranqueados em cada sítio. Dessa forma, o complexo chamado 1 com a estrutura 70, conforme está no Anexo 1 (**complexo 1 (70)**), foi o que apresentou ser mais viável para etapa de síntese por fatores como tempo e reagentes.

5.1) Materiais, métodos e instrumentação

5.1.1) Materiais utilizados

Os seguintes reagentes, materiais e solventes utilizados nas sínteses foram adquiridos de fontes comerciais: isatina 97% , 4-(2-cloroetil)morfolina, carbonato de potássio, dimetilformamida, diclorometano, acetato de etila, solução saturada de NaCl, sulfato de sódio, água destilada, tiossemicarbazida, ácido acético, etanol, cloreto de cobre(II) dihidratado, hexafluorofosfato de tetrabutilamônio 99%, trifenilfosfina, éter etílico, hexano, metanol, dimetilsulfóxido, benzeno e acetona.

5.1.2) Instrumentação

- **Ressonância magnética nuclear (RMN):**

A pureza e estrutura de compostos orgânicos (pró-ligantes e ligantes finais) sintetizados foram submetidas à técnica de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais de hidrogênio (^{1}H). Tais análises foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance III HD 600 no Laboratório de Multiusuários, Departamento de Química – IQ/CAr. Os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, δ = 0,00 ppm), e clorofórmio como solvente.

- **Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Vertex70, na região de 4000 a 400 cm^{-1}, com resolução de 4,0 cm^{-1}, no Departamento de Química Geral e Inorgânica - IQ/CAr. As amostras sólidas foram analisadas em pastilha de KBr (grau espectroscópico).

- **Condutividade Molar**

As medidas de condutividade foram realizadas em uma solução de etanol a $1x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$ no condutivímetro DM 31 Digimed do Departamento de Química Geral e Inorgânica - IQ/CAr. Para o cálculo da condutividade molar **Λm** foi usado a relação:

$$\mathbf{\Lambda m}\ (\mu S cm^2 mol^{-1}) = k(\mu S cm^{-1})\ \frac{(\frac{1000 cm^3}{dm^3})}{M\ (\frac{mol}{dm^3})}$$

- **Análise Elementar**

As porcentagens reais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram obtidas através do CHN Analyser Serie II – Perkin Elmer da Central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Central Analítica–IQ/USP).

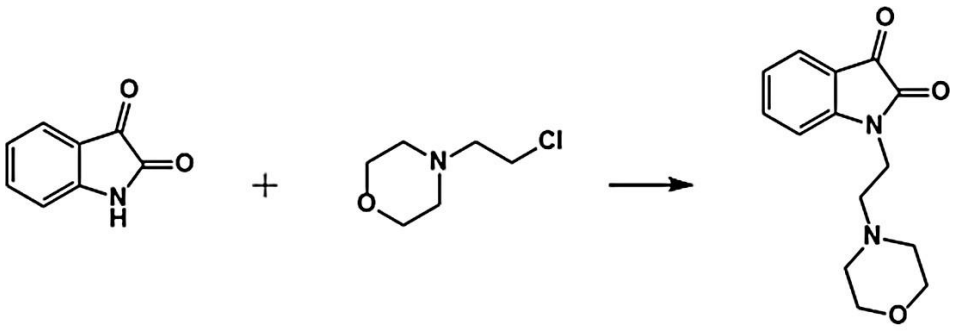
5.2) Métodos utilizados de síntese

5.2.1) Síntese do ligante 1 (425):

(*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida

Foi seguido o procedimento experimental proposto por Xi Kai Wee e colaboradores.[91] Inicialmente, foi realizado a substituição da morfolina **(422)** na isatina **(421)** expresso na **Reação 1**. Dissolveu-se 150 miligramas de isatina e 1,430 gramas de carbonato de potássio em 5,5 mL de DMF. Em seguida, adicionou-se 150 miligramas de 4-(2-cloroetil)morfolina. A reação ocorreu por 4 horas em 80 ˚C. O pH foi ajustado entre 8-9 e, em seguida, foi extraído a mistura com diclorometano/salmoura. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio e filtrada. Obteve-se um óleo alaranjado como produto.

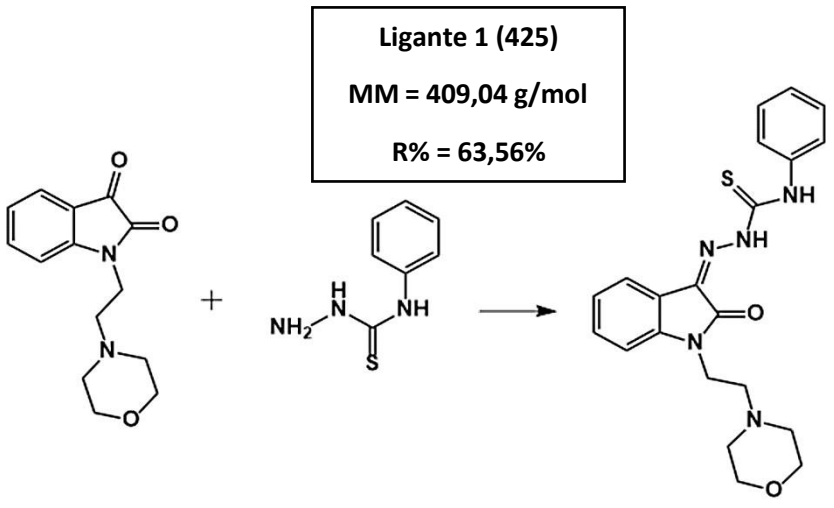
Reação 1: Obtenção do precursor 1-(2-morfolinoetil) indolina-2,3-diona **(423)**



(421) **(422)** **(423)**

Para a obtenção do ligante 1 **(425)**, com uma relação estequiométrica de 1:1, o precursor **(423)** obtido reagiu com a 96,37 mg tiossemicarbazina **(424)** em um meio contendo etanol com 20 gotas de ácido acético, em refluxo por seis horas, formando a tiossemicarbazona **(425)**, representado na **Reação 2** seguindo o procedimento proposto por SILVA, Thaysa.[92] Em seguida realizou-se a lavagem à frio com etanol para retirada do ácido, e o produto foi seco a vácuo. Obteve-se como produto 150 mg de cristais finos amarelados, com rendimento de 63,56% de reação. Em seguida, realizou-se o ^{1}H RMN do produto obtido **(425)**, dissolvendo-o clorofórmio para tal procedimento.

Reação 2: Obtenção do ligante 1 **(425)**, (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida



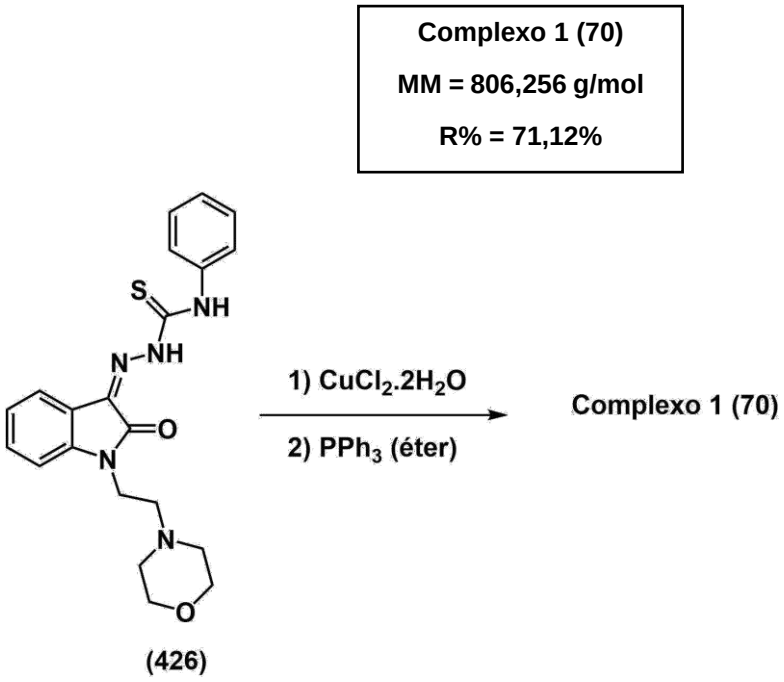
(423) **(424)** **(425)**

5.2.2) Síntese do complexo 1 (70):

(*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfina cobre(II)

Conforme metodologia proposta por MONSALVE, Monica[93], dissolveu-se 62,5 miligramas do ligante 1 **(425)** em etanol e 25 miligramas do cloreto de cobre diidratado em água, em seguida, adicionou-se a mistura do ligante 1 **(425)** com etanol no balão de reação, e com agitação constante, adicionou-se o metal dissolvido em água lentamente, mostrado na **Reação 3**.

Reação 3: Esquema geral da síntese de (Z)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfinacobre(II) (70)



Obteve-se uma solução de coloração marrom acastanhada, que foi deixada por 15 horas em agitação com posterior adição *in situ* de 38 miligramas de fosfina dissolvida em éter quente. Obteve-se um óleo marrom escuro, que foi levado ao rotaevaporador. Para a precipitação, adicionou-se hexafluorofosfato de tetrabutilamônio ($C_{16}H_{36}F_6NP$ 99%) na proporção 1:1 e em seguida foi levado à geladeira. Na sequência, realizou-se a filtração à vácuo da substância com posterior secagem no dessecador. Dessa forma, é esperado conforme expresso na **Reação 3**,

a obtenção do complexo 1 **(70)** sólido e de coloração marrom escura com massa de 140,9 mg com um rendimento de 71,12% da reação.

5.3) Testes de solubilidade do ligante 1 (425) e complexo 1 (70)

Foi testada a solubilidade do **ligante 1,** (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida **(425)** em metanol, etanol, acetona, DMSO, DMF, benzeno e água.

Tabela 9: Teste de solubilidade para o Ligante 1, (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamida **(425)**

Solvente	Polaridade
Metanol	Parcialmente solúvel
Etanol	Solúvel
Acetona	Solúvel
DMSO	Solúvel
DMF	Solúvel
Benzeno	Solúvel
Água	Insolúvel

Foi testada a solubilidade do **complexo 1,** (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfinacobre(II) **(70)** em metanol, etanol, acetona, DMSO, DMF, benzeno e água.

Tabela 10: Teste de solubilidade para o complexo 1 **(70)**

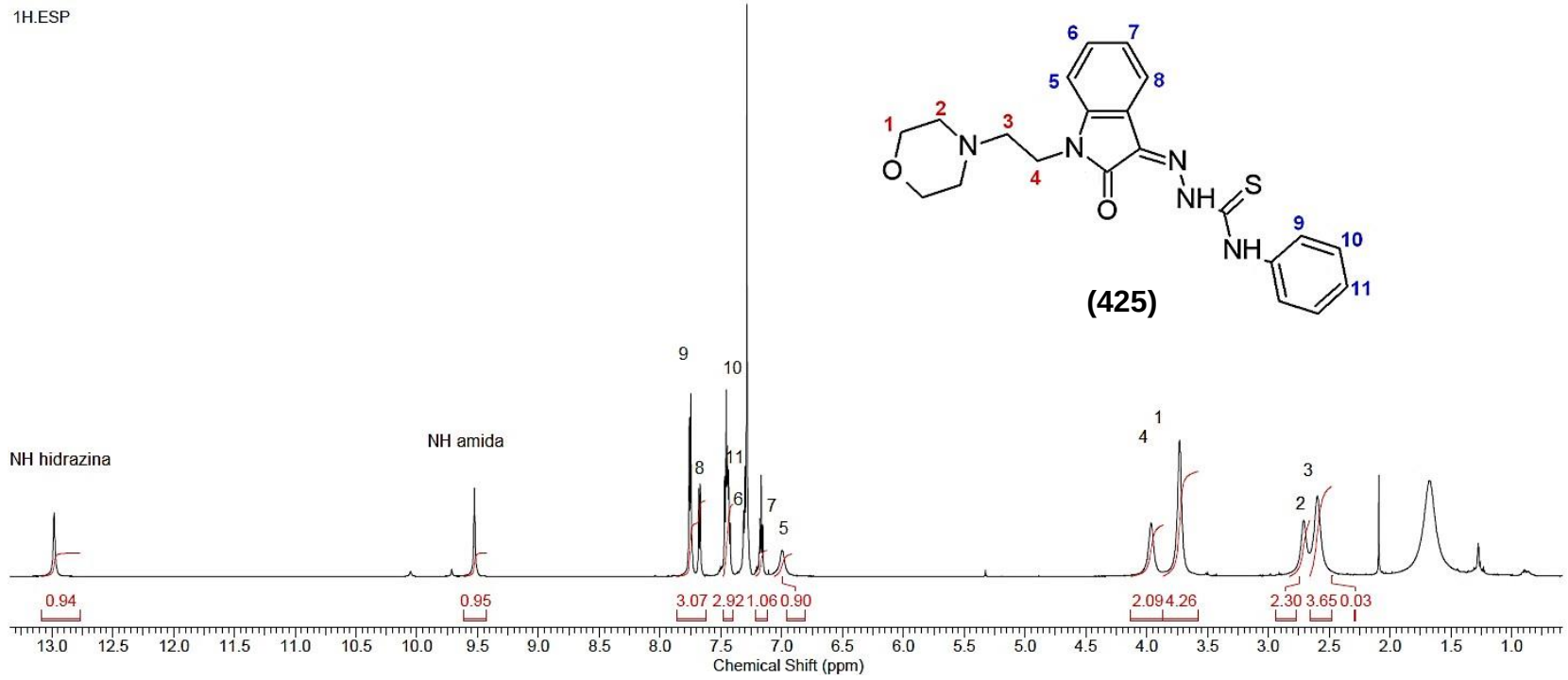
Solvente	Polaridade
Hexano	Insolúvel
Etanol	Parcialmente solúvel
Acetato de etila	Parcialmente solúvel
DMSO	Solúvel
DMF	Solúvel
Água	Insolúvel

6) Caracterização dos produtos obtidos – Resultados Preliminares

6.1) Ressonância magnética nuclear (RMN ^{1}H) do ligante 1 (425)

A espectroscopia de RMN de ^{1}H é uma técnica bastante útil para a caracterização dos compostos orgânicos sintetizados, pois fornece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado.[94] Foi realizada para o ligante 1 **(425)**, a fim de verificar pureza e os principais sinais do composto esperado. A partir dos deslocamentos químicos e a integração dos sinais observados nos espectros, foi possível determinar o número de átomos de hidrogênio presentes no composto, assim como suas distinções e atribuições.[76] Os valores dedeslocamento químico (δ, ppm), o número de átomos de hidrogênio correspondentese as atribuições dos sinais obtidos para o ligante 1 **(425)** estão na **Figura 59**. Dessa forma, quanto mais blindado o núcleo do próton, os sinais estarão em regiões de menores valores de ppm (mais próximo ao zero do TMS), por outro lado, os átomos de hidrogênio que sofrem desblindagem estarão em regiões de maiores valores de ppm.[94,95] Neste sentido, observou-se a presença de um singleto em 13 ppm, relativo ao N-H hidrazínico, sendo que este se encontra significativamente desblindado. Verifica-se um singleto em 9,5 ppm referente ao hidrogênio tioamídico.[96] Os hidrogênios aromáticos se encontram entre 7-8 ppm, sendo que o hidrogênio 9 aparece como dubleto e o 7 e o 10 como tripletos. Dois singletos entre 3,5-4 ppm e outros dois singletos entre 2,5-3 ppm são referentes à unidade morfoliniletila, que possuem hibridização do tipo sp^3. O alargamento desses sinais ocorre devido ao efeito quadrupolar do nitrogênio, oriundo da distribuição assimétrica da carga nuclear.[97]

Figura 59: Espectro de RMN ^{1}H para o ligante 1 **(425)** utilizando clorofórmio como solvente.



6.2) Condutividade Molar

Para verificar se o complexo de cobre (II) formado está na forma neutra, foi realizado a medida de condutividade molar do produto em uma solução com etanol a 10^{-3} mol.L^{-1}. O valor obtido está na Tabela 12.

Tabela 11: Condutância molar em etanol 1x10^{-3} mol.L^{-1} do complexo 1 **(70)**.

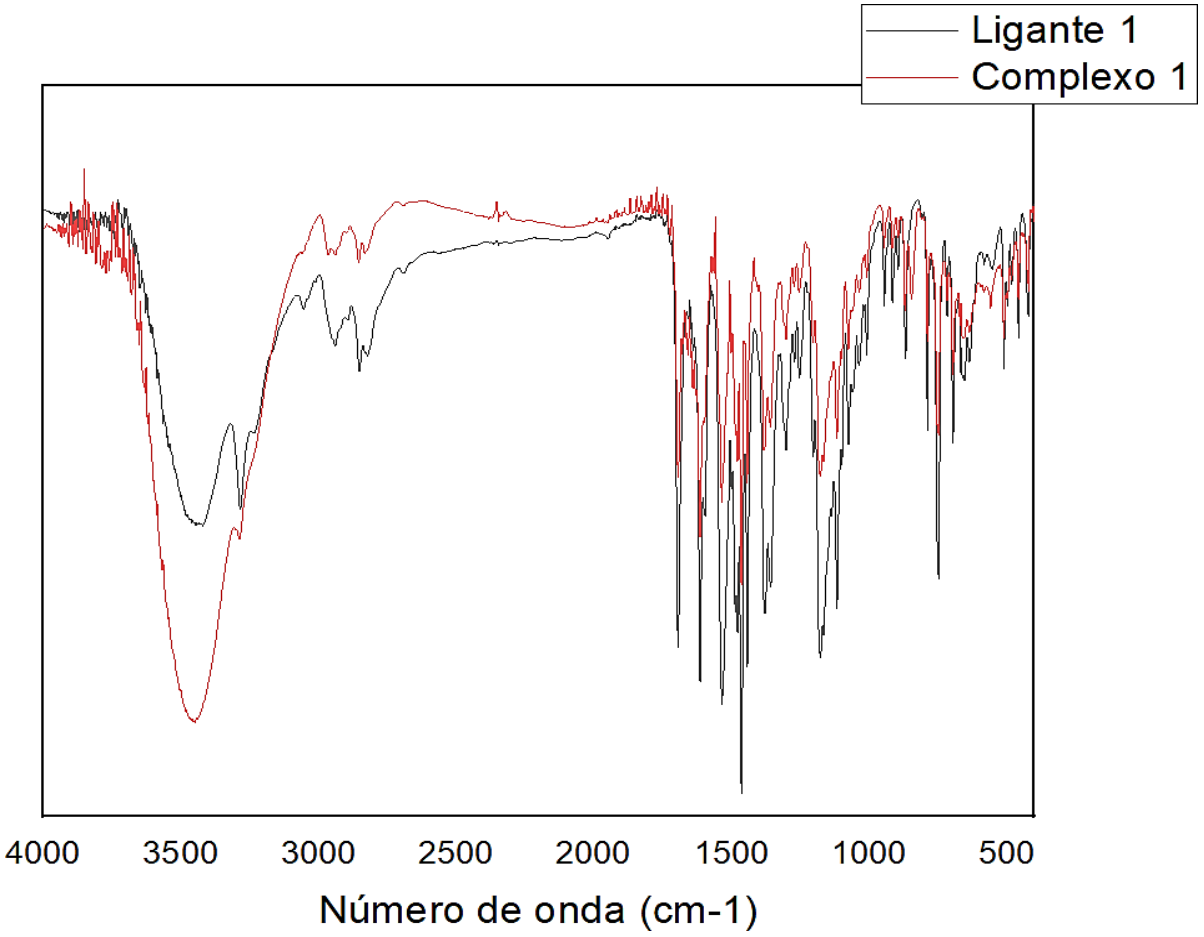
Composto	**Λm (μScm²mol^{-1})**
1	27,5

A medida de condutividade molar verifica a presença ou não de contra-íon, De acordo com os valores medidos por GEARY, William J.[115] uma solução eletrolítica 1:1 em etanol 10^{-3} M apresenta o valor de **Λm** entre 35- 45 μScm²mol^{-1}. Dessa forma, a medida não identificou a presença de contra-íon demonstrando ser uma solução não-eletrolítica, e, portanto, confirmando a forma neutra do produto obtido. Esse resultado revela que o ligante tiossemicarbazona está na forma aniônica -1 e sugere que o cloreto não foi substituído pela trifenilfosfina, e por isso, não há a presença de contra-íon em solução.

6.3) Espectroscopia na região do infravermelho (IV) para o ligante 1 (425) e complexo 1 (70)

Dessa forma, para verificar a presença da trifenilfosfina e também dos deslocamentos esperados, realizou-se a espectroscopia na região do IV. O espectro no infravermelho para o ligante 1 **(425)** e complexo 1 **(70)** (**Figura 60**) foram obtidos em pastilha de KBr. Trata-se de uma técnica de extrema importância para a identificação estrutural dos compostos e dos estiramentos referentes aos grupos funcionais.[98]

Figura 60: Espectro no infravermelho do ligante 1 **(425)** (linha preta) e do complexo 1 **(70)** (linha vermelha) em pastilha de KBr.



As interpretações dos espectros de infravermelho são utilizadas principalmente para as atribuições esperadas no composto obtido, não requerendo a atribuição de todas as bandas. Sendo assim, são de interesse os estiramentos para a carbonila (C=O), tiocarbonila (C=S), imina (C=N), amina (N-H) e (C=C) de aromáticos referente ao grupo fenila. Os espectros na região do infravermelho dos ligantes livres são caracterizados por um estiramento largo na faixa de 3284 cm^{-1} referente a ν(N-H) e um estiramento intenso em torno de 1613 cm^{-1}, que pode ser atribuída à absorção ν(C=N). O desaparecimento do estiramento largo em 3284 cm^{-1} pertencente ao N-H poderia confirmar a desprotonação do ligante ao se complexar com o metal.[99] Contudo, há uma banda intensa na mesma região pertencente ao complexo que dificultou a visualização. Dessa forma, é possível observar a formação do complexo de cobre (II) pelos deslocamentos dos ν(C=N), ν(C=O) e ν(C=S). O estiramento referente a ligação C=S no IV da tiossemicarbazona pode aparecer em duas regiões

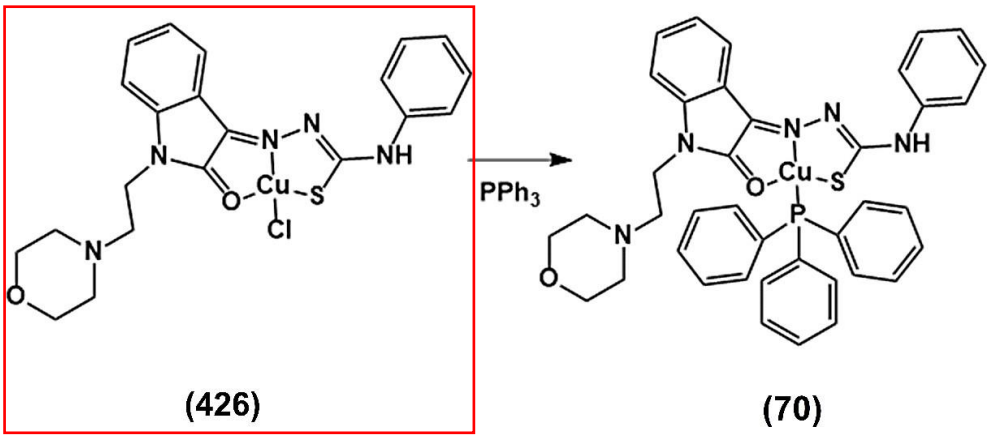
do espectro, 1118-1074 cm^{-1} e 800-846 cm^{-1}, devido aos diferentes modos vibracionais. No espectro a absorção está em 1116 cm^{-1} e 747 cm^{-1} para o ligante 1 **(425)**. Na faixa 1118-1074 cm^{-1} o estiramento v(C=S) pode estar com outros tipos de vibrações, como com a ligação N-C-N.[100] Se a tiossemicarbazona estiver na forma aniônica, ao complexar com o metal, há o deslocamento para regiões de menor número de onda.[101] O estiramento v(C=S) está em 747 cm^{-1} para o ligante 1 **(425)** e 691 cm^{-1} para o complexo, se deslocando para uma faixa de menor frequência, indicando a coordenação pelo átomo de enxofre com a formação da ligação C-S, após a coordenação da tiossemicarbazona via átomo de enxofre.[100] Os estiramentosv(C=N) são deslocados para uma região de 1613 cm^{-1} no ligante 1 **(425)** para 1547 cm^{-1} no complexo, e o estiramento ν(C=O) desloca-se de 1693 cm^{-1} no ligante 1 **(425)**para 1618 cm^{-1} no complexo; em ambos os casos estão indicando que a formação deanéis quelatos provoca uma deslocalização dos elétrons π.[102,103] Esse deslocamento evidencia a coordenação do ligante com o metal. O metal é um ácido de Lewis, portanto, recebe elétrons. Em outras palavras, o metal diminui a densidade eletrônica das ligações no ligante diminuindo a força da ligação. Ligações mais fracas vibram em menor energia, ou seja, em regiões de menor número de onda.[73,106] A ocorrência do estiramento em 1099 cm^{-1} pode pertencer à subunidade fenila e sugerir a presença da trifenilfosfina no complexo.[105] Para o ligante e o complexo, as vibrações do (C=C) de aromáticos aparecem em torno de 1500 cm^{-1} representada por uma banda forte. Nesse caso observa-se uma banda em 1523 cm^{-1} que pode ser atribuída ao núcleo do fenil. Ainda há duas bandas em torno de 1450 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} que também podemser atribuídas as subunidades aromáticas.[107,108] Contudo, como há também a subunidade fenila substituída na TSC, e como já foi proposto, se não ocorreu a trocade ligante entre o cloro e a trifenilfosfina, a banda observada pode pertencer a TSC. Há ainda as bandas das vibrações do (Cu-Cl), que se identificadas, confirmariam quenão ocorreu a troca entre o cloreto e a trifenilfosfina; essas bandas podem ser encontradas em regiões abaixo de 600 cm^{-1}. No espectro do complexo, entre 600 – 513 cm^{-1} há alguns formatos de bandas que parecem pertencer as vibrações (Cu- Cl).[109,110] Não foi observado também a banda pertencente ao ânion PF^- , usado comoo contra-íon, em torno de 840 cm^{-1}; o que sugere novamente que o complexo obtido está na forma neutra; tal sugestão está de acordo com o ensaio de condutividade molar já descrito.[111]

Tabela 12: Atribuições do infravermelho para o ligante 1 (**425)** e o complexo 1**.**

Atribuições	Ligante 1	Complexo 1
ν(N-H)	3284 cm^{-1}	-
νC=O, δN-H e νC=N	1693-1560 cm^{-1}	1618-1547 cm^{-1}
ν(C=S)	1116 e 747 cm^{-1}	691 cm^{-1}
(C=C)	1523 cm^{-1}	1099 cm^{-1}, 1523 cm^{-1}
	1450 – 1379 cm^{-1}	1450 – 1379 cm^{-1}

Dessa forma, propõe-se como resultado preliminar que o composto obtido foi o (Z)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)clorocobre(II) **(426)**, representado na **figura 61** da reação 4 destacado com um quadrado vermelho; e não o (Z)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)trifenilfosfinacobre(II) **(70)**

Figura 61: O **complexo 1** sugerido como o obtido na síntese é o (*Z*)-2-(1-(2-morfolinoetil)-2-oxoindolin-3-ilideno)-*N*-fenil-hidrazina-1-carbotioamidato)clorocobre(II) **(426).**



Uma das possíveis explicações para não ter ocorrido a troca de ligante pode ser explicada pela teoria de ácido-base de Pearson[112], sendo que o estado de oxidação do Cu^{+2} tem preferência por ligantes com caráter mais duro, como o cloreto. Já a trifenilfosfina tem um caráter macio, e teria preferência por um centro metálico mais macio do que o Cu^{+2}. Nesse caso, para confirmar o produto formado propõe-se outras técnicas de caracterização, como, por exemplo, análise elementar.

6.4) Análise Elementar de CHN

O suposto complexo 1 (70) com MM = 806,256 $g.mol^{-1}$ foi caracterizado por análise elementar de CHN. Na tabela 13 segue os valores calculados e os valores encontrados.

Tabela 13: Valores (%) calculados e encontrados na análise elementar.

	Análise elementar (%)	
Composto	**Calculado**	**Encontrado (Δ)***
Complexo 1 (70)	C: 58,09; H: 4,59; N: 8,68	C: 47,26(10,83) ; H: 4,99(0,4); N: 6,925(1,75)

*Δ= diferença entre os valores calculados e os valores encontrados.

Pela análise dos dados, observa-se que a % de carbono está muito acima da diferença máxima de 0,90% entre os valores calculados e os encontrados; dessa forma pode-se verficar que não ocorreu a troca de ligante pois a trifenilfosfina não está presente no composto obtido. Tal conclusão também é corroborada através das carecterizações anteriores.

7) Conclusão e Perspectivas

Para a estrutura cristalográfica da topoisomerase IIα co-cristalizada com o DNA e o etoposídeo **(1)** (PDB ID: 5GWK) e co-cristalizada com o ANP (PDB ID: 1ZXM), a função de pontuação que apresentou melhor performance foi a ChemPLP, estimando a energia de ligação do complexo ligante-proteína por meio da reprodução mais realista.[81] Assim, foi possível verificar e analisar as interações que os ligantes da literatura realizaram com os resíduos de aminoácidos e com as bases do DNA. Através da triagem virtual, por ancoragem molecular, foi possível selecionar, dentre 180 complexos de cobre (II), os 20 mais promissores para a etapa de síntese, visando atividade frente à topoisomerase IIα humana. O modelo computacional apresentou um excelente desempenho quanto às suas predições, sendo que a análise dos ligantes da literatura revelou as interações com os resíduos dos sítios ativos, sendo os resíduos de tirosina 805 (Y805), metionina 766 (M766) e a metionina 762 (M762) para o sitio do etoposídeo e lisina 378 (K378) e asparagina 150 (N150) para o sítio do ATP.[67,68] Dessa forma, as estruturas planejadas e analisadas fazem interações com resíduos dos sítios ativos que são determinantes para o reconhecimento fármaco-receptor e uma possível resposta fisiológica, pois também apresentaram interações com resíduos dos sítios ativos em comum com os ligantes da literatura. É importante destacar que complexo **(114)** se apresentou comopossível candidato a inibidor dual, porque interagiu com os resíduos conservados de ambos sítios ativos. Na etapa de síntese, o ligante 1 **(425)** foi obtido com um rendimento de 63,56% e sua estrutura foi elucidada por meio das técnicas de RMN ^{1}H, IV. Em relação a síntese do complexo 1 **(70)**, sugere-se, até então, que o produto obtido foi o complexo **(426)**, com um rendimento de 71,12%, para o qual através da espectroscopia de infravermelho, foi possível observar as bandas esperadas. Foi realizado também o ensaio de condutividade molar (27,5 $\mu Scm^{2}mol^{-1}$) verificando-se que o complexo de cobre (II) obtido está na forma neutra. Contudo, foi proposto que não ocorreu a troca de ligante entre o cloreto e a trifenilfosfina, obtendo-se o complexo **(426)**. A técnica de análise elementar comprovou que não houve a troca de ligante, como já estava sugerido. Como continuidade deste projeto, está previsto refazer as etapas de síntese para obtenção do complexo 1 **(70)** e realizar as reações de complexação paraobtenção dos demais complexos de cobre mais promissores, obtidos na triagem virtual. Posteriormente, os compostos sintetizados e caracterizados serão submetidospara a determinação da atividade frente as linhagens de células tumorais de mama (MDA-MB-231), pulmão (A549), colorretal (HT-29) e ovário (SKOV-3), assim como estudos de eletroforese em gel de agarose, visando avaliar a atividade inibitória dos complexos de cobre (II) frente à topoisomerase IIα humana.

8) Referências bibliográficas

1- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. **O que é o câncer**? Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 12 de setembro de 2018.

2- KATO, Yasumasa et al. Cancer metabolism: new insights into classic characteristics. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 1, p. 8-21 (2018).

3- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70 (2000).

4- KHAMENEHFAR, A. **Reversal of Multidrug Resistance Fluorescently Measured in Single Cancer Cells Captured in the Microfluidic Chip**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de Manitoba, Manitoba, 2015.

5- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil** – Rio de Janeiro (INCA, 2019).

6- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global burden of cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html/>. Acesso em: 21 de agosto de 2019. 5

7- RASHID S. Molecular Mechanism of Carcinogenesis. In: **Cancer and Chemoprevention: An Overview**. Springer, Singapore, 2017, p. 27-29 (2017).

8- MORRIS, W. H. et al. Structural and metal ion effects on human topoisomerase IIα inhibition by α-(*N*)-heterocyclic thiosemicarbazones. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 90-99 (2018).

9- MAHALAPBUTR, P. et al. Molecular recognition of naphthoquinone-containing compounds against human DNA topoisomerase IIα ATPase domain: A molecular modeling study**. Journal of Molecular Liquids**, v. 247, p. 374-385, (2017). 8

10- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. In: Gary A. Bannon and Robert Thornburg (Orgs.). Ácido Ribonucleico, c. 33 p. 940. (Elsevier Brasil, 2010).

11- TRIPATHI, N. et al. Pharmacoinformatics analysis of merbarone binding site in human topoisomerase IIα. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 86, p. 1-18 (2019).

12- ARTHUR, D. E. Molecular docking studies of some topoisomerase II inhibitors: Implications in designing of novel anticancer drugs. **Radiology of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 68-79 (2019).

13- KECK, J. M. et al. Clarifying the Mechanism of Copper (II) α-(*N*)-Heterocyclic Thiosemicarbazone Complexes on DNA Topoisomerase IIα and IIβ. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 10, p. 2135-2143 (2019).

14- ROCHA, F. V. et al. Computational studies, design and synthesis of Pd (II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-IIα. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, p. 110725 (2019).

15- HEINTZMAN, D. R. et al. Topoisomerase II Is Crucial for Fork Convergence during Vertebrate Replication Termination. **Cell Reports**, v. 29, n. 2, p. 422-436. e5 (2019).

16- WEI, H. et al. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37041-37047 (2005).

17- ROCHA, F. V. **Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara (2013).

18- ARENCIBIA, J. M. et al. Design, synthesis, dynamic docking, biochemical characterization, and in vivo pharmacokinetics studies of novel topoisomerase II poisons with promising antiproliferative activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 3508-3521 (2020).

19- SKOK, Z. et al. Dual inhibitors of human DNA topoisomerase II and other cancer-related targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 884-904 (2019).

20- RCSB; PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em 05 de agosto de 2019.

21- CASTELLI, S. et al. Interaction between natural compounds and human topoisomerase I. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 11, p. 1327-1340 (2012).

22- ŠTROS, M. et al. HMGB1 interacts with human topoisomerase IIα and stimulates its catalytic activity. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 15, p. 5001-5013 (2007).

23- DARCY, N.; GABRIELLI, B. Topoisomerase II inhibitors and poisons, and the influence of cell cycle checkpoints**. Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 15, p. 1504-1519 (2017).

24- LIU, T. et al. Dual-target inhibitors based on HDACs: Novel antitumor agents for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry** (2020).

25- XIAO, Z. et al. Antitumor Agents. 234. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 4β-[(4 ‘‘-Benzamido)-Amino]-4 ‘-O-Demethyl-Epipodophyllotoxin Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 5140-5148 (2004).

26- THUAUD, F. et al. Novel flavaglines displaying improved cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 411-415 (2011).

27- POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 82-95 (2013).

28- BOLS, M. et al. Inhibition of collagenase by aranciamycin and aranciamycin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 15, p. 2768-2771 (1992).

29- INFANTE L. L. et al. Coupling the core of the anticancer drug etoposide to an oligonucleotide induces topoisomerase II-mediated cleavage at specific DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 5, p. 2218-2233 (2018).

30- VINE, K. L. et al. *N*-alkylated isatins evade P-gp mediated efflux and retain potency in MDR cancer cell lines. **Heliyon**, v. 2, n. 1, p. 60 (2016).

31- LAVANYA, M. et al. Synthesis, crystal structure, DNA binding and antitumor studies of β-diketonate complexes of divalent copper, zinc and palladium. **Inorganica Chimica Acta**, v. 469, p. 76-86 (2018).

32- SAKTHIVEL, K. M.; HARIHARAN, S. Regulatory players of DNA damage repair mechanisms: Role in Cancer Chemoresistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 93, p. 1238-1245 (2017).

33- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. **Quimioterapia.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 25 de agosto de 2019

34- GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacologia.** 3ª ed. (Editora Guanabara Koogan, 2014).

35- ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386 (1969).

36- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores, **Revista Virtual de Química**, V.7 n.6 (2015).

37- WHEATE, N. J. et al. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 627-648 (2007).

38- LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa***.* 5. ed. (Edgard Blücher, 2000)

39-SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H. **Inorganic Chemistry***.* (Oxford University Press, 1999).

40- HUSSAIN, A. et al. Copper (II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-17 (2019).

41- COTTON, F. A.; WILKINSON, G*.* **Advanced Inorganic Chemistry.** 5th ed. (John Wiley & Sons, 1988).

42- SOUZA, R.F.F. **Compostos de paládio (II) contendo acetofenonaoxima ortometalada: síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica.** Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

43- IEIRA M.A. et al. Phosphine- and Isatin-Copper Complexes: Anticancer Activity, Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship Examples from the Last Ten Years. **Medicinal & Analytical Chemistry International Journal**, v. 3, issue 3 (2019).

44- KONAKANCHI, R. et al. Synthesis, Structural, Biological Evaluation, Molecular Docking and DFT Studies of Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Cd (II) and Hg (II) Complexes bearing Heterocyclic Thiosemicarbazone ligand. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 8, p. e4415 (2018).

45- BOAL, A. K.; ROSENZWEIG, A. C. Structural biology of copper trafficking. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4760-4779 (2009).

46- KENNEY, G. E.; ROSENZWEIG, A. C. Chalkophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, p. 645-676 (2018).

47- ARIÖZ, C.; WITTUNG-STAFSHEDE, P. Folding of copper proteins: role of the metal. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 51 (2018).

48- FESTA, R. A.; THIELE, D. J. Copper: an essential metal in biology. **Current Biology**, v. 21, n. 21, p. R877-R883 (2011).

49- SANTINI, C. et al. Advances in copper complexes as anticancer agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815-862 (2013).

50- AYOGLU, H. et al. Selenium, copper, zinc, iron levels and mortality in patients with sepsis and systemic inflammatory response syndrome in Western Black Sea Region, Turkey. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 4, p. 447-452 (2016).

51- MUGGIA et al., Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery. **Journal of Clinical Oncology**, p. 4219-4226 (2015).

52- NARAD, S. et al. Electroanalytical and bacterial effect on N-(5-Nitro-2-Furfurydiline) 3-amino-2-oxazolidone (furazolidone) and its metal complexes. **Analytical Letters**, v. 28, p. 2005-2016 (1995).

53- PATEL, R. N. et al. Magnetic spectroscopic, structural and biological properties of mixed-ligand complexes of copper(II) with *N,N,N',N",N"*-pentamethyldiethylenetriamine and polypyridine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 9, p. 2469-2476 (2004).

54- PATEL, R. N. et al. Synthesis, characterization and biological activity of ternary copper(II) complexes containing polypyridyl ligands. **Spectrochimica Acta, Part A***,* v. 63, p. 21-26 (2006).

55- Mejia C, Ruiz-Azuara L. Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. Pathol Oncol Res. 2008 Dec;14(4):467-72. doi: 10.1007/s12253-008-9060-x. Epub 2008 Jun 3. PMID: 18521723.

56- DEVI, C. S. et al. Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents. **Journal of Fluorescence**, v. 28, n. 5, p. 1195-1205 (2018).

57- RUIZ-AZUARA, L. 07/628,843: RE 35,458, Feb. 18 (1997). **United States Patent**, 1992.

58- CORREIA, I. et al. Evaluation of the binding of four anti-tumor Casiopeínas® to human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 175, p. 284-297 (2017).

59- ACILAN, C. et al. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 218-234 (2017).

60- ALEMÓN-MEDINA, Radamés et al. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). Cancer chemotherapy and pharmacology, v. 60, n. 2, p. 219-228, 2007.

61- GARCÍA-RAMOS, Juan Carlos et al. The mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu (II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. Biometals, v. 30, n. 1, p. 43-58, 2017.

62- Novartis (Novartis Pharmaceuticals) **(2019, March - recruiting)**. *A Phase II Trial of Tisagenlecleucel in First-line High-risk (HR) Pediatric and Young Adult Patients With B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Who Are Minimal Residual Disease*

(MRD) Positive at the End of Consolidation (EOC) Therapy. Identifier**NCT03876769**.<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03876769?term=Cassiopeia&draw=2&rank=1> Acessado em: 21 de outubro de 2020.

63- LEWIS, D. J. et al. On the interaction of copper (II) with disulfiram. **Chemical Communications**, v. 50, n. 87, p. 13334-13337 (2014).

64- The Institute of Molecular and Translational Medicine, Czech Republic **(2017, October - recruiting)**. *Phase II Open Labeled Trial of Disulfiram With Copper in Metastatic Breast Cancer*. Identifier **NCT03323346** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03323346?term=disulfiram+copper&draw=2&rank=2> Acessado em: 21 de outubro de 2020.

65- BUTCHER, Kate et al. Investigation of the key chemical structures involved in the anticancer activity of disulfiram in A549 non-small cell lung cancer cell line. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 753 (2018).

66- VAZQUEZ-AGUIRRE, A. et al. Autophagy Promotes Survival of CHP-212 Neuroblastoma Cells Treated With Casiopeínas®. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3687-3695 (2019).

67- KAKKAR, R. et al. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 351-368 (2019).

68- PRAKASH KINTHADA, M. M. S.; GUST, R. Synthesis and Characterization, Nuclease Activity Studies and Anti Cancer Studies of Au (III)-Isatin Thiosemicarbazone Complexes as Potential Anticancer Drugs. **Journal of Drug Development and Delivery**, v. 1, n. 1, p. 1001 (2018).

69- GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 678-688 (2019).

70- ZHANG, Y.Z. et al. Isatin dimers and their biological activities. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 3, p. 1900299 (2020).

71- DE MORAES, G. et al. Isatin Derivatives and Their Antiviral Properties Against Arboviruses: A Review. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 56-62, (2019).

72- SIDDIQUI, E. J. et al. Thiosemicarbazone complexes as versatile medicinal chemistry agents: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 689-703 (2019).

73- PRAJAPATI, N. P.; PATEL, H. D. Novel thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: Recent development. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 21, p. 2767-2804 (2019).

74- ERTAS, M. et al. Potent ribonucleotide reductase inhibitors: Thiazole-containing thiosemicarbazone derivatives. **Archiv der Pharmazie**, v. 352, n. 11, p. 1900033 (2019).

75- LARSEN, A. K. et al. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 2, p. 167-181 (2003).

76- MINI, S. et al. New class of Copper (II) complex derived from Isatin and Thiosemicarbazide - synthesis, spectral characterization and biological activity. **Der Pharma Chemica** (2016).

77- AMNA Q. A. et al. Synthesis of copper(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities, **Polyhedron**, v. 74, (2014).

78- HARIBABU, J. et al. Isatin based thiosemicarbazone derivatives as potential bioactive agents: Anti-oxidant and molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1110, p. 185-195 (2016).

79- BARZ, P.; FRITZ, H. P. Biochemically active ligand systems. II. Spectroscopic studies on metallic complexes of the antiviral agent isatin-3-thiosemicarbazone. **Journal of Natural Science**, v. 25, n. 2 (1970).

80- BARREIRO, E. J. L., FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos.** (Artmed, 2015)

81- PHILLIPS, M. A. et al. Has molecular docking ever brought us a medicine. Molecular Docking. **IntechOpen** Limited: London, UK, p. 141 (2018).

82- RAMPAGE. **Ramachandran Plot Analysis**. Disponível em: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>. Acesso em 21 de julho de 2019

83- SUDA, N. et al. The α4 residues of human DNA topoisomerase IIα function in enzymatic activity and anticancer drug sensitivity. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1767-1773 (2004).

84- WANG, Y. R. et al. Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt (II)-methionine coordination chemistry. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 18, p. 10861-10871 (2017).

85- WEI, H. et al. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37041-37047 (2005).

86- SACCO, A. C. S. **Mapeamento vetorial de interações eletroestáticas para biomoléculas**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

87- OLIVEIRA, B. G. The formation of the π···H, F···H and C···H hydrogen bondson the C_2H_2···(HF), C_2H_2···2 (HF) and C_2H_2···3 (HF) complexes. **Química Nova**,v. 39, n. 3, p. 320-327 (2016).

88- YADAV, A. A. et al. Structure-based design, synthesis and biological testing of piperazine-linked bis-epipodophyllotoxin etoposide analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 3542-3551 (2015).

89- JIANG, H. et al. Synthesis and biological evaluation of novel carbazole-rhodanine conjugates as topoisomerase II inhibitors**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 8, p. 1320-1323 (2018).

90- PARK, S. et al. Synthesis and biological evaluation of C1-O-substituted-3-(3-butylamino-2-hydroxy-propoxy)-xanthen-9-one as topoisomerase IIα catalytic inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 211-225 (2016).

91- WEE, X. K. et al. Synthesis and evaluation of functionalized isoindigos as antiproliferative agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 21, p. 7562-7571 (2009).

92- SILVA, T. S. **Mendonça da et al. Síntese assistida por micro-ondas de tiossemicarbazonas derivadas da isatina com potencial atividade biológica.** 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2018.

93- MONSALVE, M. S. **Síntese e caracterização de compostos de coordenação mistos de cobre com potencial atividade anti-Mycobacterium tuberculosis**. 2013. Tese (Doutorado em Química). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

94- SILVERSTEIN, R. M. et al. **Métodos espectroscópicos de identificação de compostos orgânicos.** (Editora Científica, 2012).

95 - PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. (Cengage Learning, 2010).

96- TENORIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037 (2005).

97- KLEIN, O. et al. Dynamic NMR study of the mechanisms of double, triple, and quadruple proton and deuteron transfer in cyclic hydrogen bonded solids of pyrazole derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 37, p. 11718-11732, (2004).

98- GÜNZLER, H.; GREMLICH, H .U.; **IR Spectroscopy: An introduction** (Wiley-VCH, 2002).

99- OLIVEIRA, C. G. **Síntese e caracterização de complexos de metais da primeira série do bloco d com tiossemicarbazonas para investigar seu potencial contra Mycobacterium tuberculosis.** 2013. Tese (Doutorado em Química) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

100- WILES, D. M. et al. The C= S stretching vibration in the infrared spectra of some thiosemicarbazones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 469-473 (1967).

101- **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, **Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry**, Wiley, 6th Edition. Kazuo Nakamoto.

102- LI, M. X. et al. Mn (II), Co (II) and Zn (II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antitumor comparison. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 3169-3177, (2010).

103- FERNANDES, A. G. A. **Quelato-complexos de rênio e tecnécio com potencial aplicação medicinal**. 2012. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

104- SOCRATES, G.; **Infrared Characteristic Group Frequencies**, 2nd ed. (John Wiley & Sons, 1994).

105- LI, M. X. et al. Synthesis, crystal structures and biological activities of 2-acetylpyridine *N*-(4)-cyclohexylthiosemicarbazone and its manganese (II) and nickel (II) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 13, n. 12, p. 1572-1575 (2010).

106- GALLO, R. D. C. **Síntese e caracterização espectroscópica de complexos de prata e trifenilfosfina com ligantes espaçadores contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio.** 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

107- EDWARDS, H. G. M.; JOHNSON, A. F.; LEWIS, I. R. A vibrational spectroscopic study of tris triphenyl phosphine rhodium (I) chloride**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 49, n. 5-6, p. 707-714 (1993).

108 - NIST Livro de Química na Web, SRD 69. Phosphine, triphenyl-. **National Institute of Standards and Technology.** Disponível em: webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=triphenylphosphine&Units=SI&cIR=on Acesso em: 05 de fevereiro de 2021.

109 - BARDAKÇI, T.; KUMRU, M.; GÜNER, S. Molecular structure, vibrational and EPR spectra of Cu (II) chloride complex of 4-amino-1-methylbenzene combined with quantum chemical calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1054, p. 76-82 (2013).

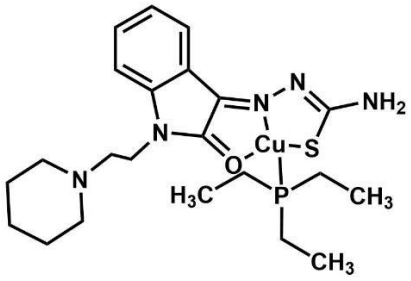
110 - AKALIN, E.; AKYUZ, S. FT-IR and Raman spectroscopic and DFT theoretical investigations on Zn (II) halide complexes of 2-aminopyrimidine. **Vibrational Spectroscopy**, v. 53, n. 1, p. 140-145 (2010).

111- WinChembase - TETRAMETHYLAMMONIUM HEXAFLUOROPHOSPHATE(558-32-7) IR1 **Chemical Book**, 2021. Disponível em: www.chemicalbook.com/SpectrumEN_558-32-7_IR1.htm Acesso em: 05 de fevereiro de 2021.

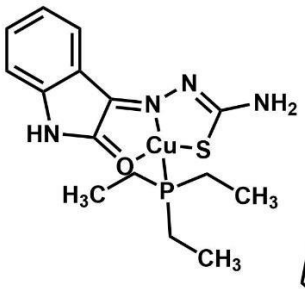
112- PEARSON, Ralph G. Ácidos e bases duros e moles. **Journal of the American Chemical Society** , v. 85, n. 22, p. 3533-3539 (1963).

5) Anexos

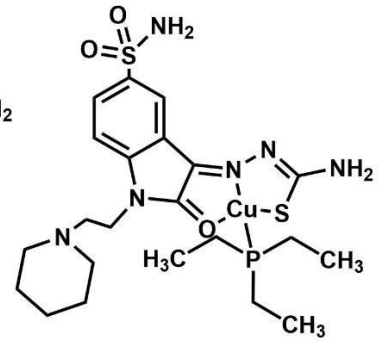
9.1) Anexo 1: Estruturas dos 180 complexos planejados (17-193)



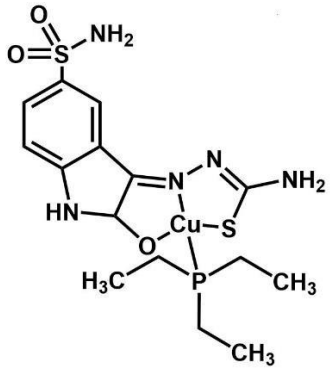
1A_2A_3A_4A (17)



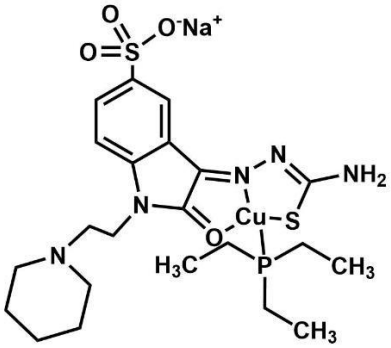
1A_2C_3A_4A (18)



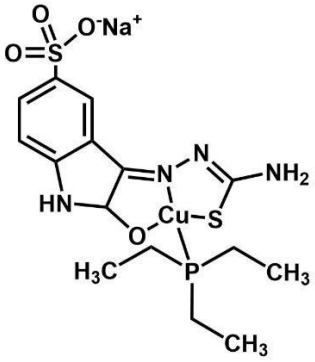
1B_2A_3A_4A (19)



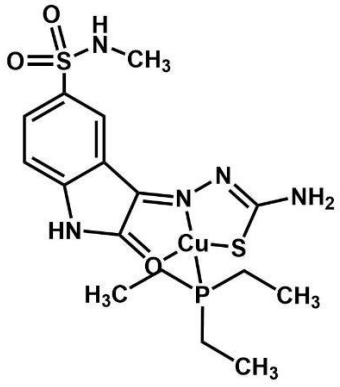
1B_2C_3A_4A (20)



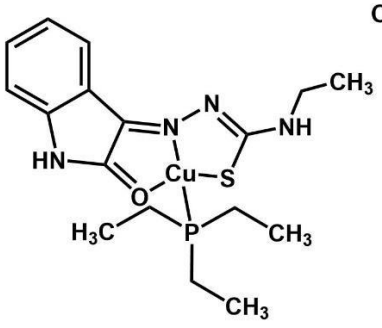
1C_2A_3A_4A (21)



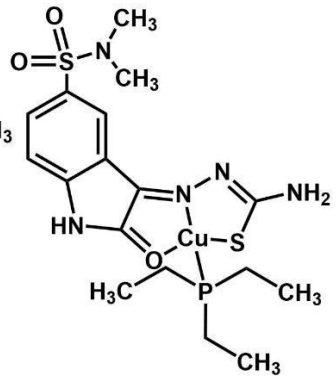
1C_2C_3A_4A (22)



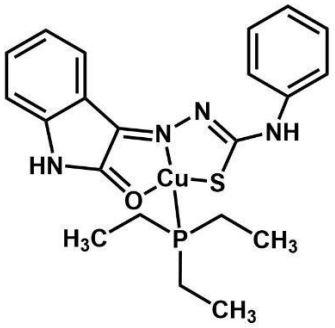
1C_2C_3A_4A (23)



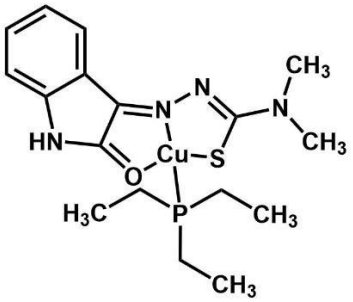
1A_2C_3C_4A (24)



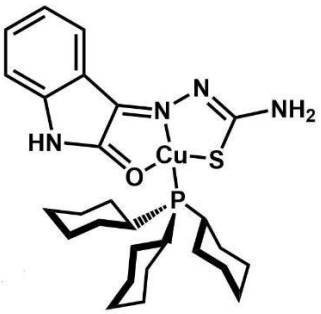
1D_2C_3A_4A (25)



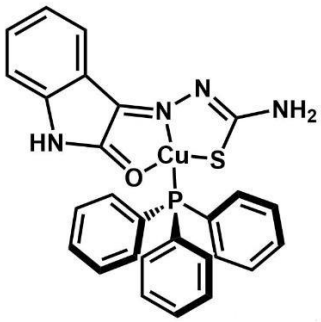
1A_2C_3D_4A (26)



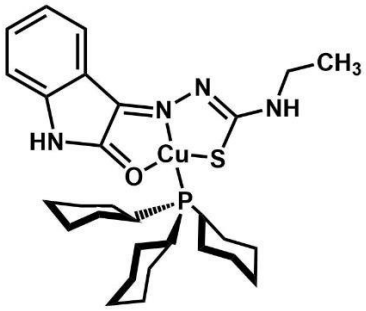
1E_2C_3B_4A (27)



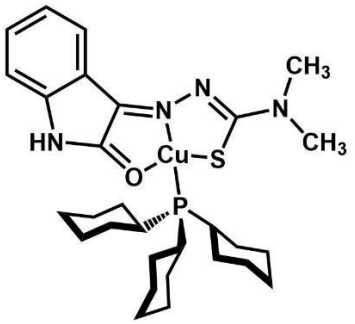
1A_2C_3A_4B (28)



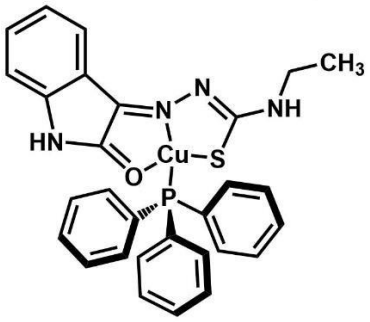
1A_2C_3A_4C (29)



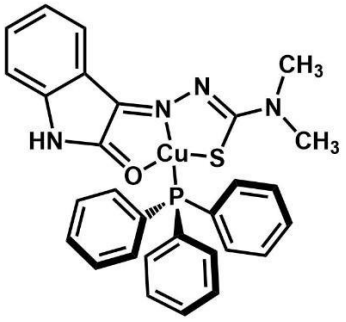
1A_2C_3C_4B (30)



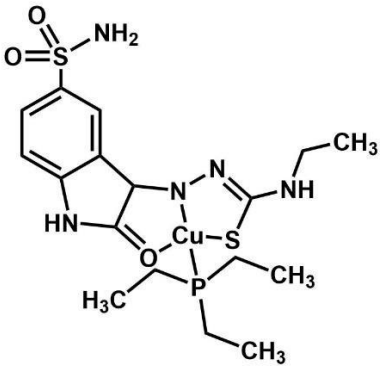
1A_2C_3B_4B (31)



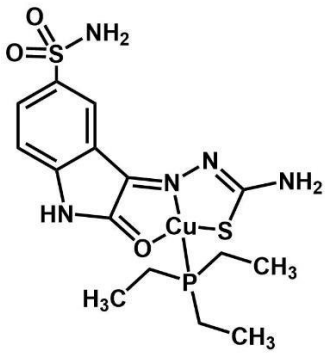
1A_2C_3C_4C (32)



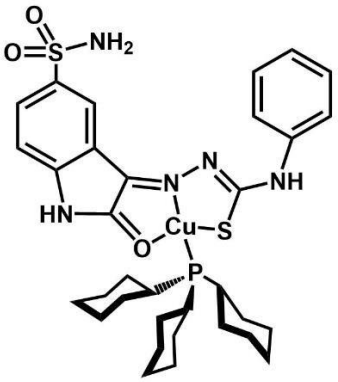
1A_2C_3B_4C (33)



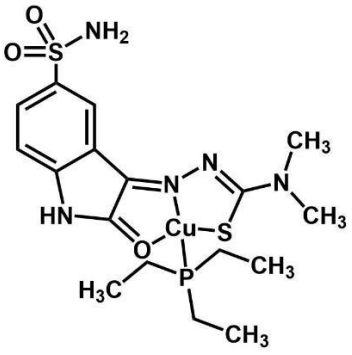
1B_2C_3C_4A (34)



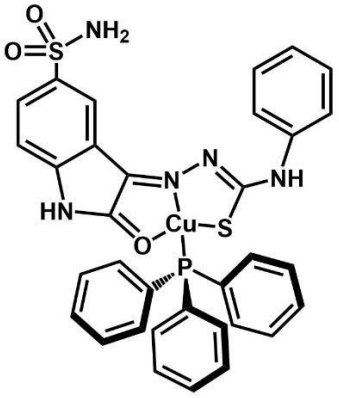
1B_2C_3A_4A (35)



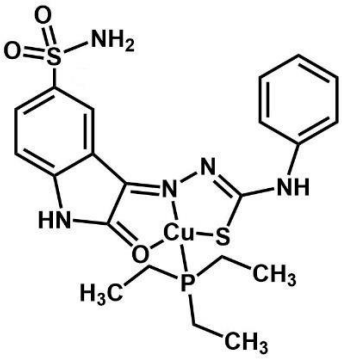
1B_2C_3D_4B (36)



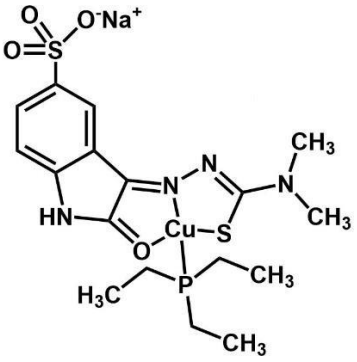
1B_2C_3B_4A (37)



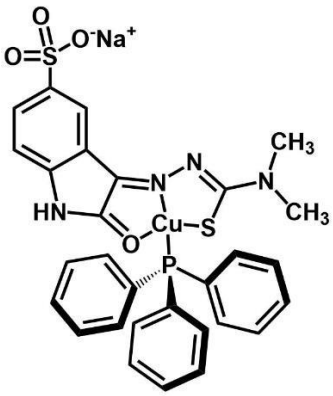
1B_2C_3D_4C (38)



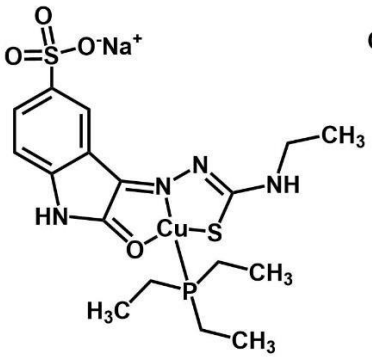
1B_2C_3D_4A (39)



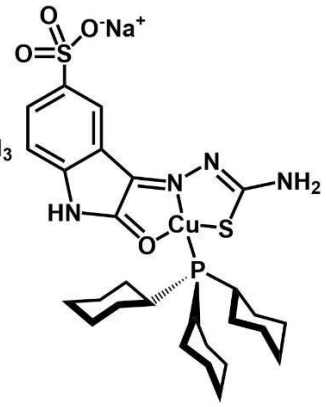
1C_2C_3D_4A (40)



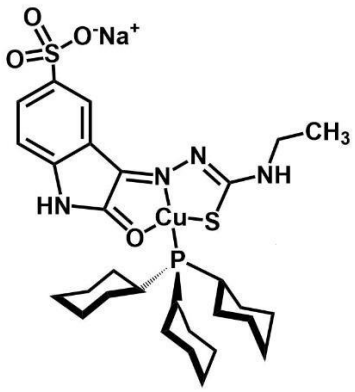
1C_2C_3B_4C (41)



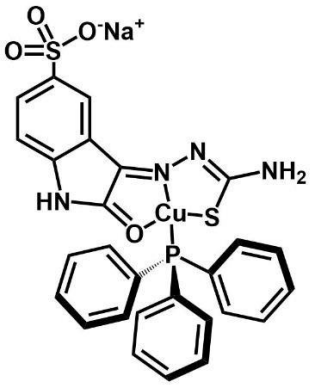
1C_2C_3C_4A (42)



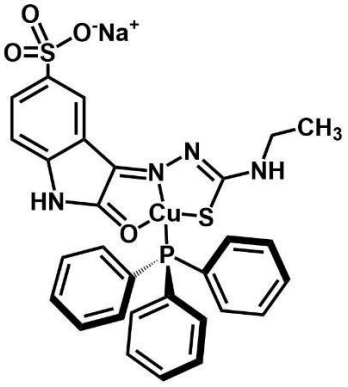
1C_2C_3A_4B (43)



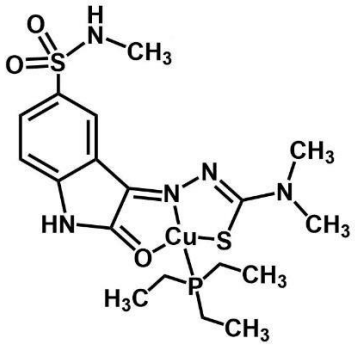
1C_2C_3C_4B (44)



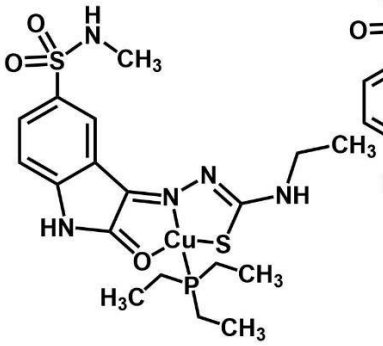
1C_2C_3A_4C (45)



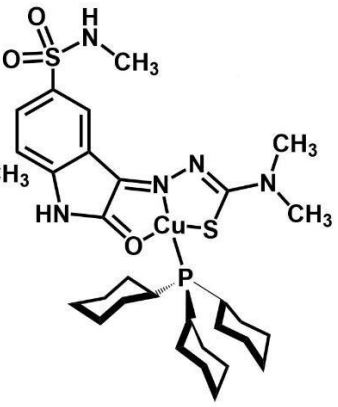
1C_2C_3C_4C (46)



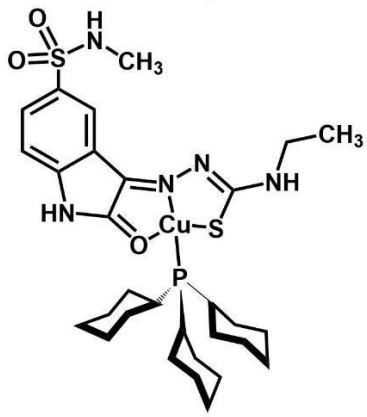
1D_2C_3B_4A (47)



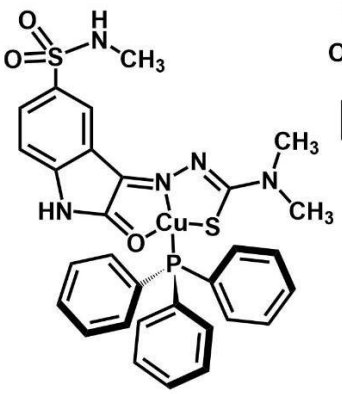
1D_2C_3C_4A (48)



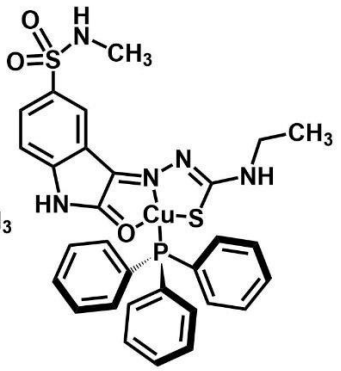
1D_2C_3B_4B (49)



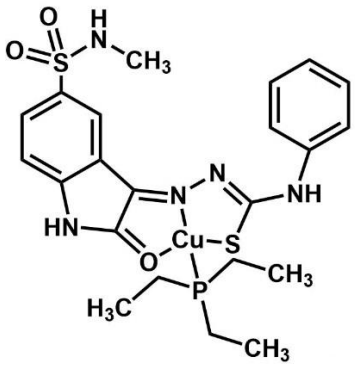
1D_2C_3C_4B (50)



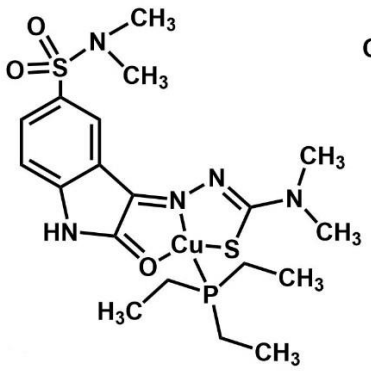
1D_2C_3B_4C (51)



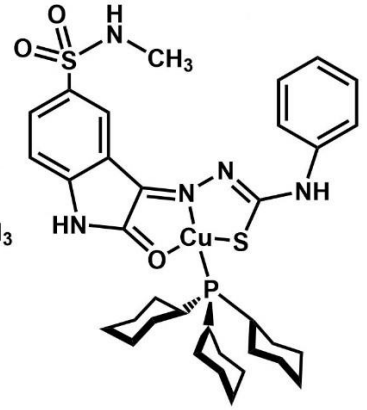
1D_2C_3C_4C (52)



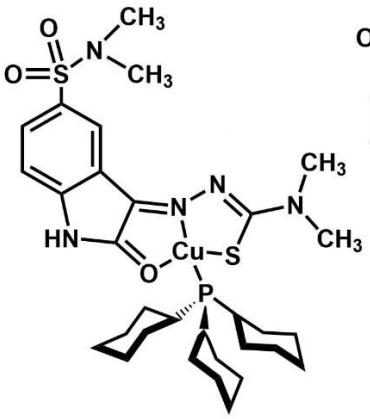
1D_2C_3D_4A (53)



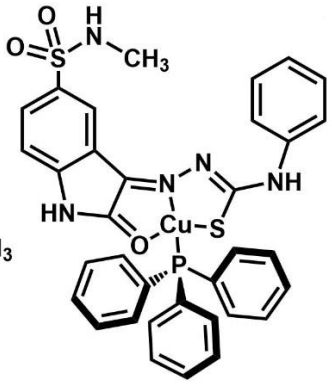
1E_2C_3B_4A (54)



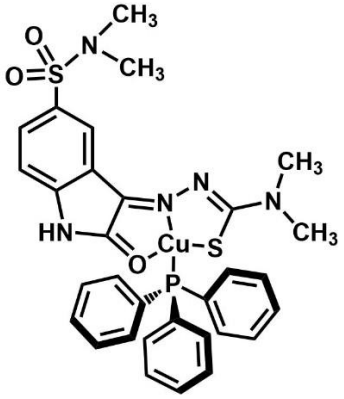
1D_2C_3D_4B (55)



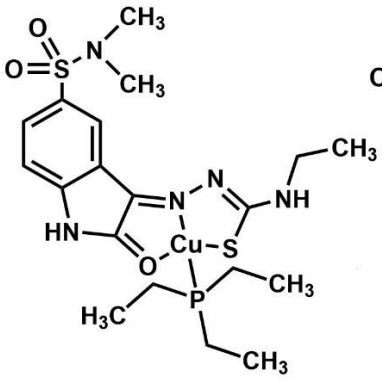
1E_2C_3B_4B (56)



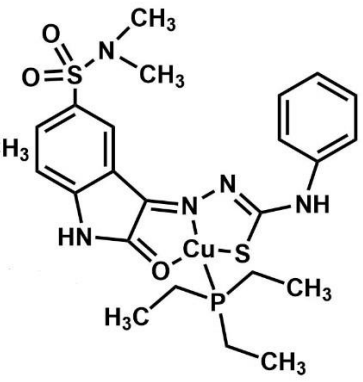
1D_2C_3D_4C (57)



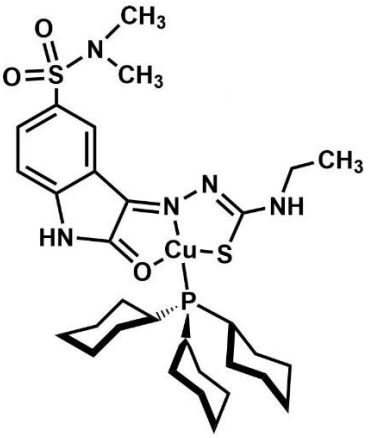
1E_2C_3B_4C (58)



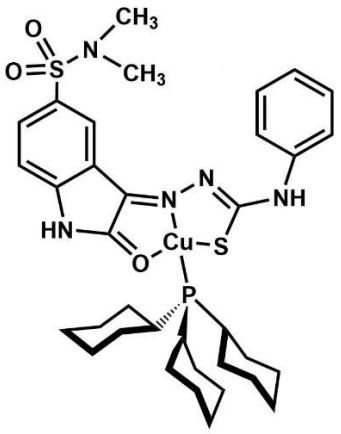
1E_2C_3C_4A (59)



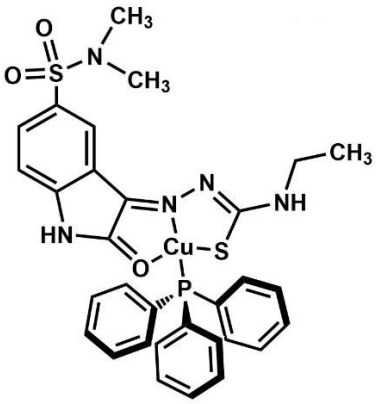
1E_2C_3D_4A (60)



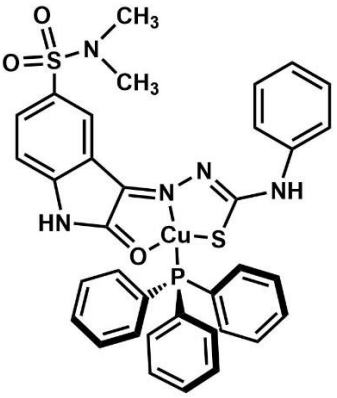
1E_2C_3C_4B (61)



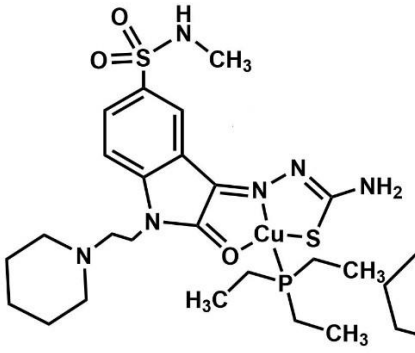
1E_2C_3D_4B (62)



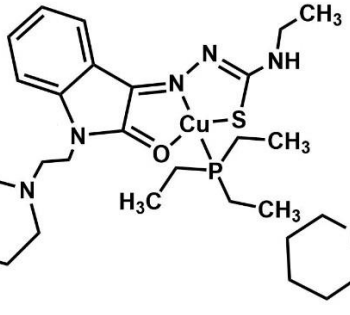
1E_2C_3C_4C (63)



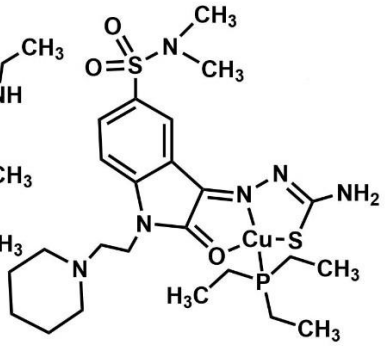
1E_2C_3D_4C (64)



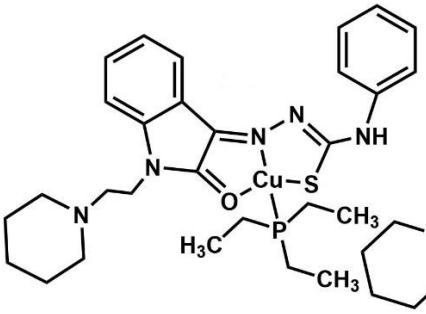
1D_2A_3A_4A (65)



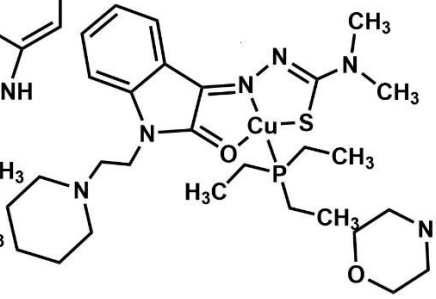
1A_2A_3C_4A (66)



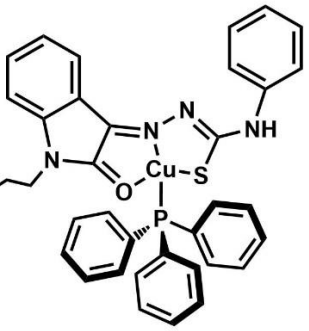
1E_2A_3A_4A (67)



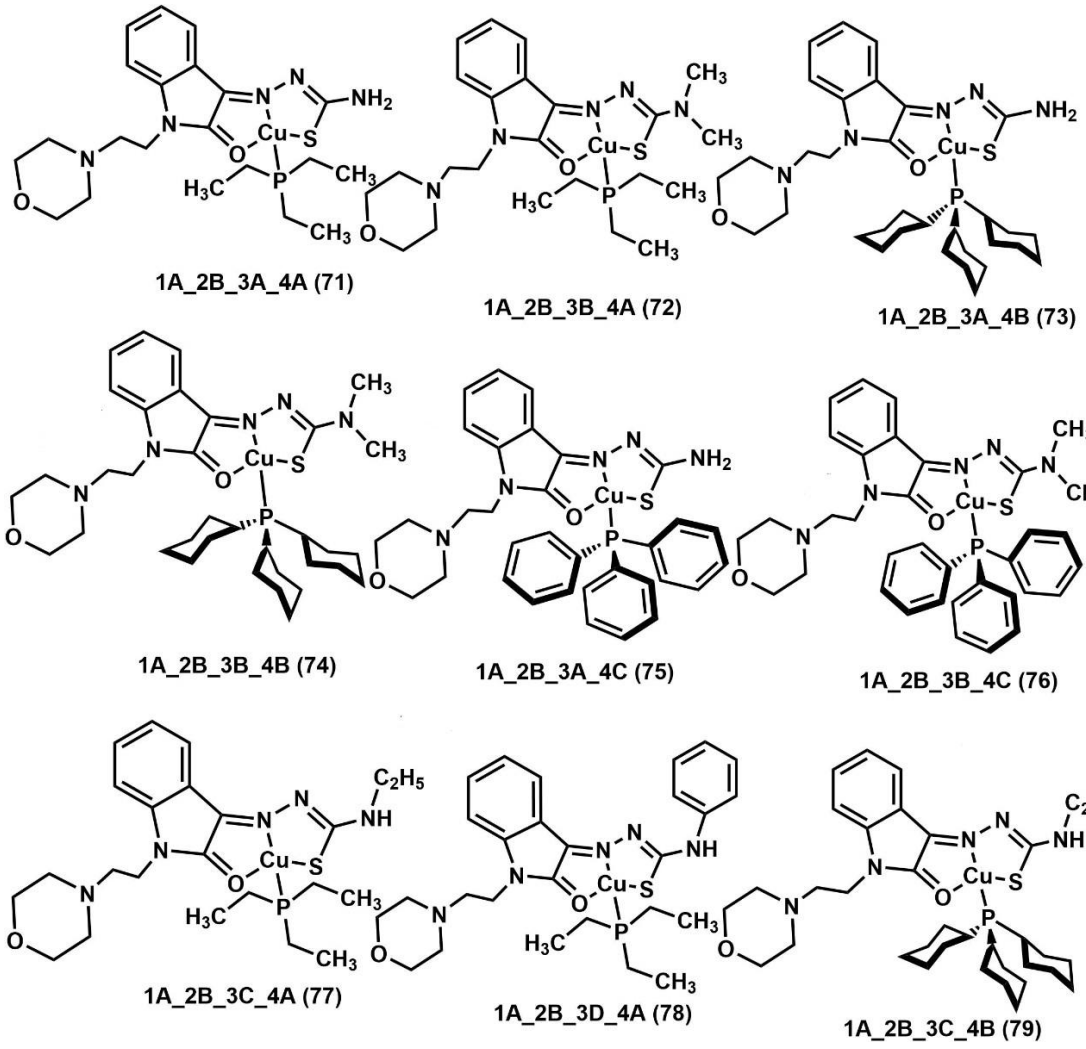
1A_2A_3D_4A (68)

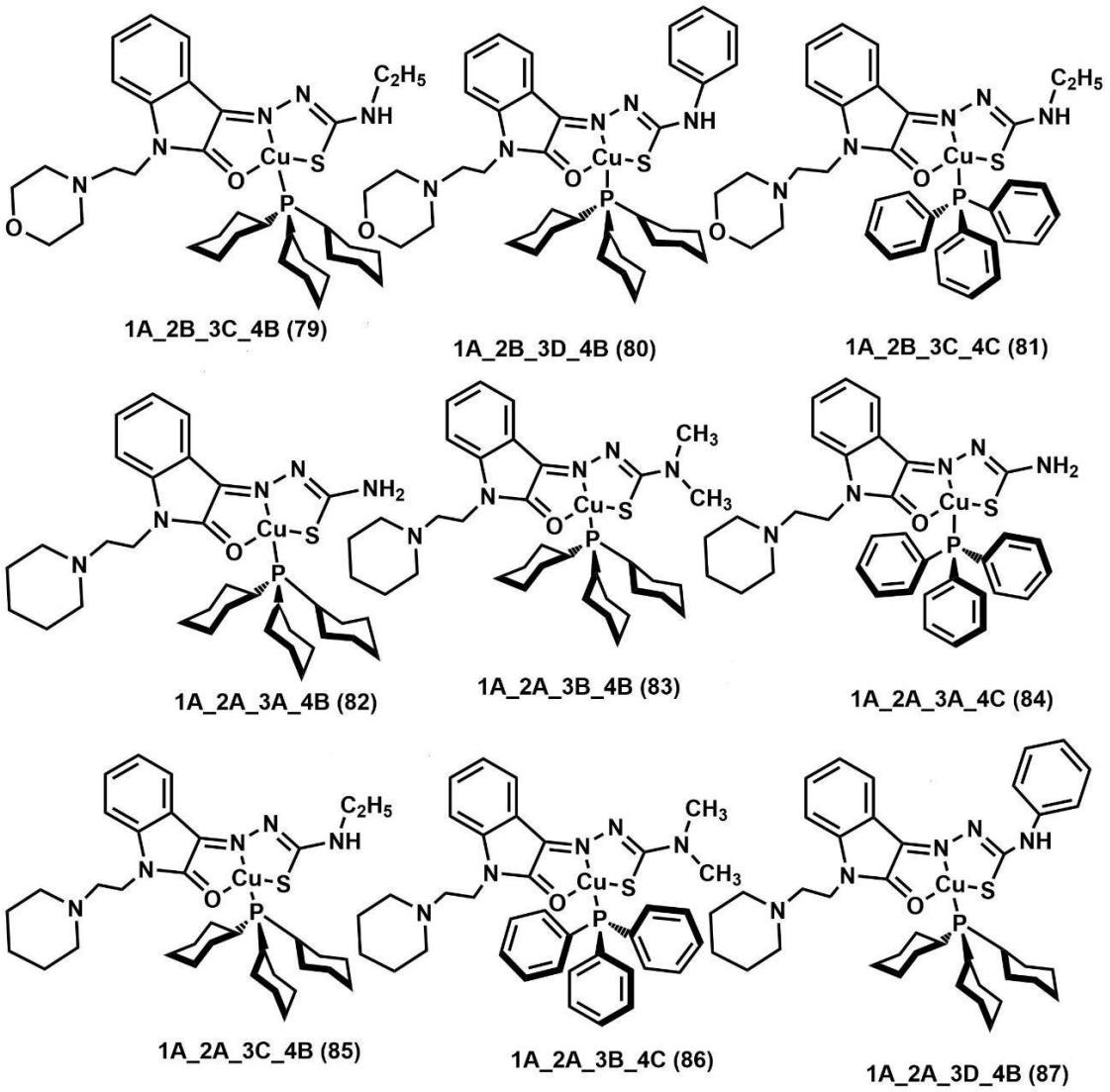


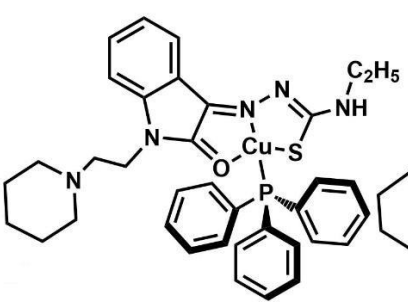
1A_2A_3B_4A (69)



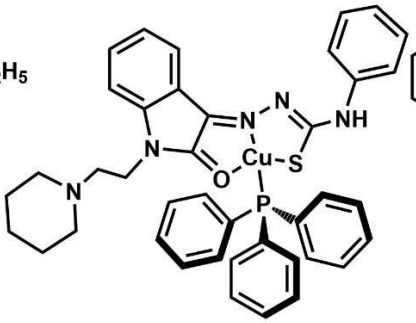
1A_2B_3D_4C (70)


1A_2B_3A_4A (71)
1A_2B_3B_4A (72)
1A_2B_3A_4B (73)
1A_2B_3B_4B (74)
1A_2B_3A_4C (75)
1A_2B_3B_4C (76)
1A_2B_3C_4A (77)
1A_2B_3D_4A (78)
1A_2B_3C_4B (79)

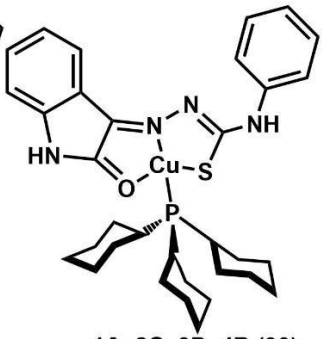

1A_2B_3C_4B (79)
1A_2B_3D_4B (80)
1A_2B_3C_4C (81)
1A_2A_3A_4B (82)
1A_2A_3B_4B (83)
1A_2A_3A_4C (84)
1A_2A_3C_4B (85)
1A_2A_3B_4C (86)
1A_2A_3D_4B (87)



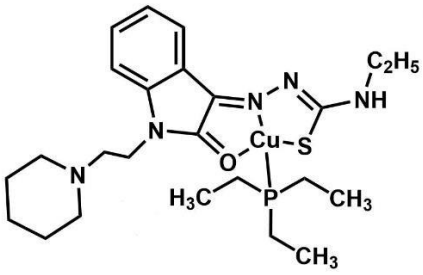
1A_2A_3C_4C (88)



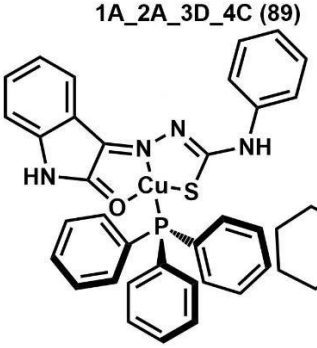
1A_2A_3D_4C (89)



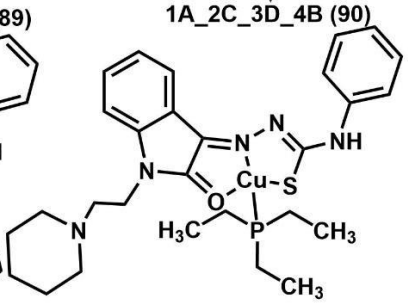
1A_2C_3D_4B (90)



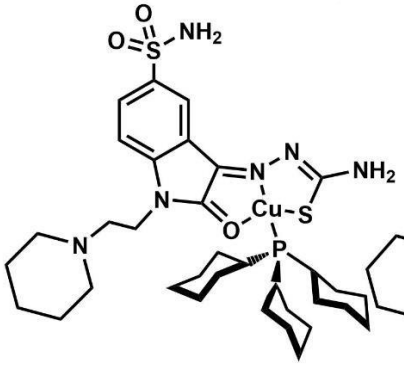
1A_2A_3C_4A (91)



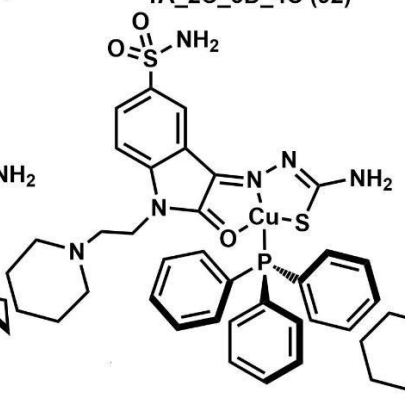
1A_2C_3D_4C (92)



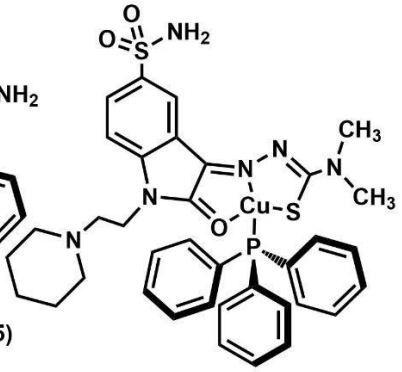
1A_2A_3D_4A (93)



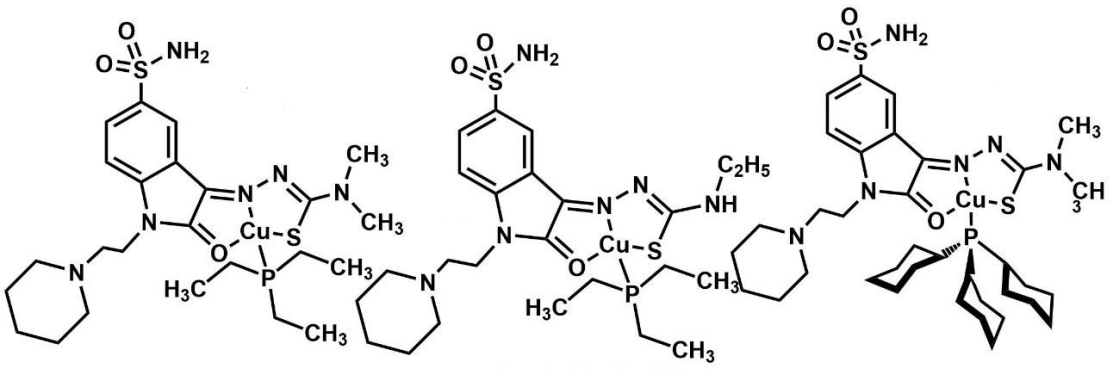
1B_2A_3A_4B (94)



1B_2A_3A_4C (95)



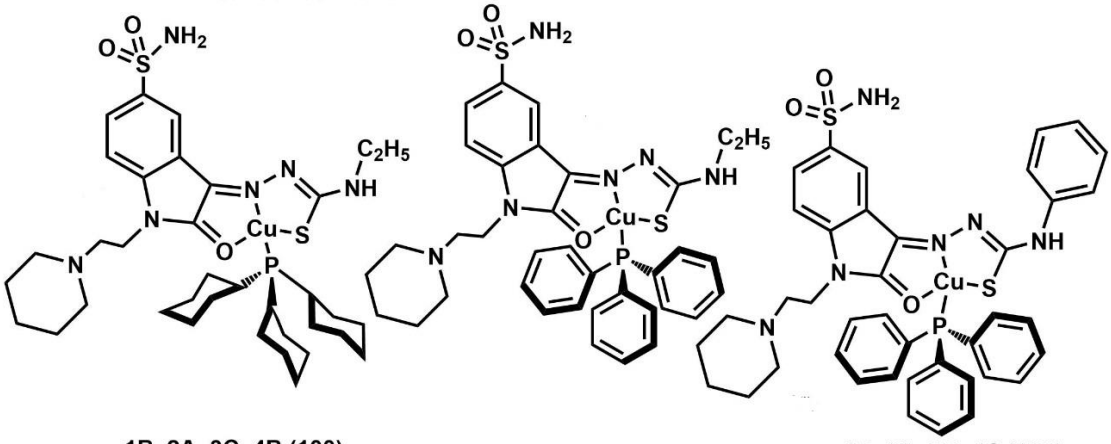
1B_2A_3B_4C (96)



1B_2A_3B_4A (97)

1B_2A_3C_4A (98)

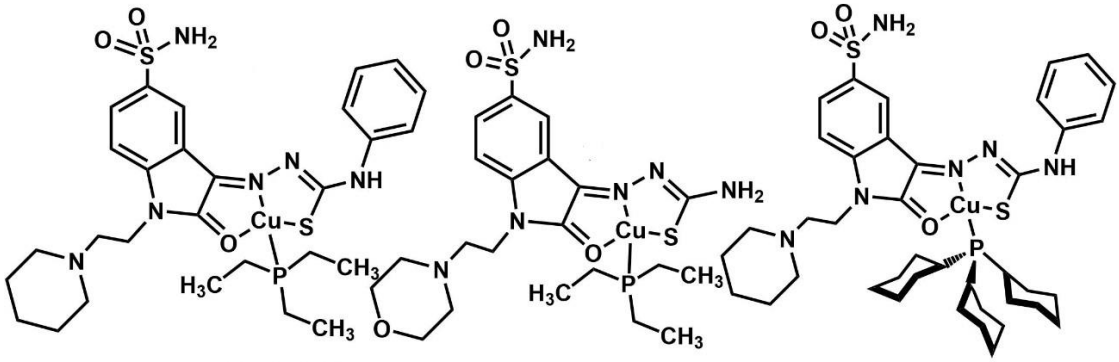
1B_2A_3B_4B (99)



1B_2A_3C_4B (100)

1B_2A_3C_4C (101)

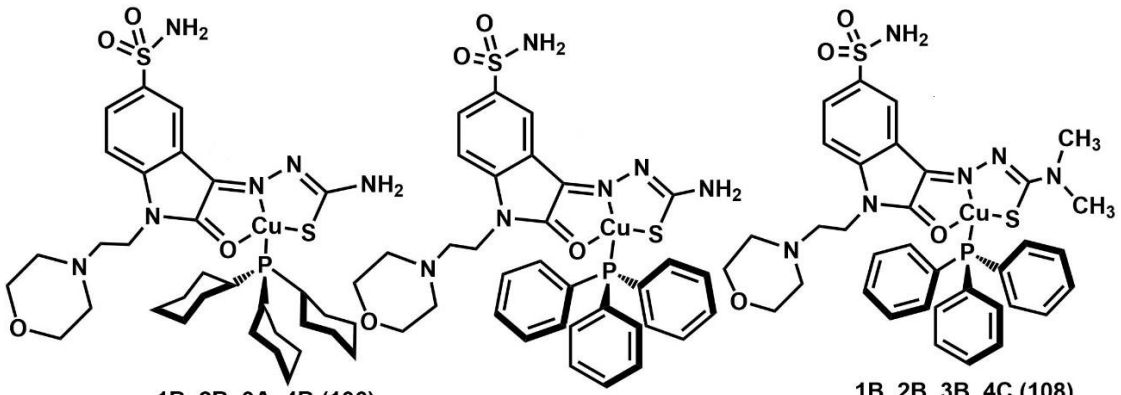
1B_2A_3D_4C (102)



1B_2A_3D_4A (103)

1B_2B_3A_4A (104)

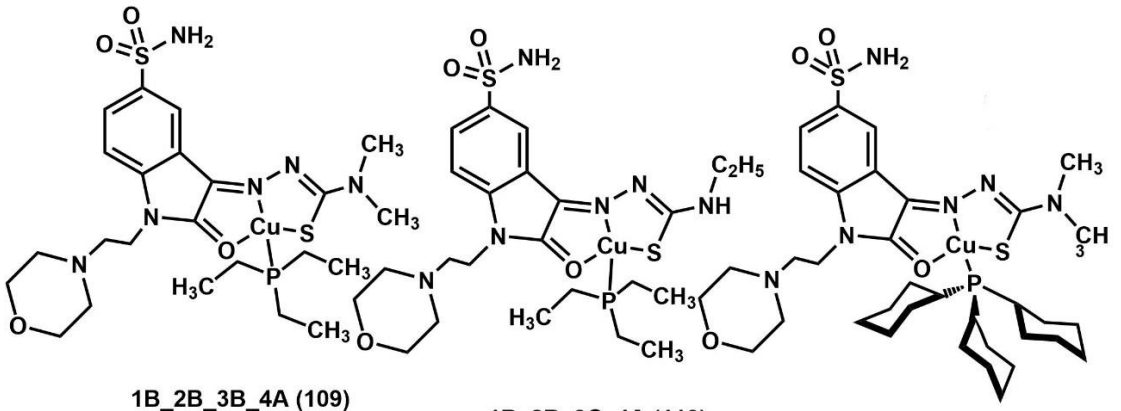
1B_2A_3D_4B (105)



1B_2B_3A_4B (106)

1B_2B_3A_4C (107)

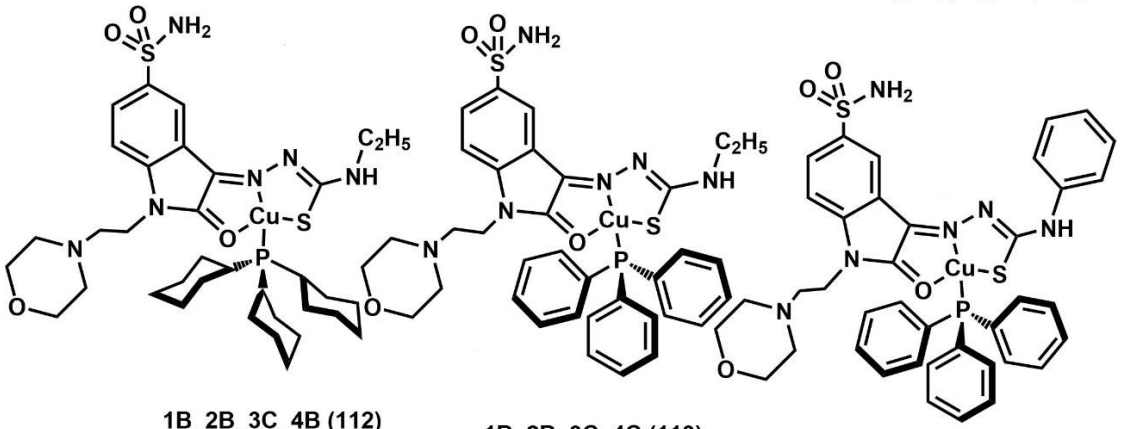
1B_2B_3B_4C (108)



1B_2B_3B_4A (109)

1B_2B_3C_4A (110)

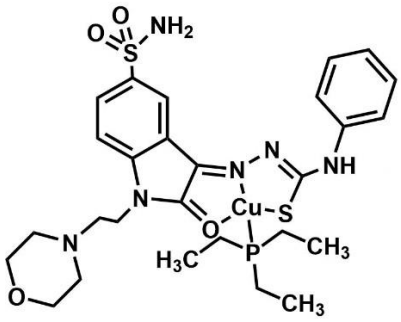
1B_2B_3B_4B (111)



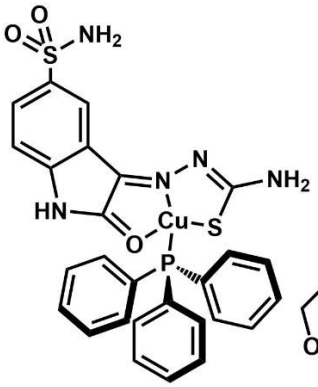
1B_2B_3C_4B (112)

1B_2B_3C_4C (113)

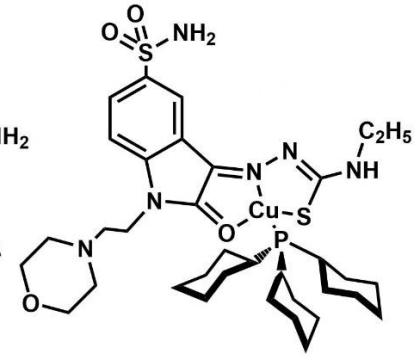
1B_2B_3D_4C (114)



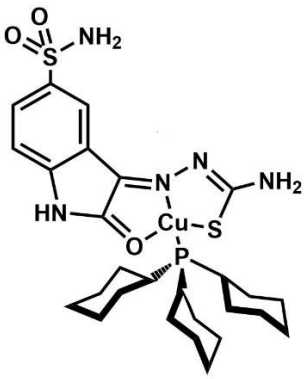
1B_2B_3D_4A (115)



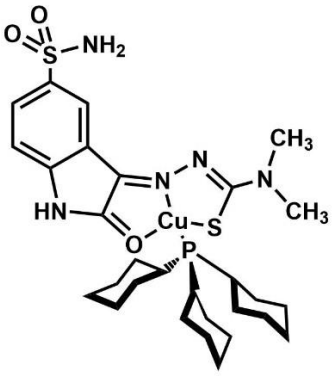
1B_2C_3A_4C (116)



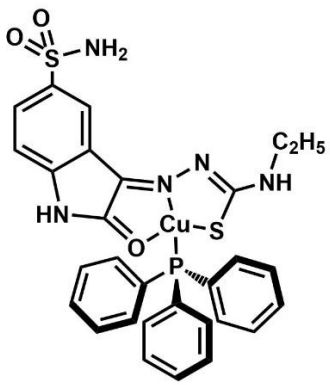
1B_2B_3D_4B (117)



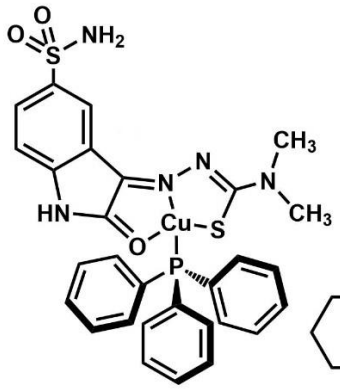
1B_2C_3A_4B (118)



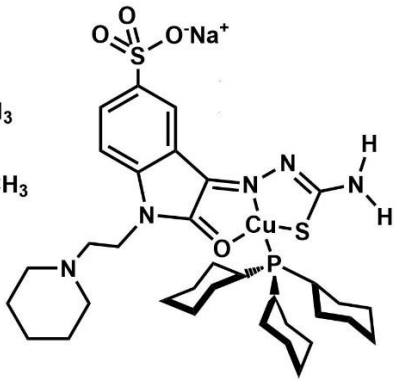
1B_2C_3B_4B (119)



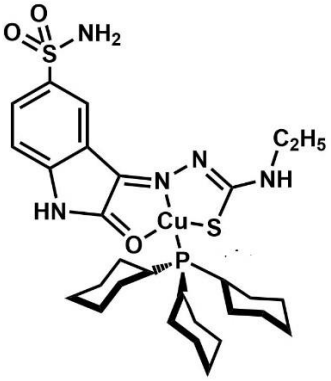
1B_2C_3C_4C (120)



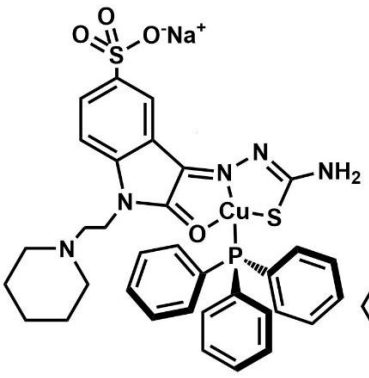
1B_2C_3B_4C (121)



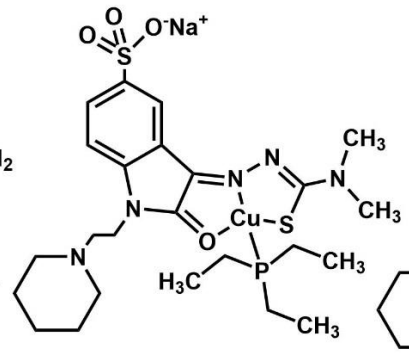
1C_2A_3A_4B (122)



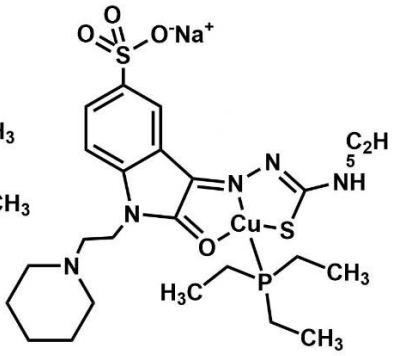
1B_2C_3C_4B (123)



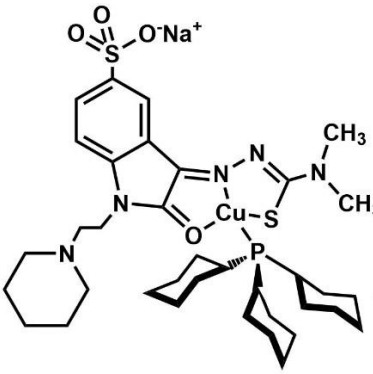
1C_2A_3A_4C (124)



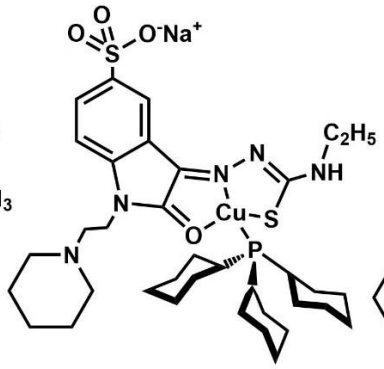
1C_2A_3B_4A (125)



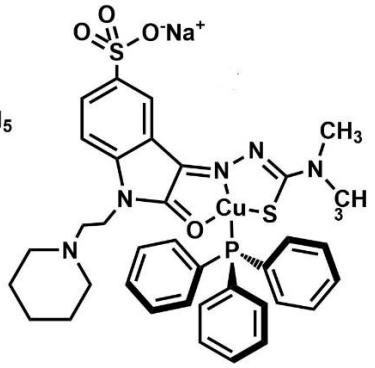
1C_2A_3C_4A (126)



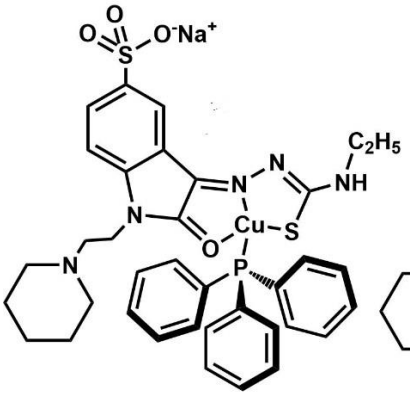
1C_2A_3B_4B (127)



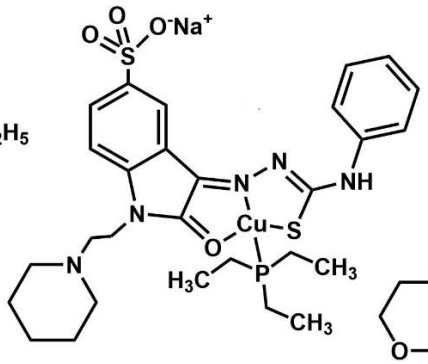
1C_2A_3C_4B (128)



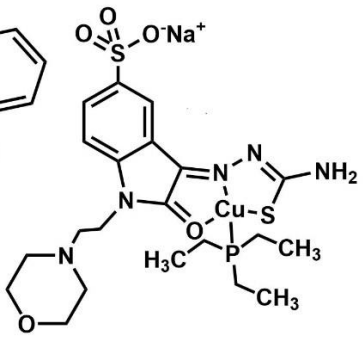
1C_2A_3B_4C (129)



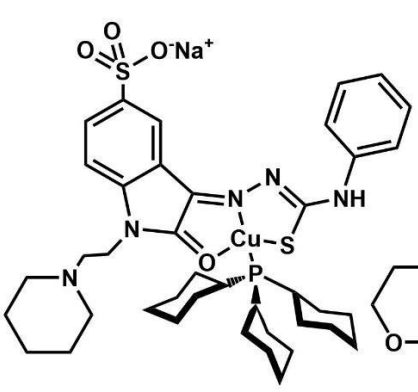
1C_2A_3C_4C (130)



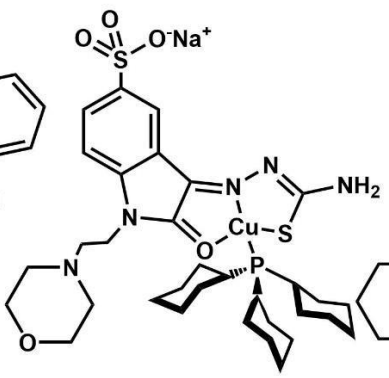
1C_2A_3D_4A (131)



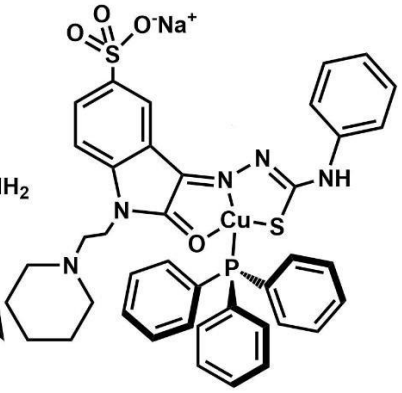
1C_2B_3A_4A (132)



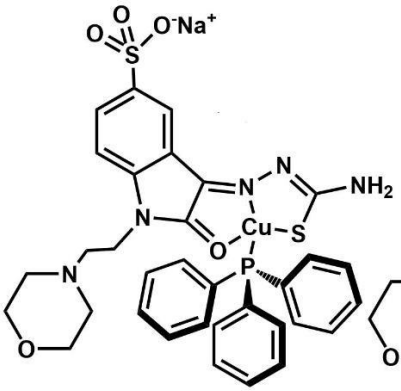
1C_2A_3D_4B (133)



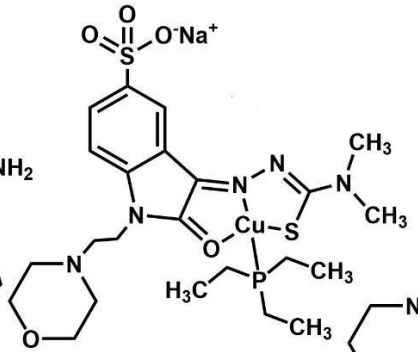
1C_2B_3A_4B (134)



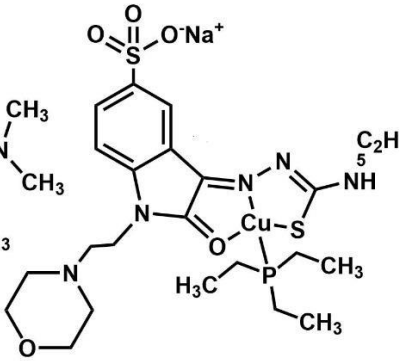
1C_2A_3D_4C (135)



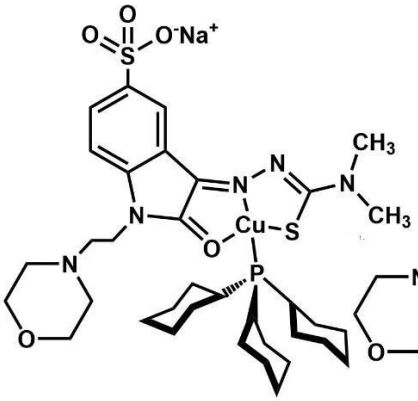
1C_2B_3A_4C (136)



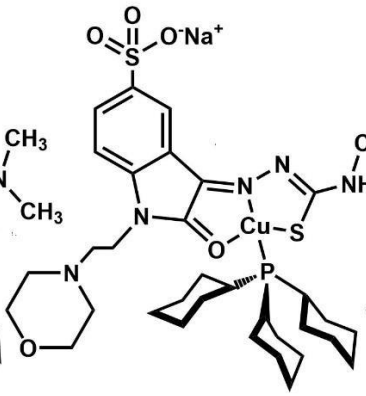
1C_2B_3B_4A (137)



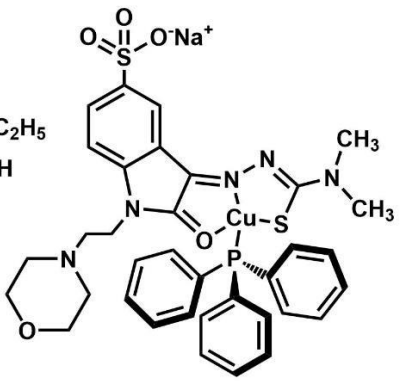
1C_2B_3C_4A (138)



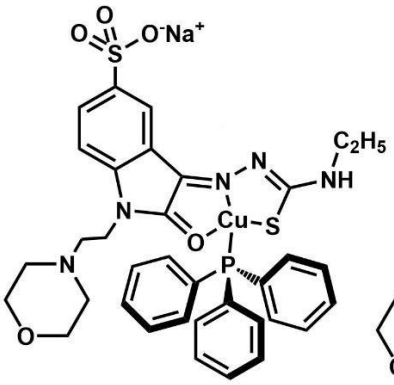
1C_2B_3B_4B (139)



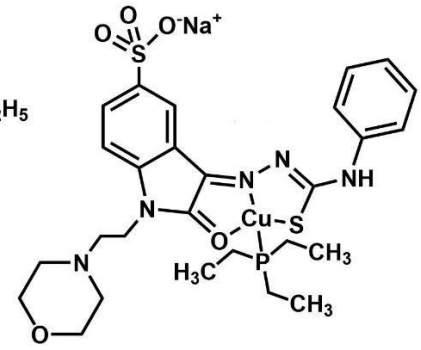
1C_2B_3C_4B (140)



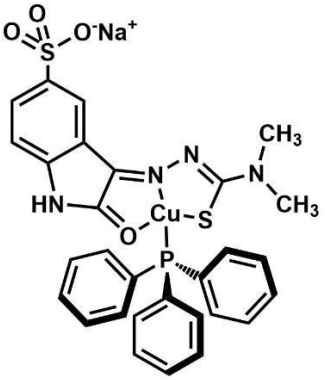
1C_2B_3B_4C (141)



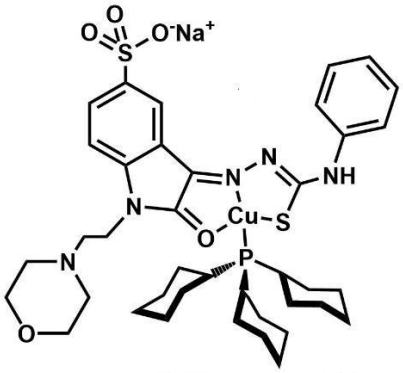
1C_2B_3C_4C (142)



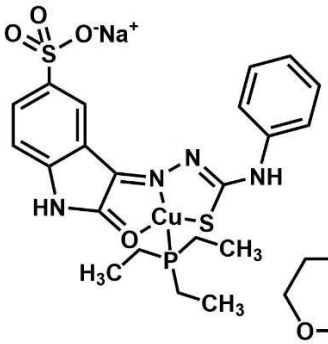
1C_2B_3D_4A (143)



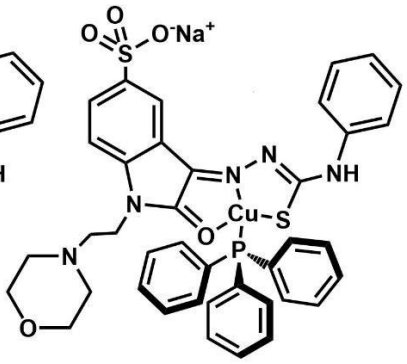
1C_2C_3B_4C (144)



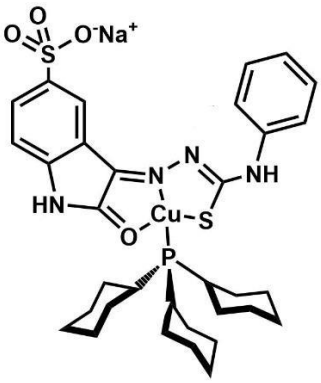
1C_2B_3D_4B (145)



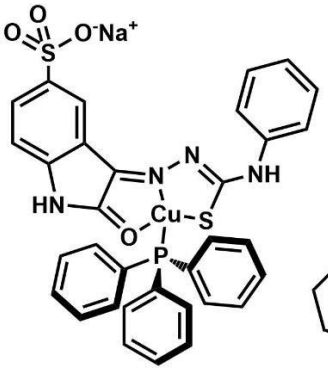
1C_2C_3D_4A (146)



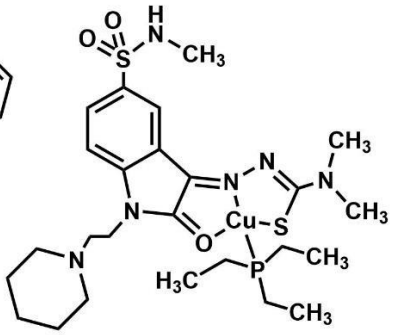
1C_2B_3D_4C (147)



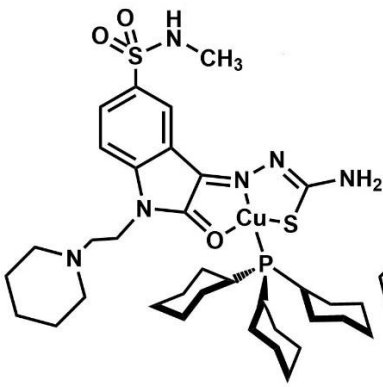
1C_2C_3D_4B (148)



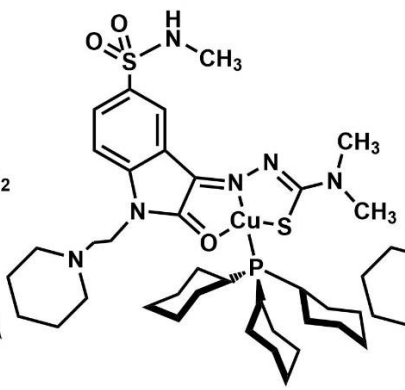
1C_2C_3D_4C (149)



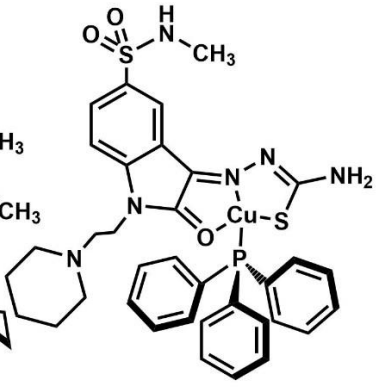
1D_2A_3B_4A (150)



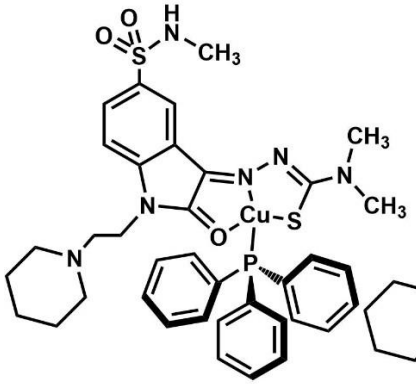
1D_2A_3A_4B (151)



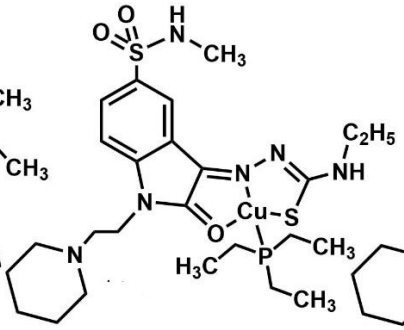
1D_2A_3B_4B (152)



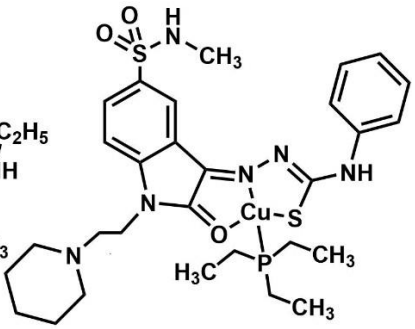
1D_2A_3A_4C (153)



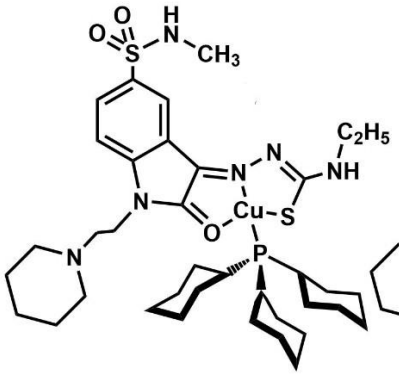
1D_2A_3B_4C (154)



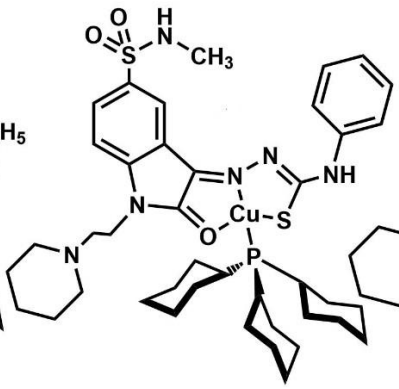
1D_2A_3C_4A (155)



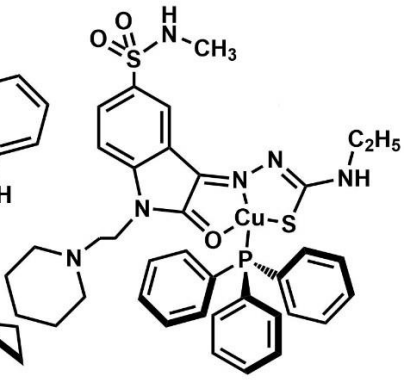
1D_2A_3D_4A (156)



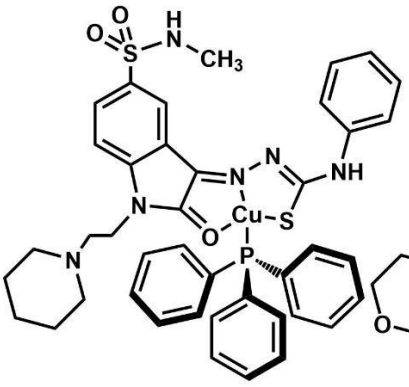
1D_2A_3C_4B (157)



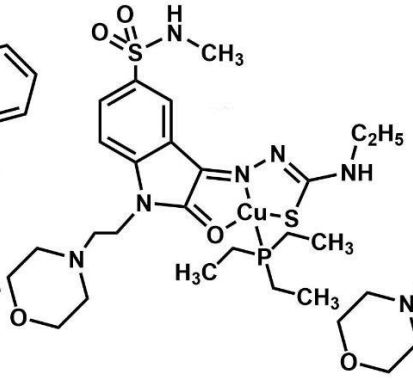
1D_2A_3D_4B (158)



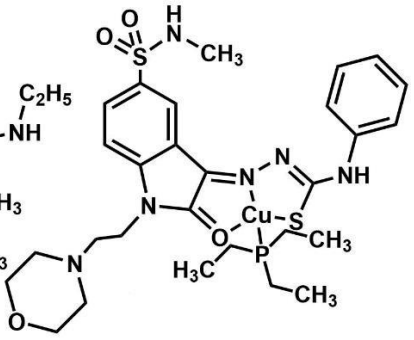
1D_2A_3C_4C (159)



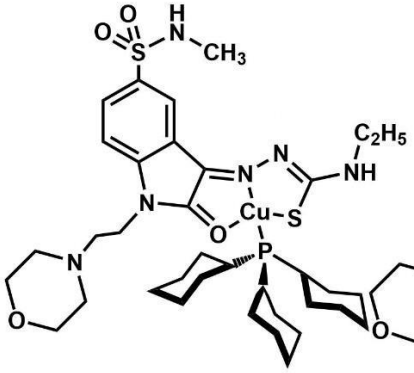
1D_2A_3D_4C (160)



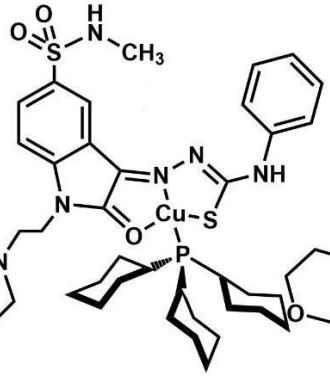
1D_2B_3C_4A (161)



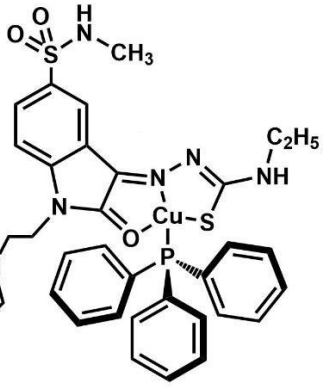
1D_2B_3D_4A (162)



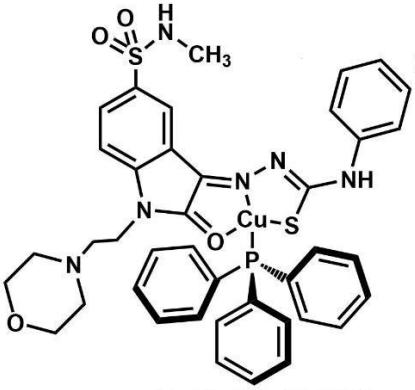
1D_2B_3C_4B (163)



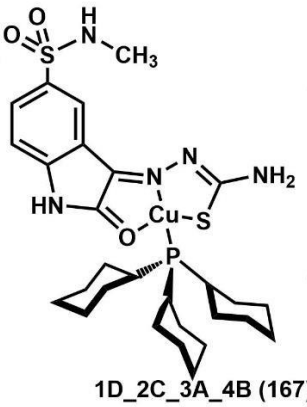
1D_2B_3D_4B (164)



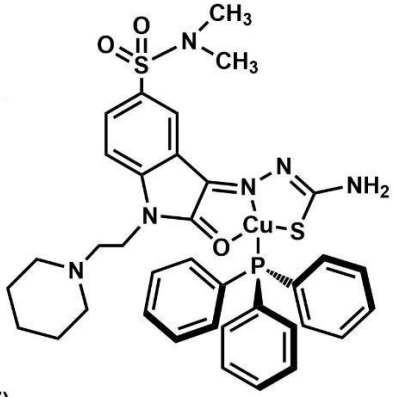
1D_2B_3C_4C (165)



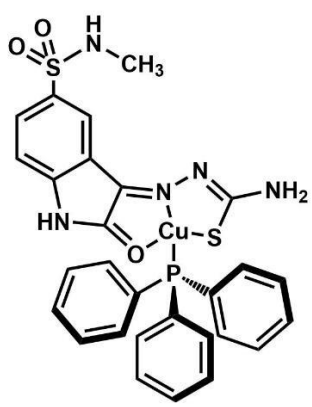
1D_2B_3D_4C (166)



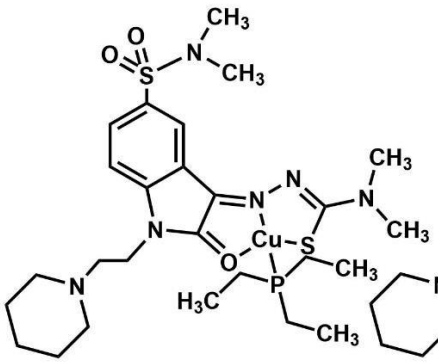
1D_2C_3A_4B (167)



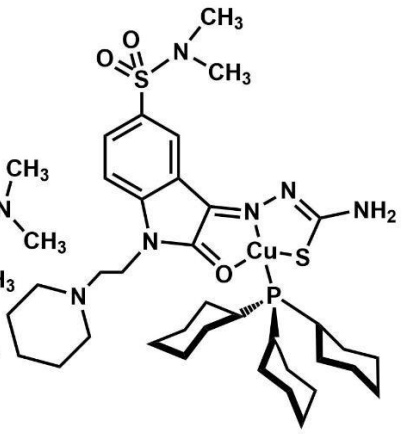
1E_2A_3A_4C (168)



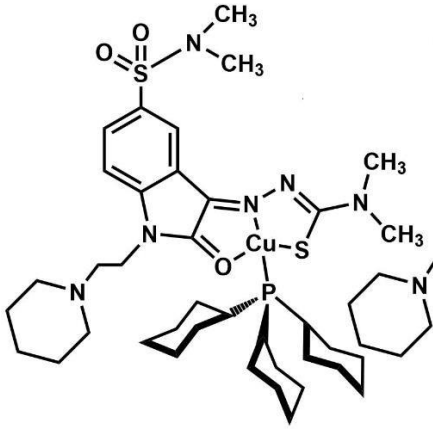
1D_2C_3A_4C (169)



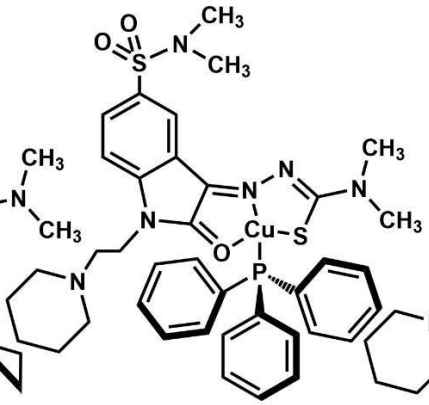
1E_2A_3B_4A (170)



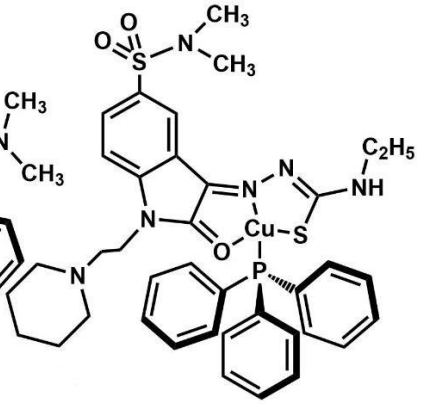
1E_2A_3A_4B (171)



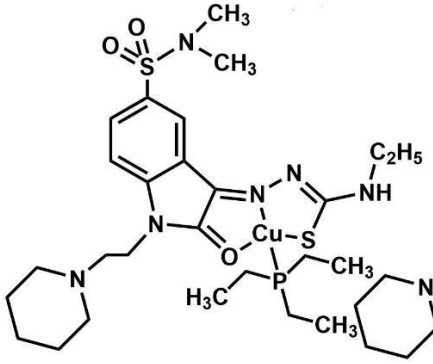
1E_2A_3B_4B (172)



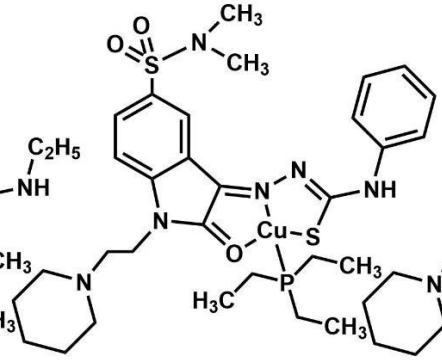
1E_2A_3B_4C (173)



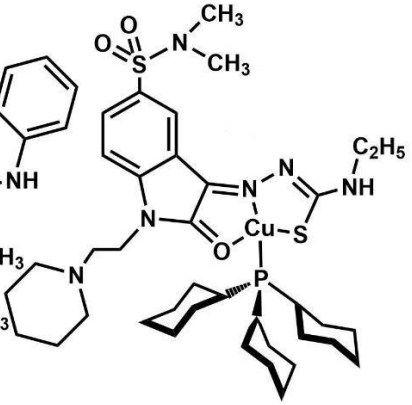
1E_2A_3C_4C (174)



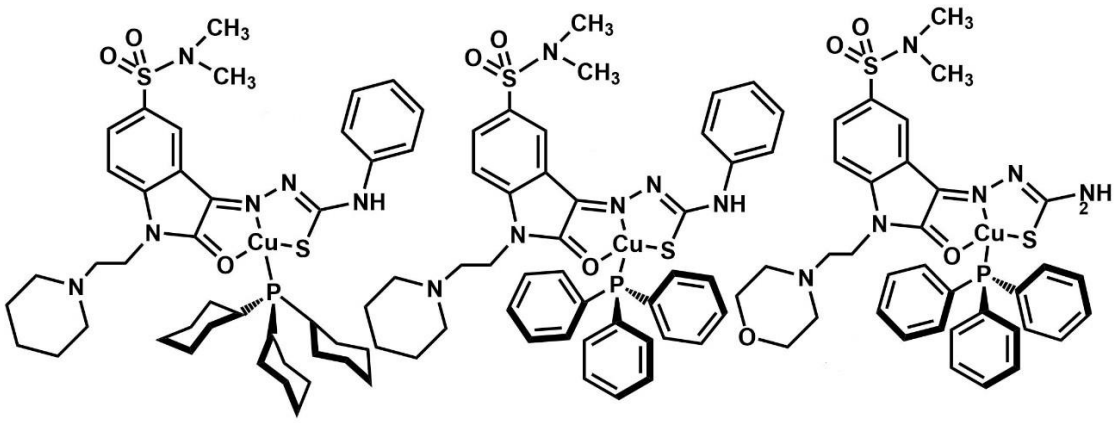
1E_2A_3C_4A (175)



1E_2A_3D_4A (176)



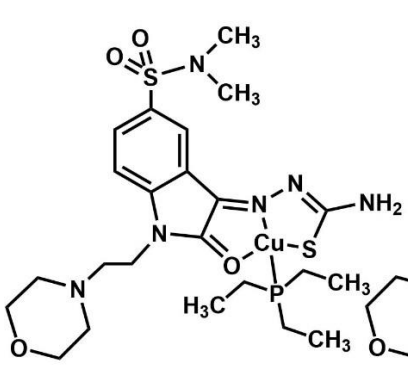
1E_2A_3C_4B (177)



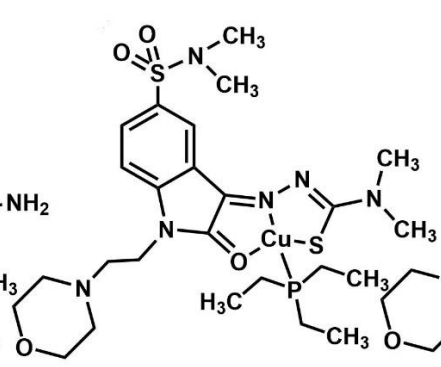
1E_2A_3D_4B (178)

1E_2A_3D_4C (179)

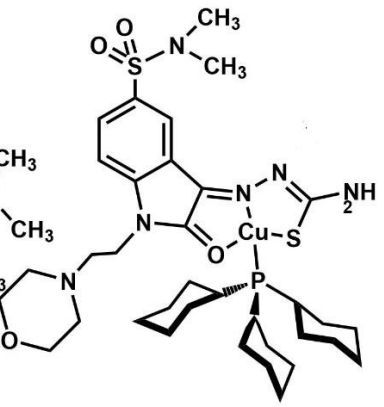
1E_2B_3A_4C (180)



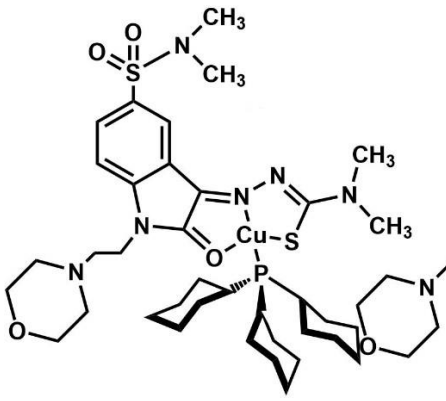
1E_2B_3A_4A (181)



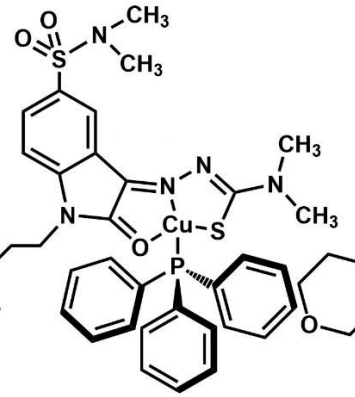
1E_2B_3B_4A (182)



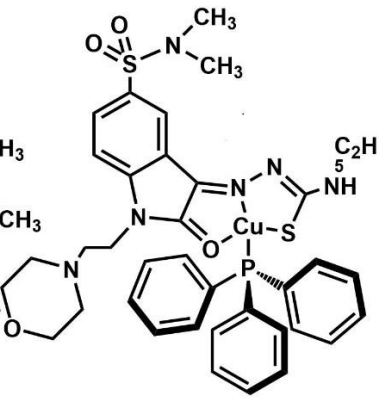
1E_2B_3A_4B (183)



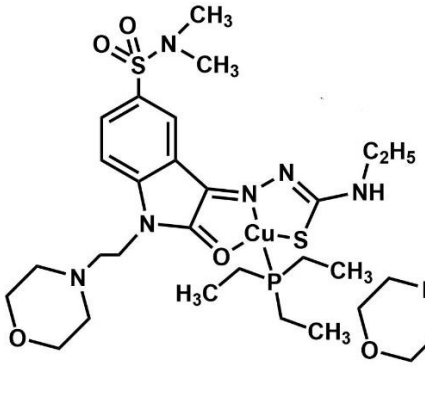
1E_2B_3B_4B (184)



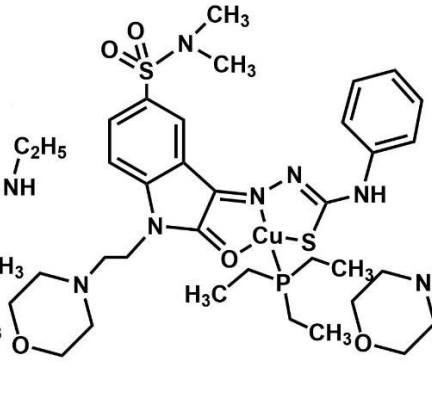
1E_2B_3B_4C (185)



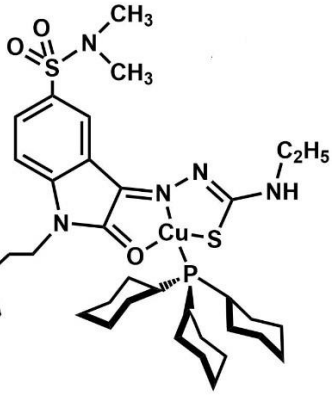
1E_2B_3C_4C (186)



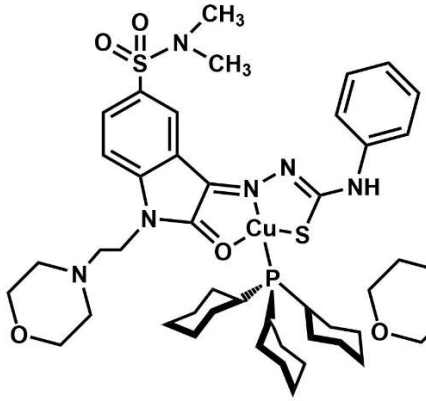
1E_2B_3C_4A (187)



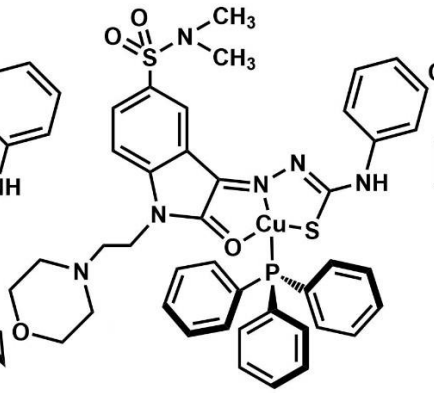
1E_2B_3D_4A (188)



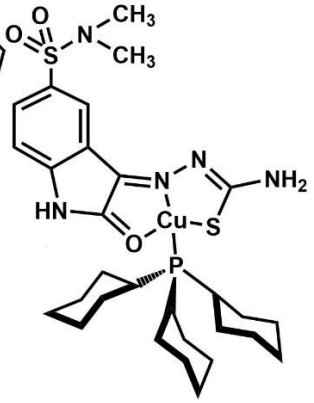
1E_2B_3C_4B (189)



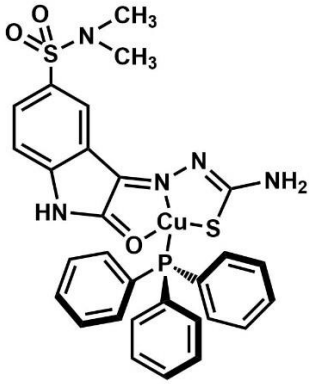
1E_2B_3D_4B (190)



1E_2B_3D_4C (191)



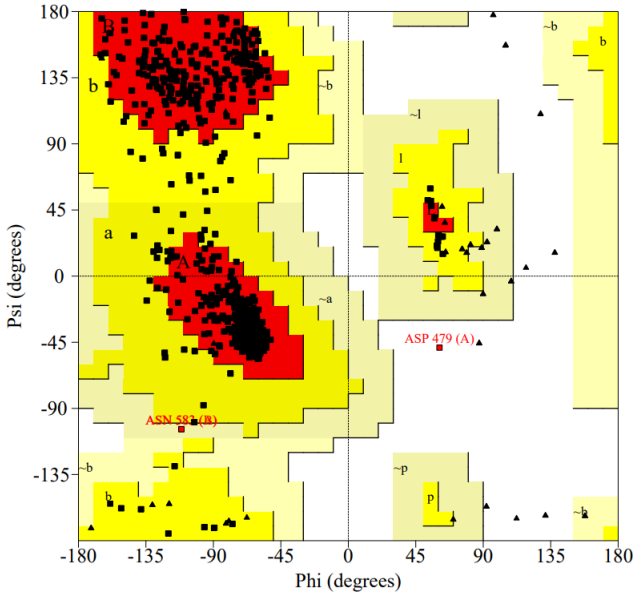
1E_2C_3A_4B (192)



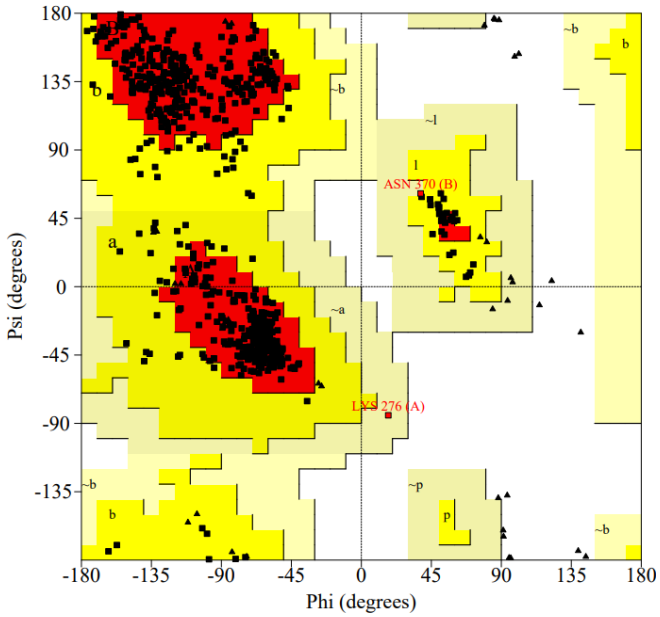
1E_2C_3A_4C (193)

9.2) Anexo 2: Gráficos de Ramachandran

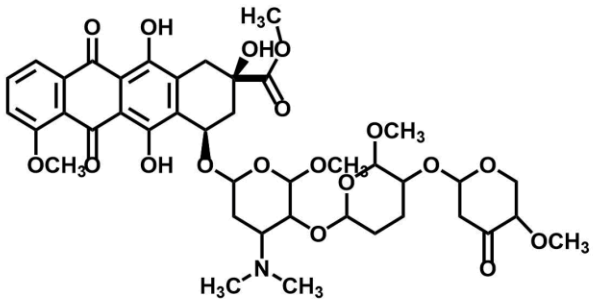
A) Gráfico de Ramachandran para enzima Topo IIα co-cristalizada com DNA e o etoposídeo **(1)** (PDB ID: 5GWK), mostrando a distribuição dos resíduos nas regiões, favoráveis, permitidas e não permitidas.



B) Gráfico de Ramachandran para o domínio ATPase da Topo IIα humana, ligada ao ANP (PDB id: 1ZXM) mostrando a distribuição dos resíduos nas regiões energicamente favoráveis e desfavoráveis.

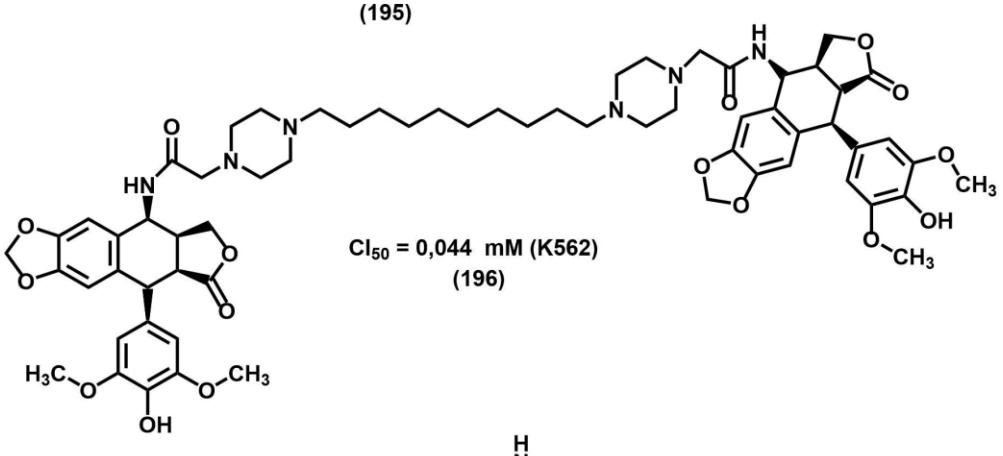


9.3) Anexo 3: Ligantes da literatura (195-316) com atividade no sítio do etoposídeo (1)



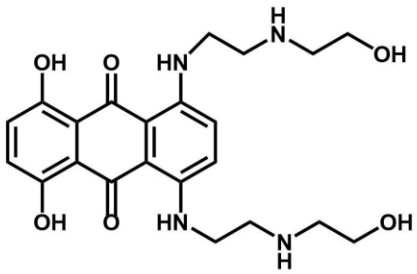
CI_{50} = 0,02 mM (Yoshida sarcoma)

(195)



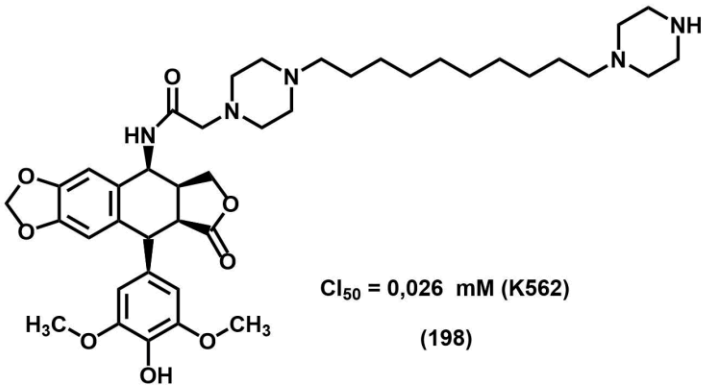
CI_{50} = 0,044 mM (K562)

(196)



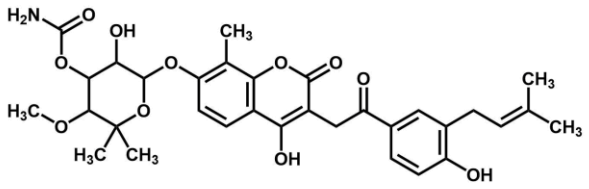
CI_{50} = 0,025 mM (A2780)

(197)



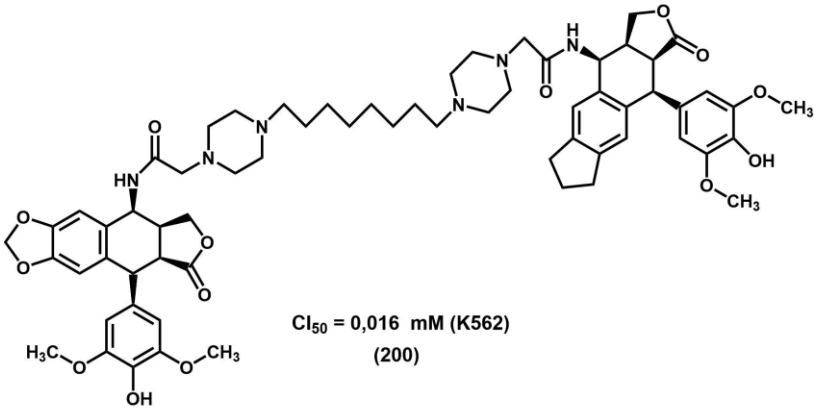
CI_{50} = 0,026 mM (K562)

(198)



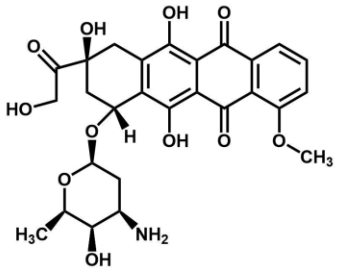
CI_{50} = 0,003 mM

(199)



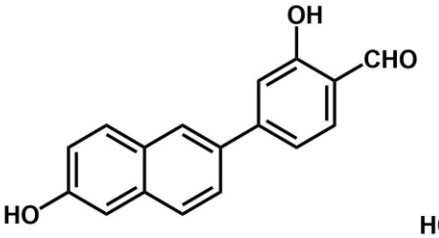
CI_{50} = 0,016 mM (K562)

(200)



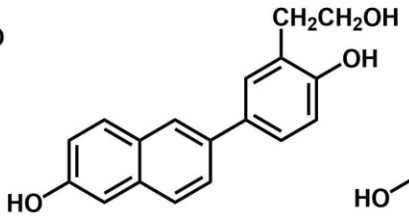
CI_{50} = 0,017 mM (A2780)

(201)



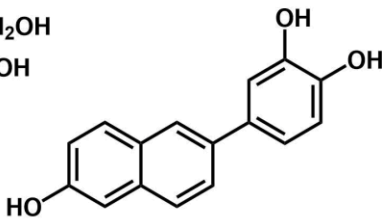
CI_{50} = 2,4 mM (MDA-MB-231)

(212)



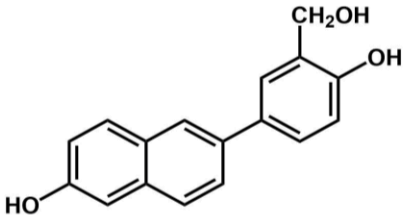
CI_{50} = 0,4 mM (MDA-MB-231)

(213)



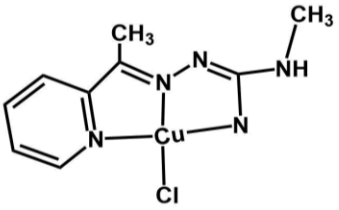
CI_{50} = 4,3 mM (MDA-MB-231)

(214)



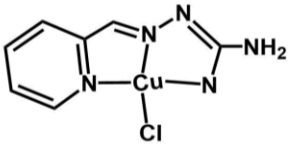
CI_{50} = 1 mM (MDA-MB-231)

(215)



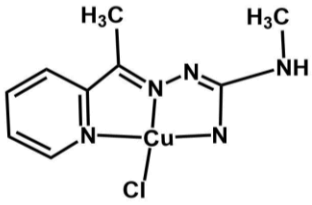
CI_{50} = 1,3 ± 0,3 mM (SK-BR-3)

(216)



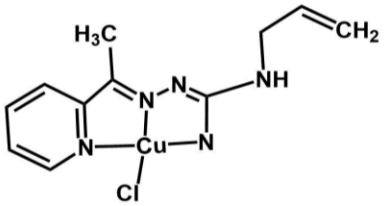
CI_{50} = 6,3 ± 0,1 mM (SK-BR-3)

(217)



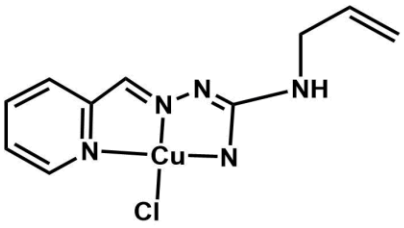
CI_{50} = 3,2 ± 0,9 mM (SK-BR-3)

(218)



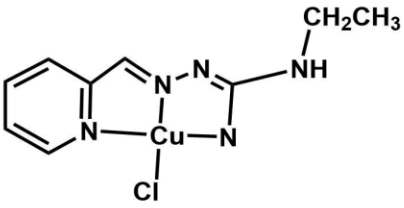
CI_{50} = 1,3 ± 0,4 mM (SK-BR-3)

(219)



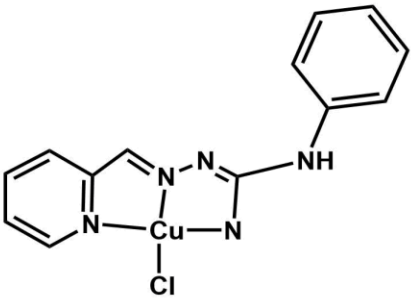
CI_{50} = 0,8 ± 0,3 mM (SK-BR-3)

(220)

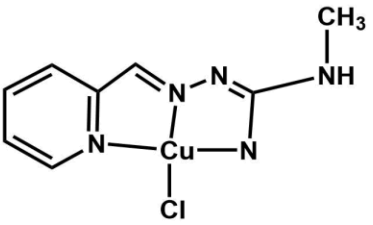


CI_{50} = 1,3 ± 0,1 mM (SK-BR-3)

(221)



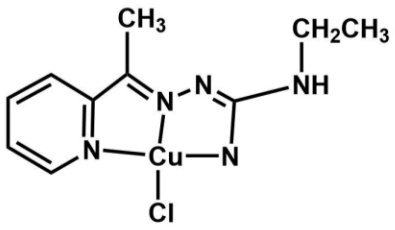
CI_{50} = 0,4 ± 0,2 mM (SK-BR-3)



CI_{50} = 1,9 ± 0,3 mM (SK-BR-3)

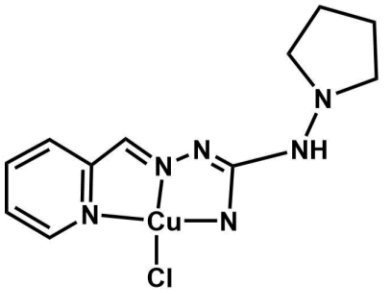
(223)

(222)



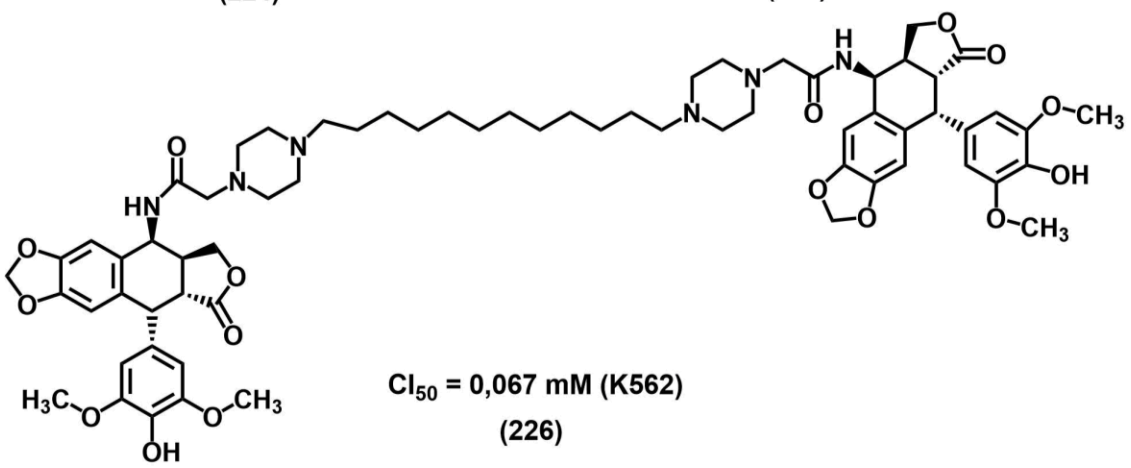
CI_{50} = 0,9 ± 0,3 mM (SK-BR-3)

(224)



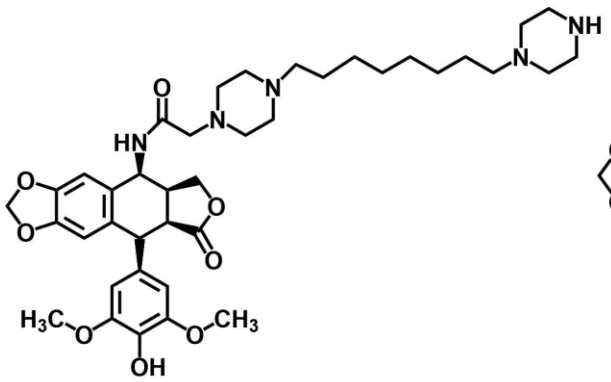
CI_{50} = 0,5 ± 0,3 mM (SK-BR-3)

(225)



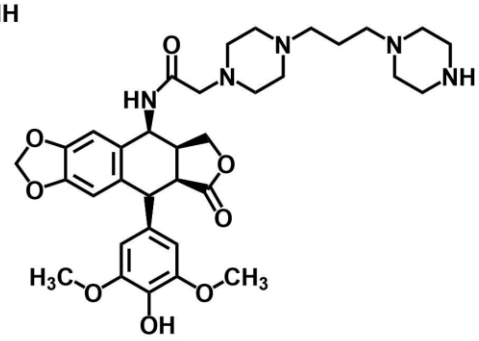
CI_{50} = 0,067 mM (K562)

(226)



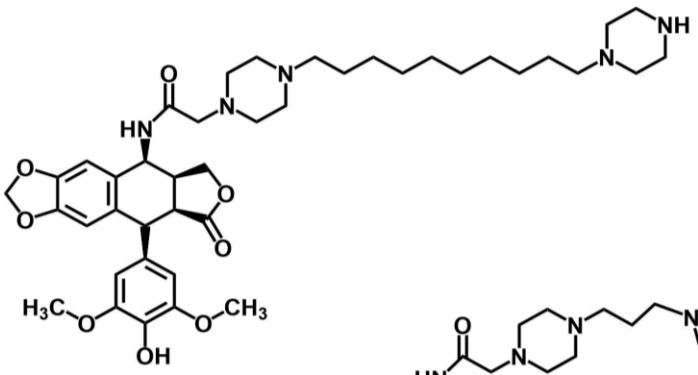
CI_{50} = 0,103 mM (K562)

(227)



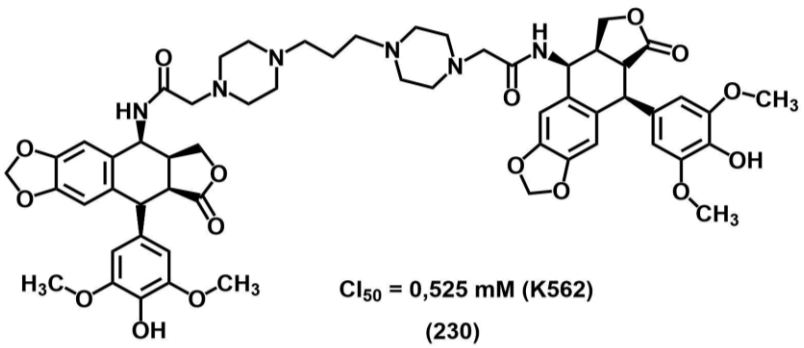
CI_{50} = 1,27 mM (K562)

(228)



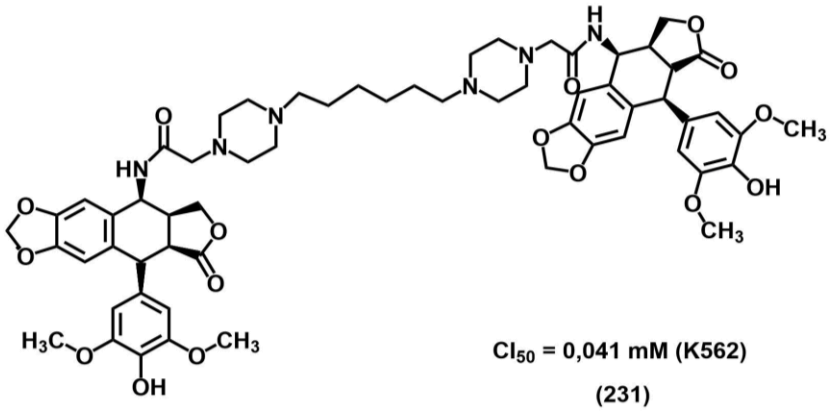
CI_{50} = 0,026 mM (K562)

(229)



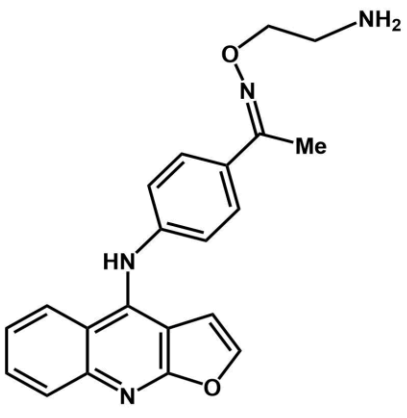
CI_{50} = 0,525 mM (K562)

(230)



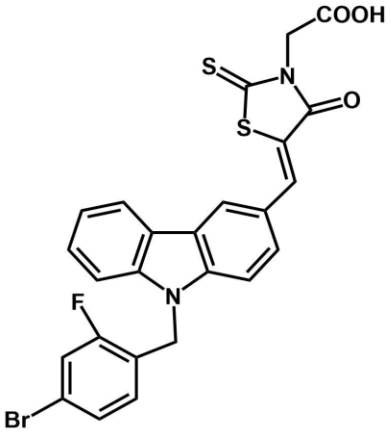
CI_{50} = 0,041 mM (K562)

(231)



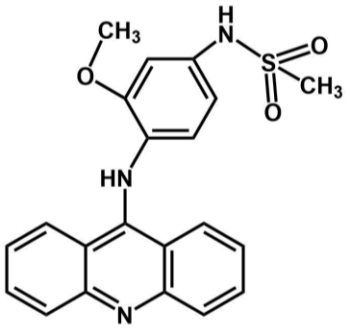
CI_{50} = 6,58 mM (A549)

(232)

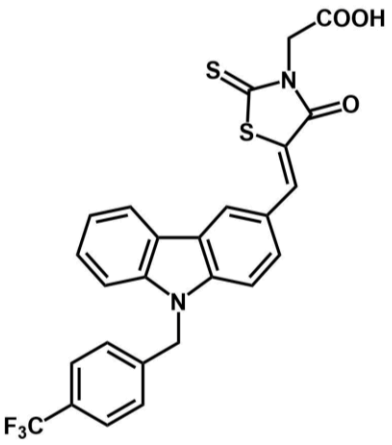


CI_{50} = 9,44 mM (A549)

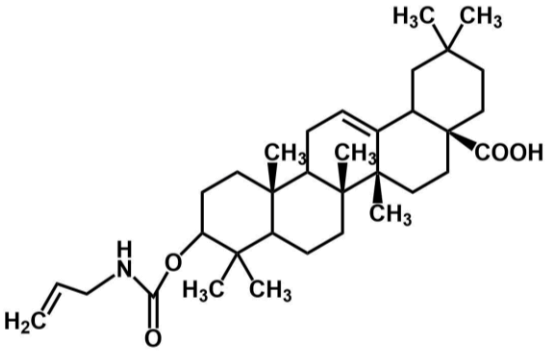
(233)



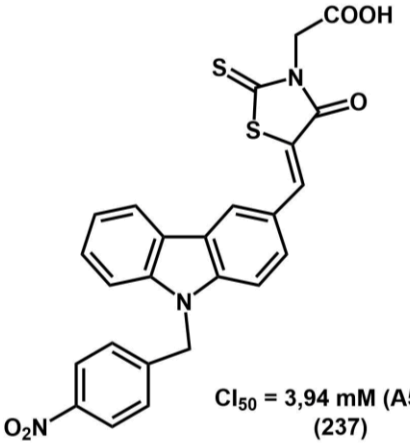
CI_{50} = 0,03 mM (A549)
(234)



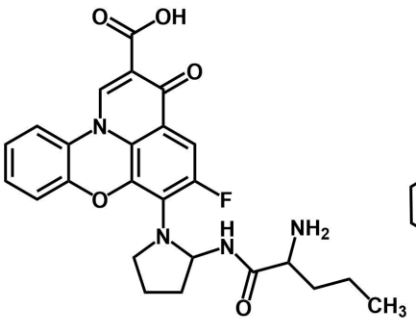
CI_{50} = 3,40 mM (A549)
(235)



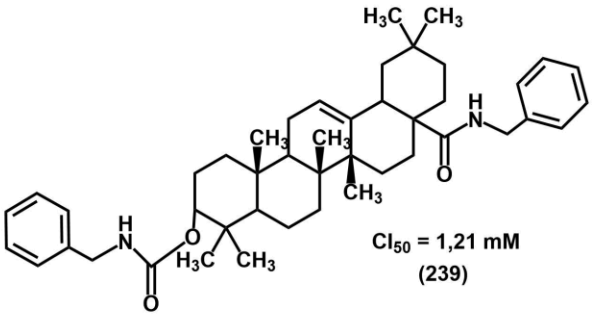
CI_{50} = 1,26 mM
(236)



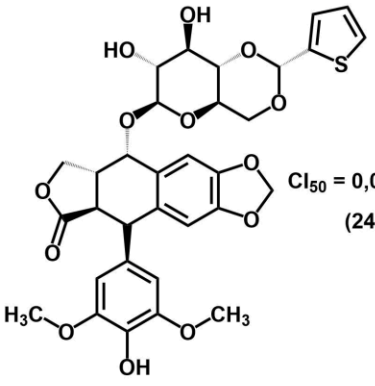
CI_{50} = 3,94 mM (A549)
(237)



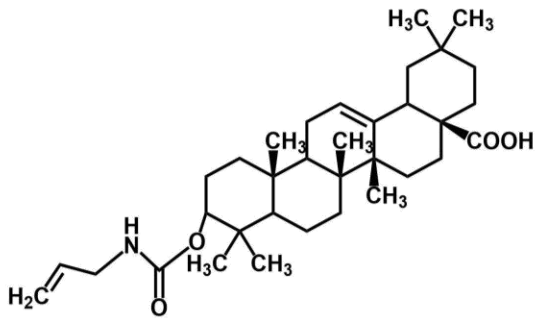
CI_{50} = 0,1 mM
(238)



CI_{50} = 1,21 mM
(239)

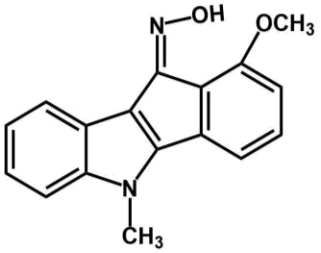


CI_{50} = 0,082 mM
(240)



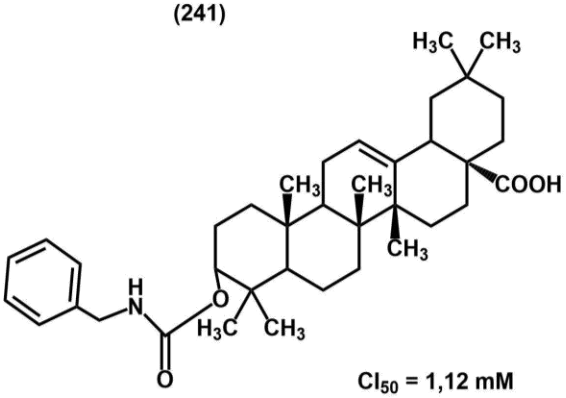
CI_{50} = 1,26 mM

(241)



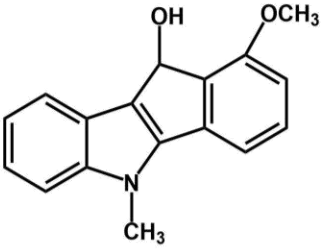
CI_{50} =5 ± 2 mM (HEK-293)

(242)



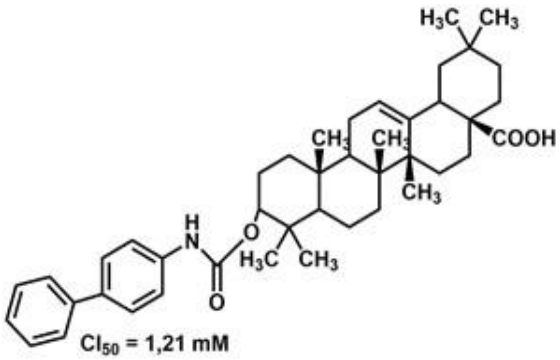
CI_{50} = 1,12 mM

(243)



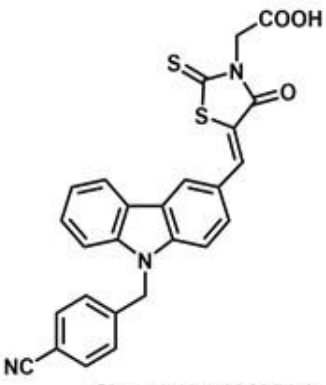
CI_{50} =4 ± 2 mM (HEK-293)

(244)



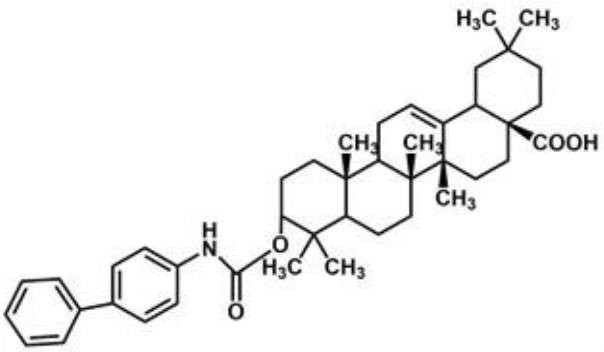
CI_{50} = 1,21 mM

(245)

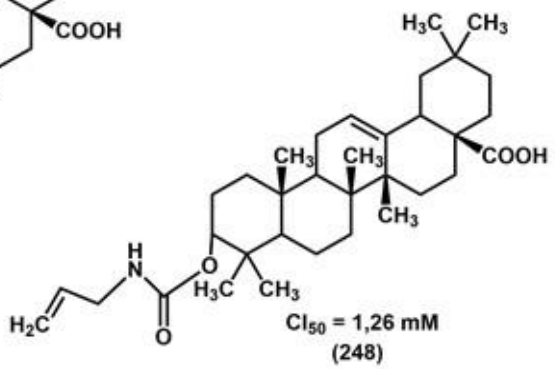


CI_{50} = 2,18 mM (A549)

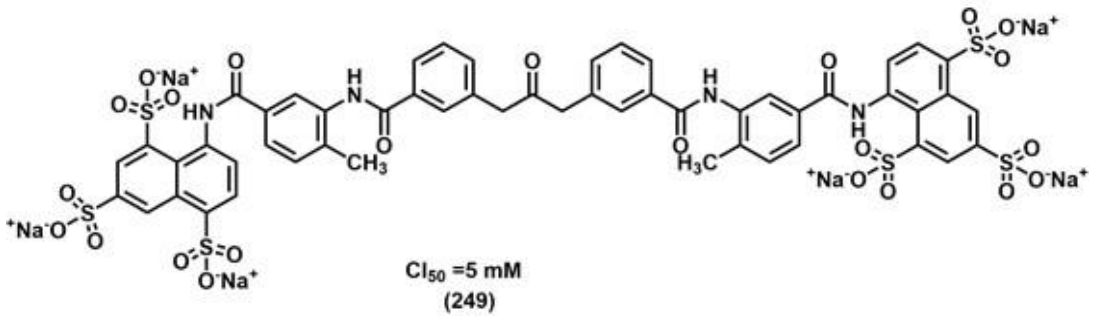
(246)



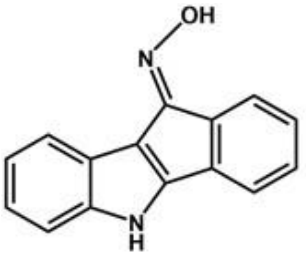
CI_{50} = 1,21 mM
(247)



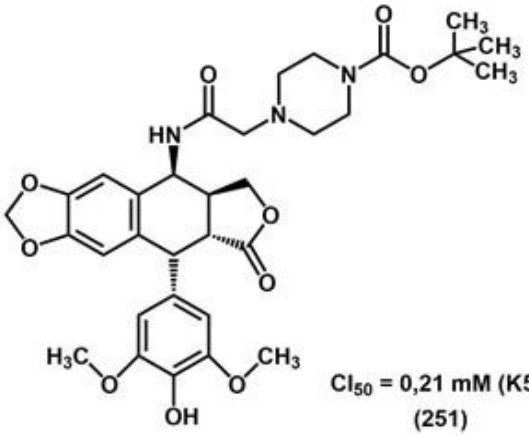
CI_{50} = 1,26 mM
(248)



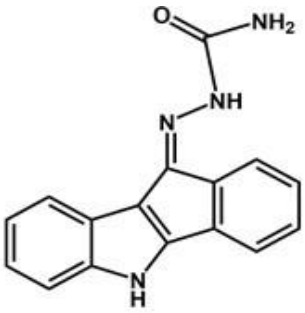
CI_{50} =5 mM
(249)



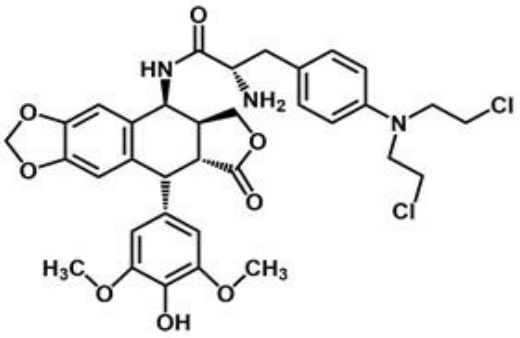
CI_{50} = 6 ± 2 mM (HEK-293)
(250)



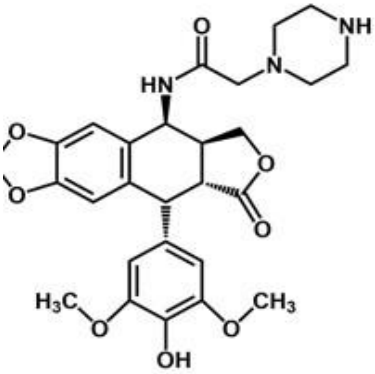
CI_{50} = 0,21 mM (K562)
(251)



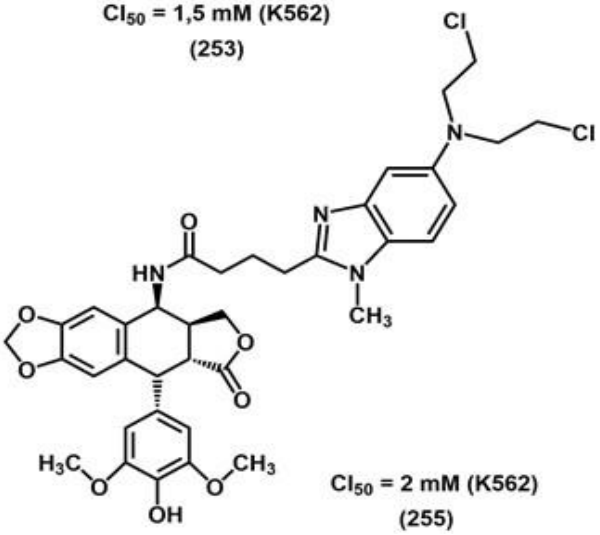
CI_{50} = 7 ± 2 mM (HEK-293)
(252)



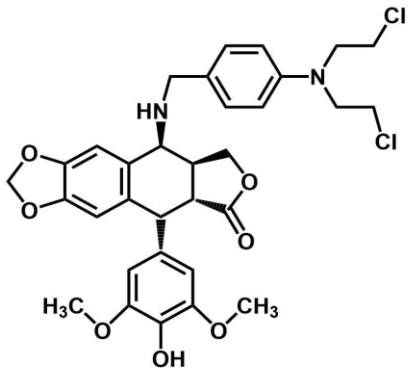
CI_{50} = 1,5 mM (K562)
(253)



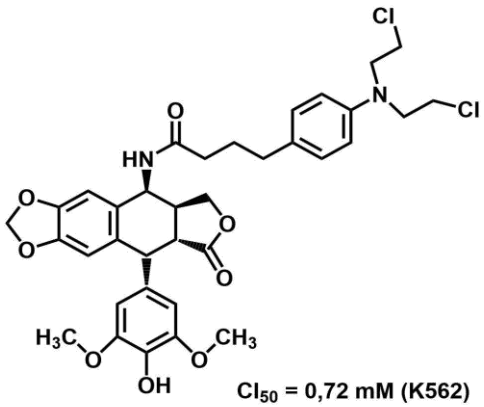
CI_{50} = 0,83 mM (K562)
(254)



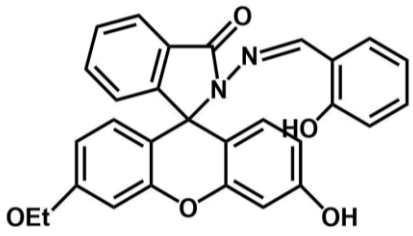
CI_{50} = 2 mM (K562)
(255)



CI_{50} = 0,46 mM (K562)
(256)

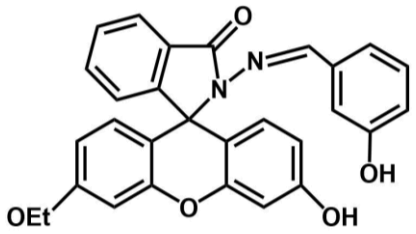


CI_{50} = 0,72 mM (K562)
(257)



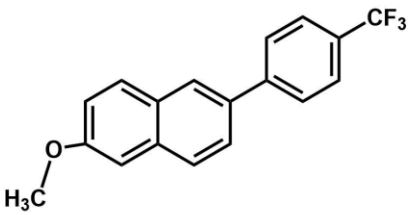
CI_{50} = 0.43 ± 0.04 mM (T47D)

(258)



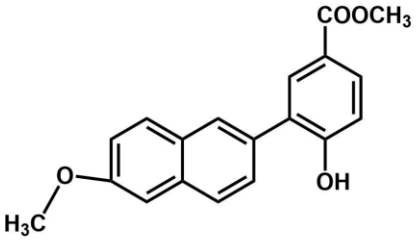
CI_{50} = 0.35 ± 0.02 mM

(259)



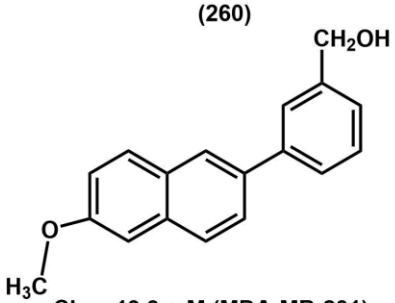
CI_{50} = 54,9 mM (MDA-MB-231)

(260)



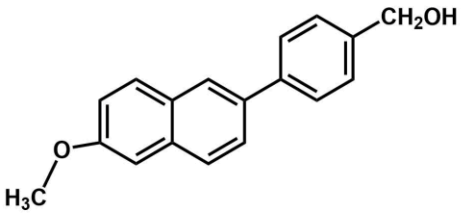
CI_{50} = 36,5 mM (MDA-MB-231)

(261)



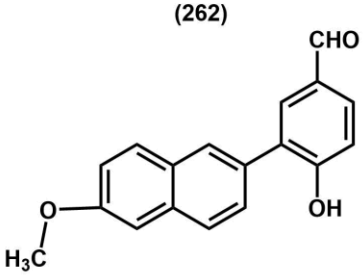
CI_{50} =19,9 mM (MDA-MB-231)

(262)



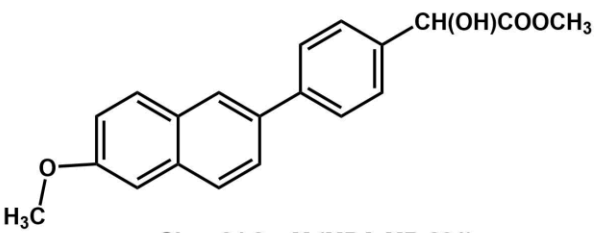
CI_{50} = 152 mM (MDA-MB-231)

(263)



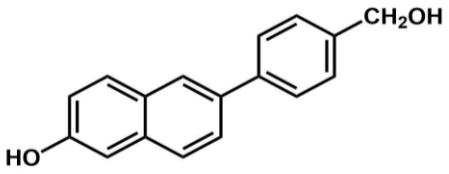
CI_{50} = 25,3 mM (MDA-MB-231)

(264)



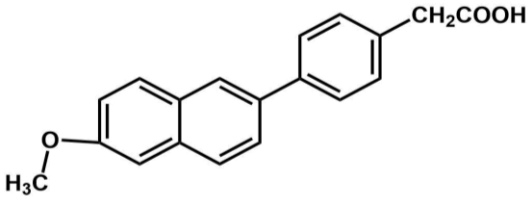
CI_{50} =24,2 mM (MDA-MB-231)

(265)



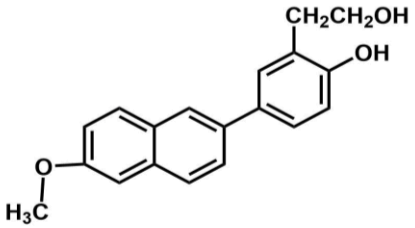
CI_{50} =29,5 mM (MDA-MB-231)

(266)



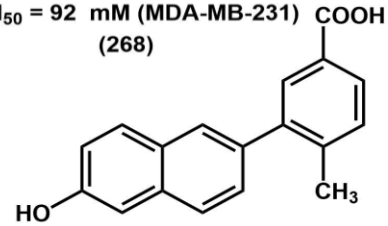
CI_{50} =272 mM (MDA-MB-231)

(267)



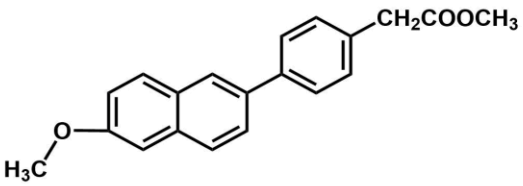
CI_{50} = 92 mM (MDA-MB-231)

(268)



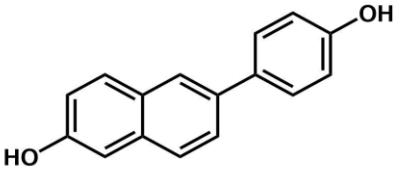
CI_{50} = 94,3 mM (MDA-MB-231)

(269)



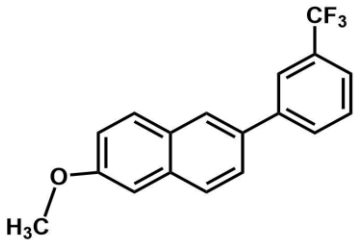
CI_{50} = 695 mM (MDA-MB-231)

(270)



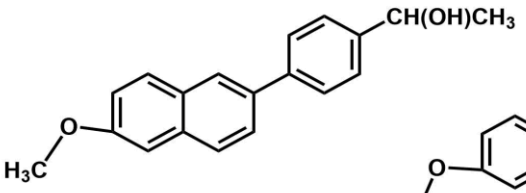
CI_{50} = 10,5 mM (MDA-MB-231)

(271)



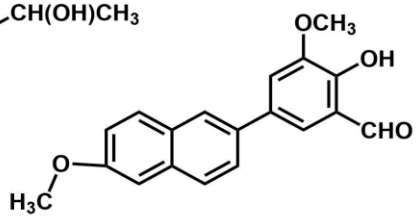
CI_{50} = 455 mM (MDA-MB-231)

(272)



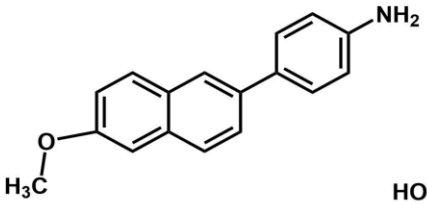
CI_{50} = 69,8 mM (MDA-MB-231)

(273)



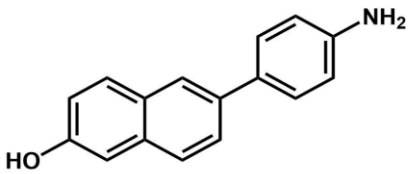
CI_{50} = 61,8 mM (MDA-MB-231)

(274)



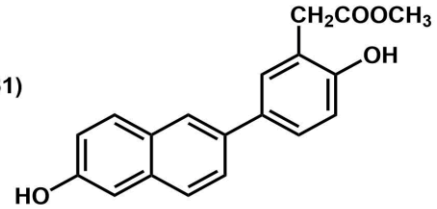
CI_{50} =168 mM (MDA-MB-231)

(275)



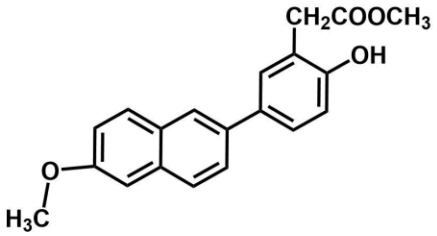
CI_{50} =18,2 mM (MDA-MB-231)

(276)



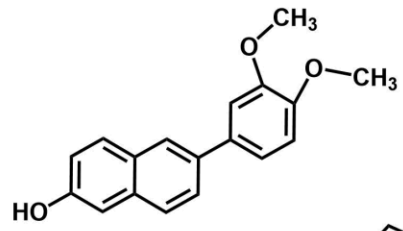
CI_{50} > 800 mM (MDA-MB-231)

(277)



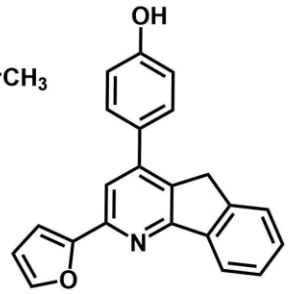
CI_{50} > 800 mM (MDA-MB-231)

(278)



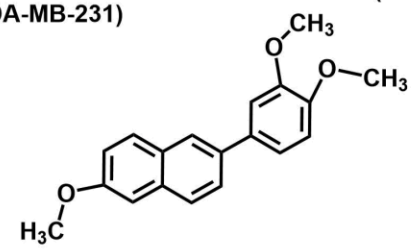
CI_{50} = 16,8 mM (MDA-MB-231)

(279)



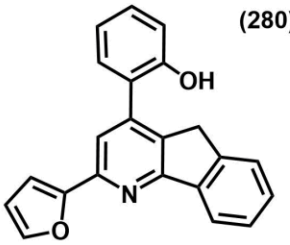
CI_{50} = 95,1 mM

(280)



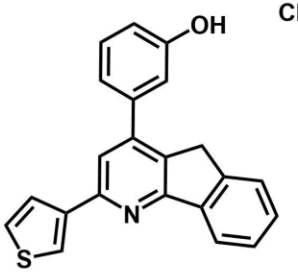
CI_{50} = 112,5 mM (MDA-MB-231)

(281)



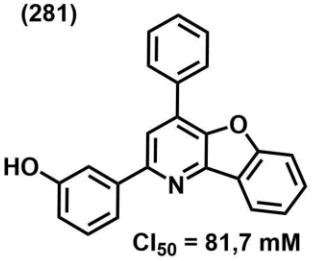
CI_{50} = 58,7 mM

(282)



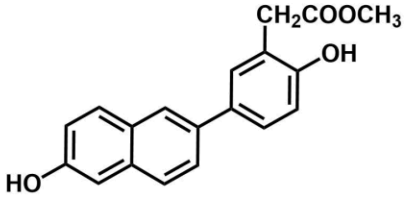
CI_{50} = 75,5 mM

(283)



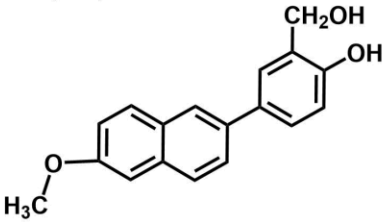
CI_{50} = 81,7 mM

(284)



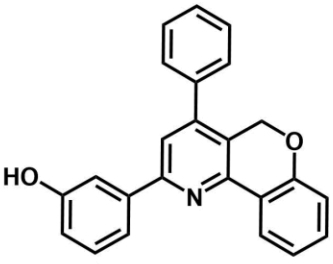
CI_{50} = 98 mM (MDA-MB-231)

(285)



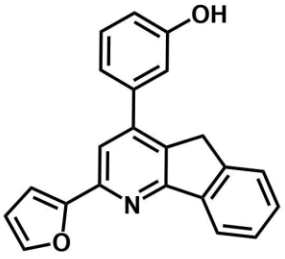
CI_{50} = 81,8 mM (MDA-MB-231)

(286)



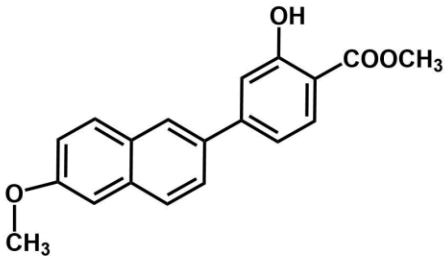
CI_{50} = 84 mM

(287)



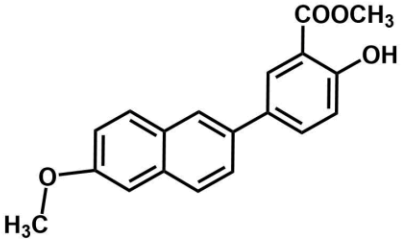
CI_{50} = 77,5 mM

(288)



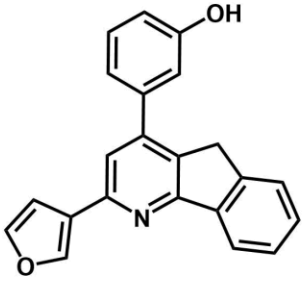
CI_{50} = 77,3 mM (MDA-MB-231)

(289)

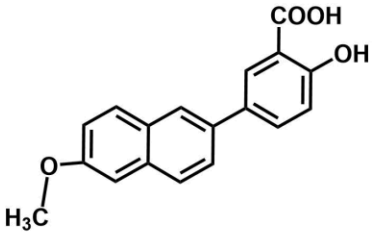


CI_{50} = 82,2 mM (MDA-MB-231)

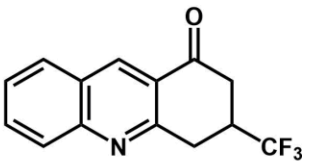
(290)



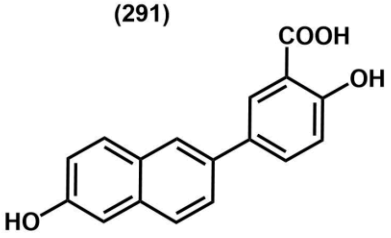
CI_{50} = 82,2 mM
(291)



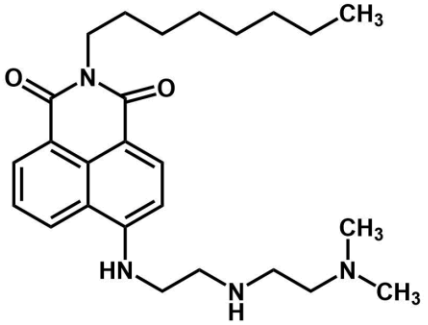
CI_{50} = 93,3 mM (MDA-MB-231)
(292)



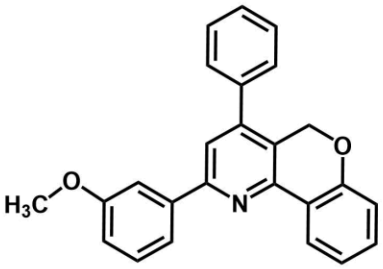
CI_{50} > 1000 mM
(293)



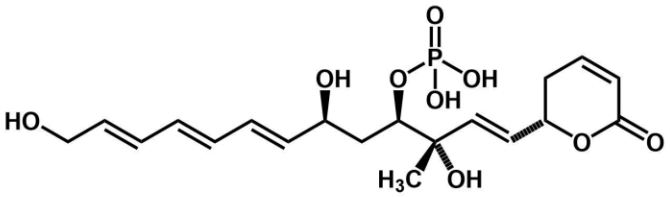
CI_{50} = 31,5 mM (MDA-MB-231)
(294)



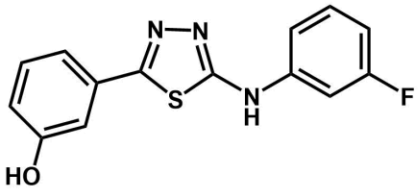
CI_{50} = 75,6 mM (L-02)
(295)



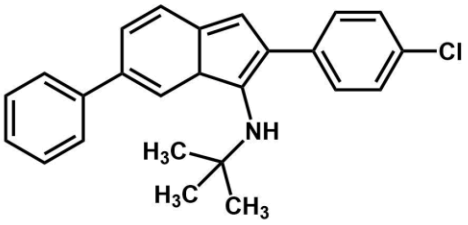
CI_{50} = 13,6 mM
(296)



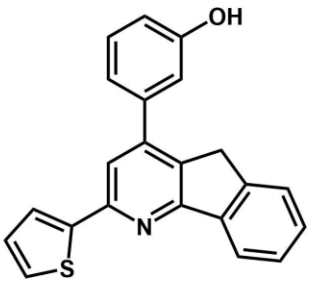
CI_{50} = 40 mM (EAC)
(297)



CI_{50} = 170 mM (MCF-7)
(298)

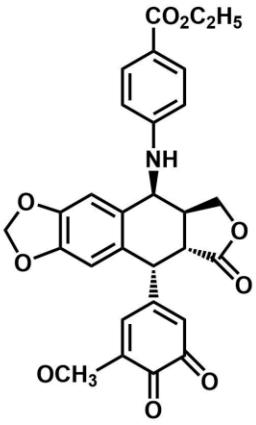


CI_{50} = 55,37 mM (HEK-293)
(299)



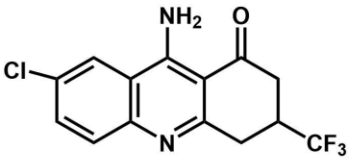
CI_{50} = 75,6 mM

(300)



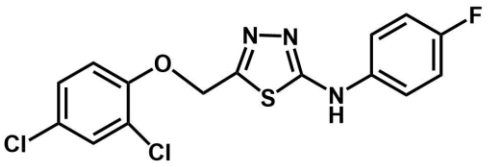
CI_{50} = 25 mM (KB cells)

(301)



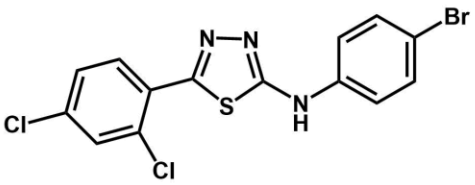
CI_{50} = 85 mM

(302)



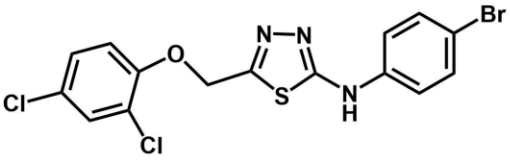
CI_{50} > 200 mM (MCF-7)

(303)



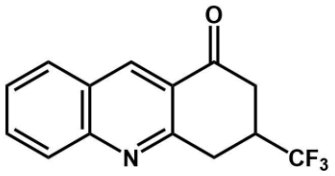
CI_{50} = 70 mM (MCF-7)

(304)



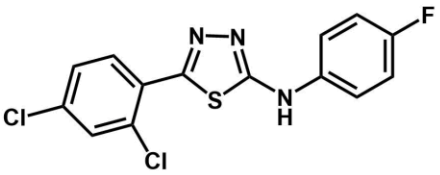
CI_{50} > 200 mM (MCF-7)

(305)



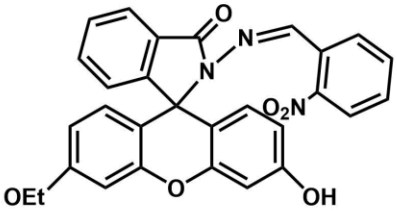
CI_{50} > 1000 mM

(306)



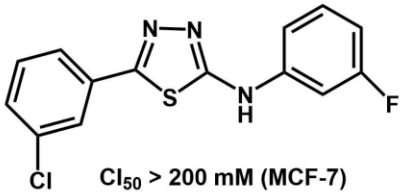
CI_{50} = 130 mM (MCF-7)

(307)



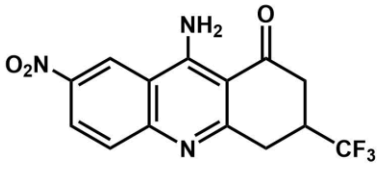
CI_{50} > 50 mM (T47D)

(308)



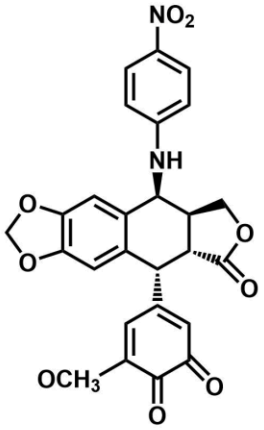
CI_{50} > 200 mM (MCF-7)

(309)



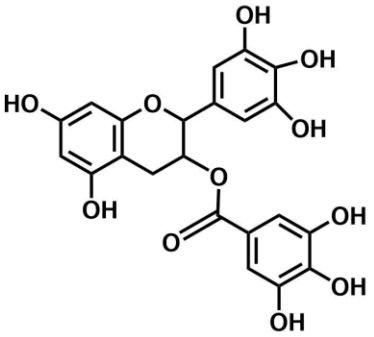
CI_{50} >1000 mM

(310)



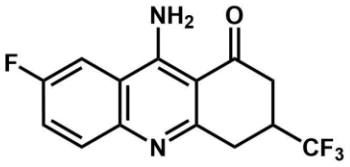
CI_{50} =10 mM (KB cells)

(311)



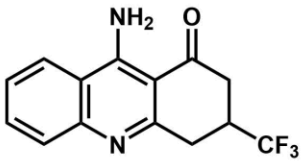
CI_{50} = 20 mM

(312)



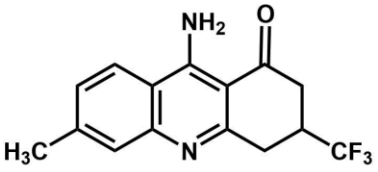
CI_{50} = 520 mM

(313)



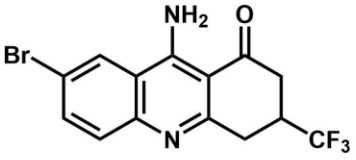
CI_{50} = 155 mM

(314)



CI_{50} > 800 mM

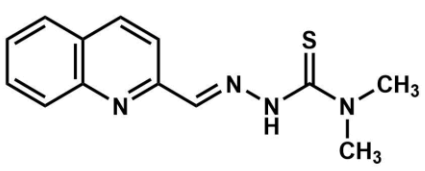
(315)



CI_{50} = 90 mM

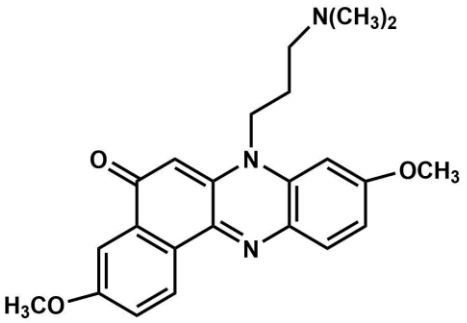
(316)

9.4) Anexo 4: Ligantes da literatura (317-420) com atividade no sítio da ATPase



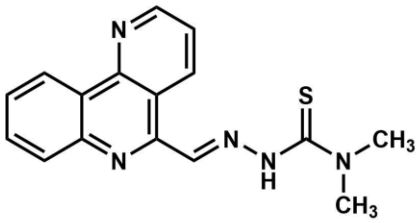
CI_{50} = 20 nM (HL-60)

(317)



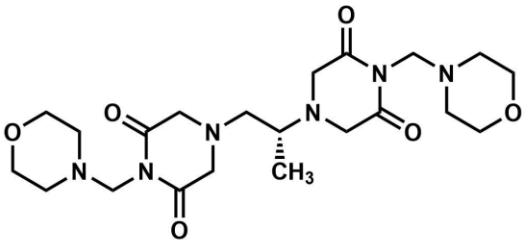
CI_{50} = 90 nM (HL-60)

(318)



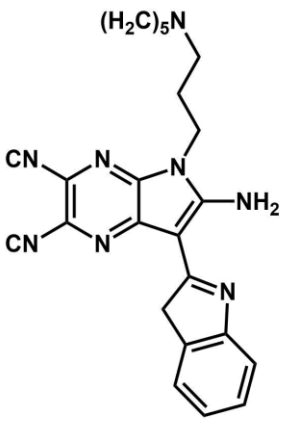
CI_{50} = 40 nM (HL-60)

(319)



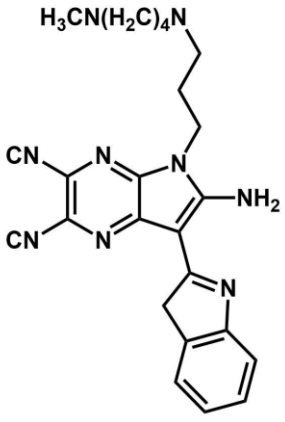
CI_{50} = 29 nM (A549)

(320)



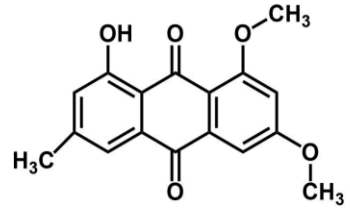
CI_{50} = 6,23 mM (MDA-MB-201)

(321)



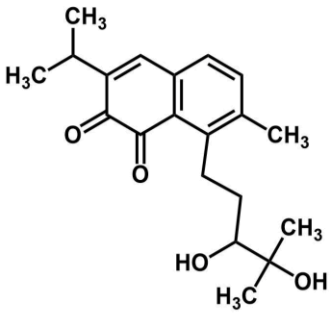
CI_{50} = 4,52 mM (MDA-MB-201)

(322)



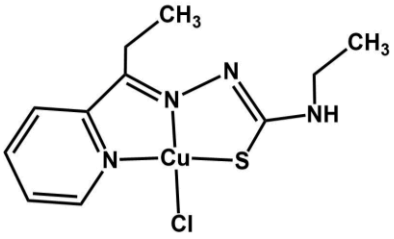
CI_{50} = 6,23 mM (BEAS-2B)

(323)



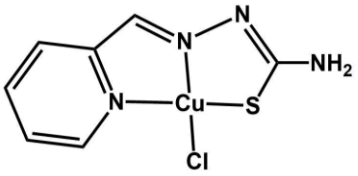
CI_{50} = 1,84 mM (BEAS-2B)

(324)



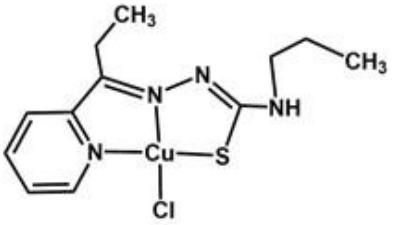
CI_{50} = 7,2 mM (MCF-7)

(325)



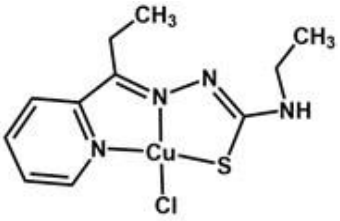
CI_{50} = 2,8 mM (MCF-7)

(326)



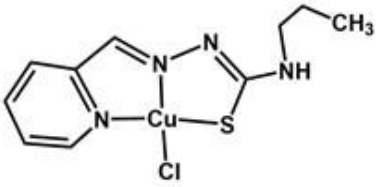
CI_{50} = 5,9 mM (MCF-7)

(327)



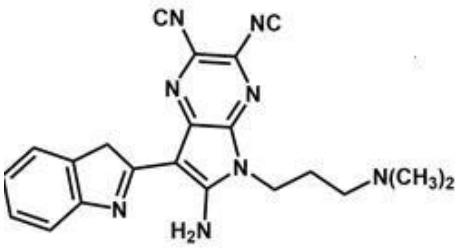
CI_{50} = 5,4 mM (MCF-7)

(328)



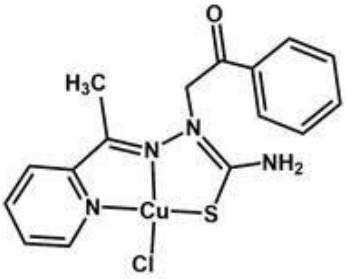
CI_{50} = 4,8 mM (MCF-7)

(329)



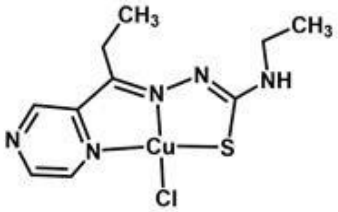
CI_{50} = 1,82 mM (MDA-MB-201)

(330)



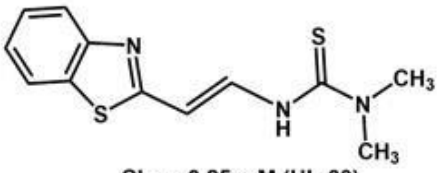
CI_{50} = 0,8 mM (MCF-7)

(331)



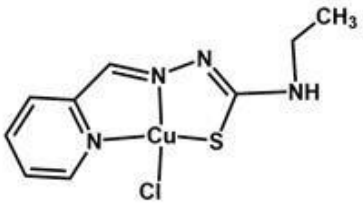
CI_{50} = 0,9 mM (MCF-7)

(332)



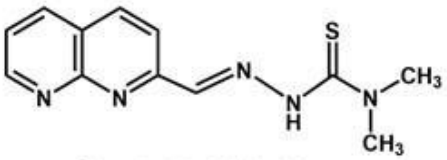
CI_{50} = 0,25 mM (HL-60)

(333)



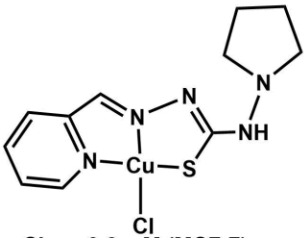
CI_{50} = 6,1 mM (MCF-7)

(334)



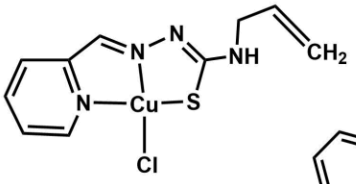
CI_{50} = 0,41 mM (HL-60)

(335)



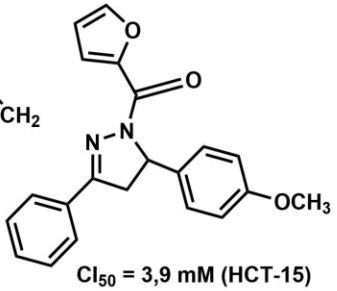
CI_{50} = 0,6 mM (MCF-7)

(336)



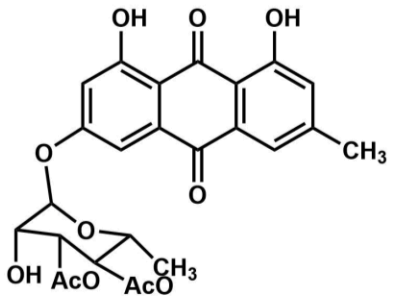
CI_{50} = 0,3 mM (MCF-7)

(337)



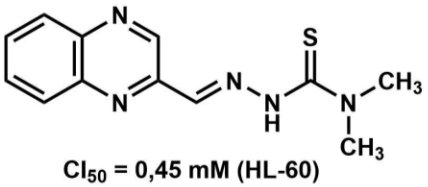
CI_{50} = 3,9 mM (HCT-15)

(338)



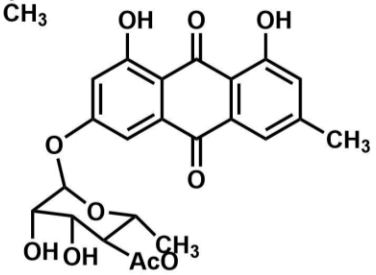
CI_{50} = 1,2 mM (HCT-15)

(339)



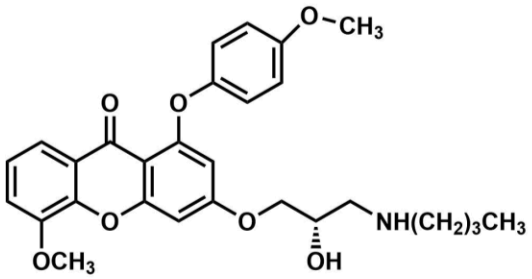
CI_{50} = 0,45 mM (HL-60)

(340)



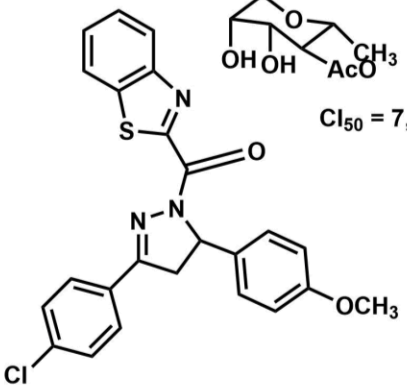
CI_{50} = 7,9 mM (HL-60)

(341)



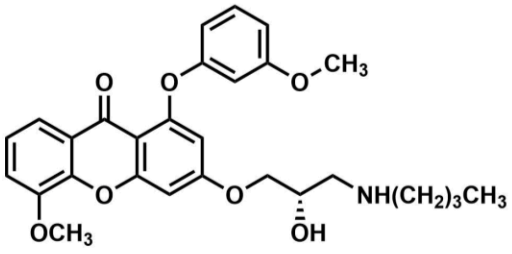
CI_{50} = 1,82 mM (HCT-15)

(342)



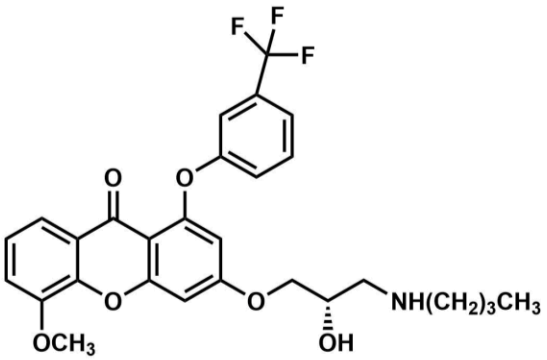
CI_{50} = 4,1 mM (HCT-15)

(343)



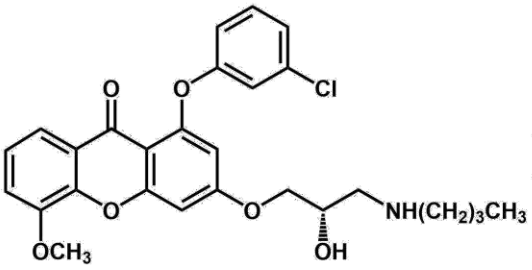
CI_{50} = 2,30 mM (HCT-15)

(344)



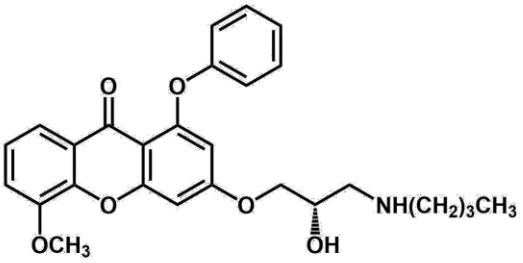
CI_{50} = 2,62 mM (HCT-15)

(345)



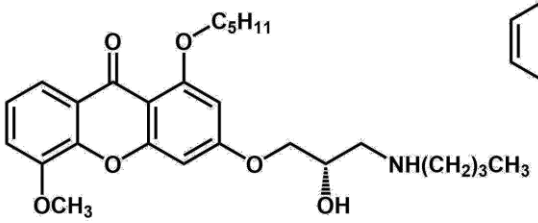
CI_{50} = 2,40 mM (HCT-15)

(346)



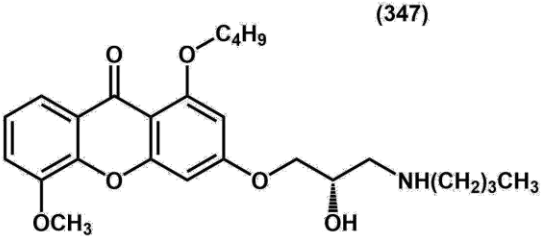
CI_{50} = 2,25 mM (HCT-15)

(347)



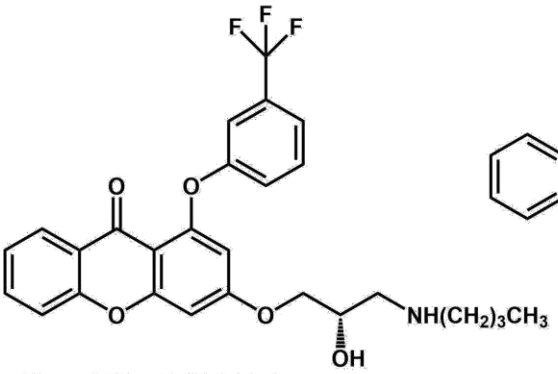
CI_{50} = 3,84 mM (HCT-15)

(348)



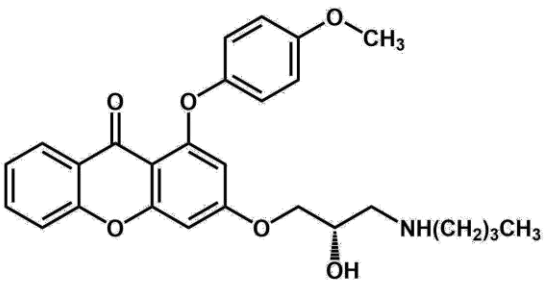
CI_{50} = 7,65 mM (HCT-15)

(349)



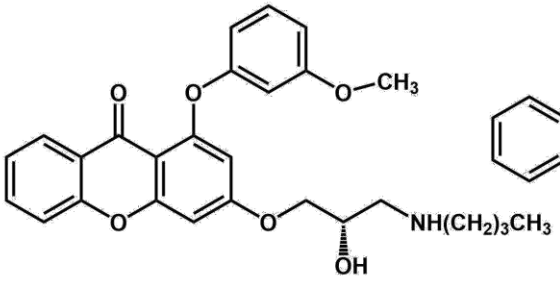
CI_{50} = 2,26 mM (HCT-15)

(350)



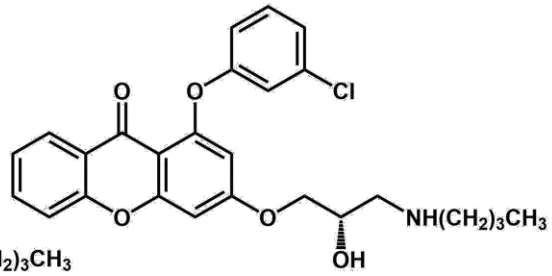
CI_{50} = 4,81 mM (HCT-15)

(351)



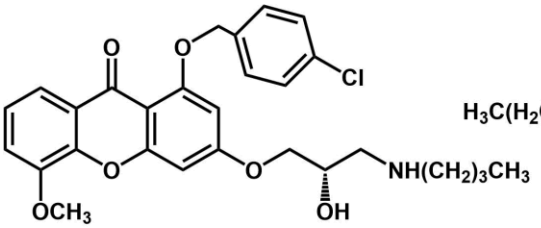
CI_{50} = 5,86 mM (HCT-15)

(352)



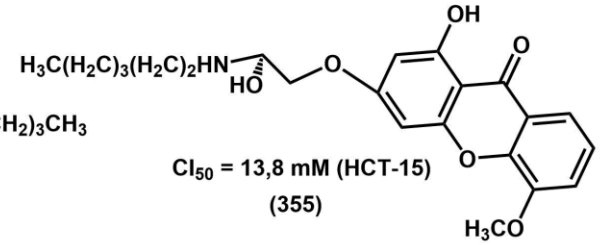
CI_{50} = 2,83 mM (HCT-15)

(353)



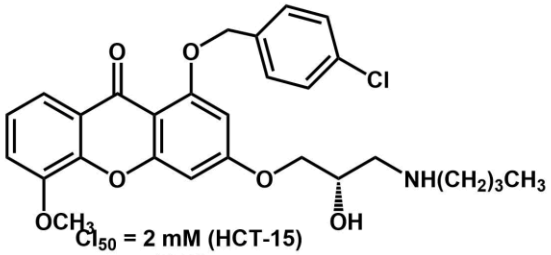
CI_{50} = 2,60 mM (HCT-15)

(354)



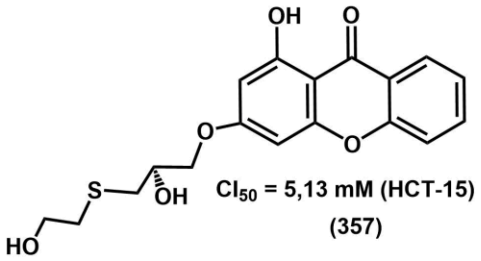
CI_{50} = 13,8 mM (HCT-15)

(355)



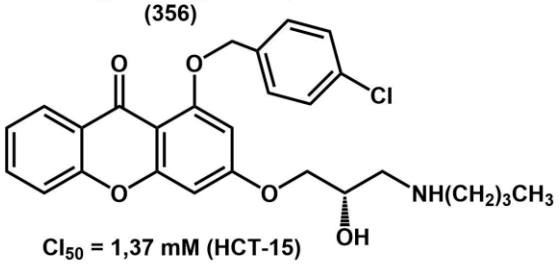
CI_{50} = 2 mM (HCT-15)

(356)



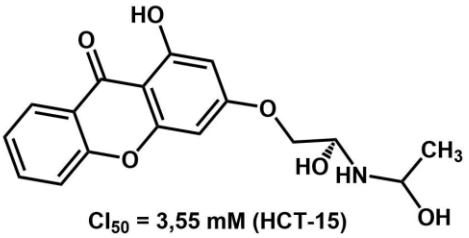
CI_{50} = 5,13 mM (HCT-15)

(357)



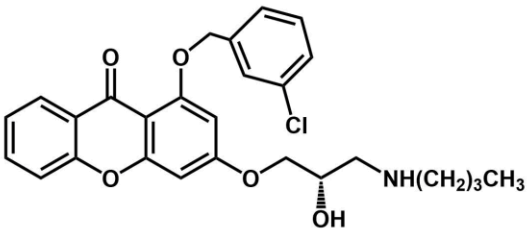
CI_{50} = 1,37 mM (HCT-15)

(358)



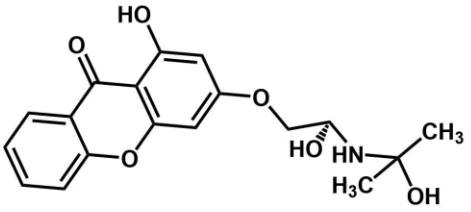
CI_{50} = 3,55 mM (HCT-15)

(359)



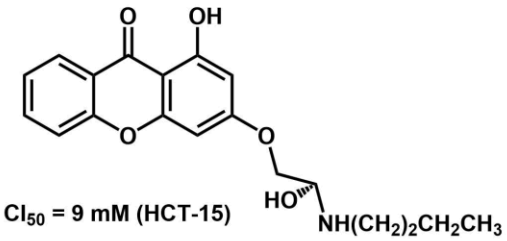
CI_{50} = 2,56 mM (HCT-15)

(360)



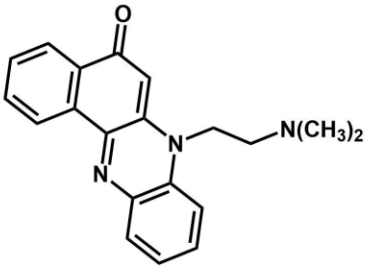
CI_{50} = 6,97 mM (HCT-15)

(361)



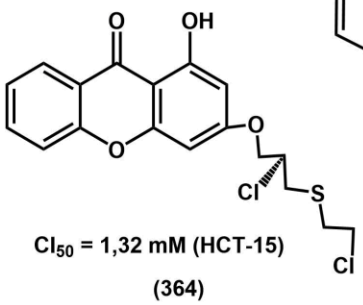
CI_{50} = 9 mM (HCT-15)

(362)



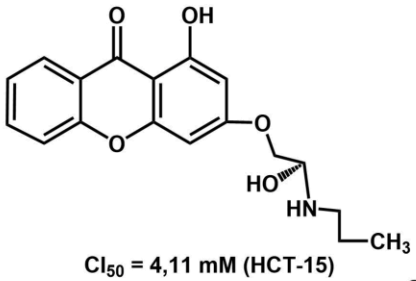
CI_{50} = 0,31 mM (HL-60)

(363)



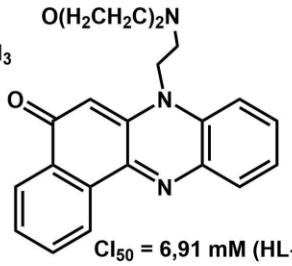
CI_{50} = 1,32 mM (HCT-15)

(364)



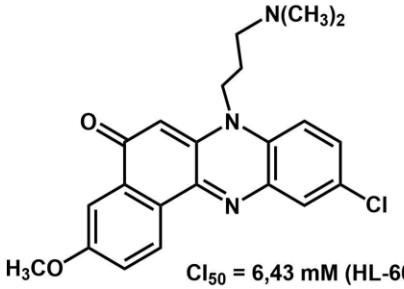
CI_{50} = 4,11 mM (HCT-15)

(365)



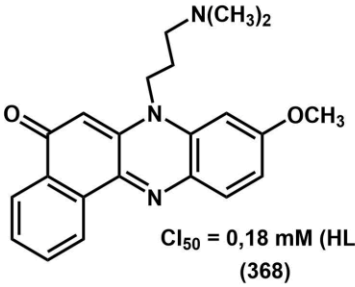
CI_{50} = 6,91 mM (HL-60)

(366)



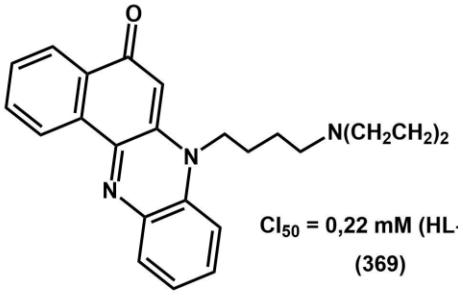
CI_{50} = 6,43 mM (HL-60)

(367)



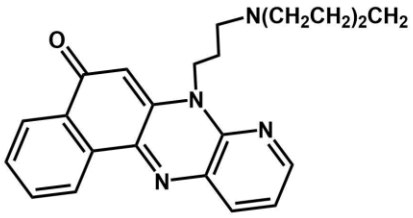
CI_{50} = 0,18 mM (HL-60)

(368)



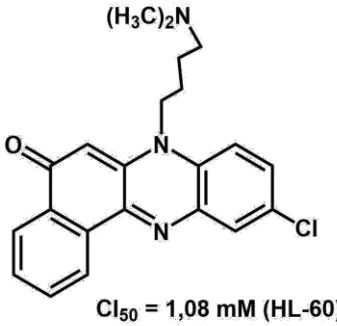
CI_{50} = 0,22 mM (HL-60)

(369)



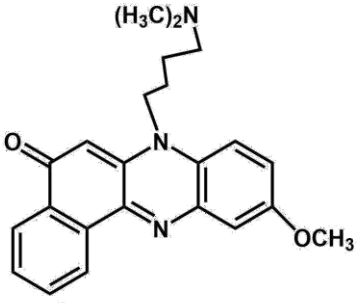
CI_{50} = 0,63 mM (HL-60)

(370)



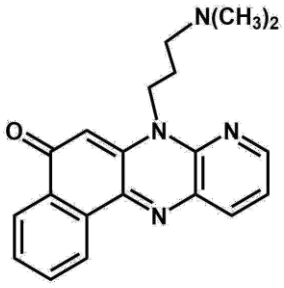
CI_{50} = 1,08 mM (HL-60)

(371)



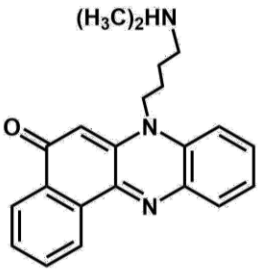
CI_{50} = 0,96 mM (HL-60)

(372)



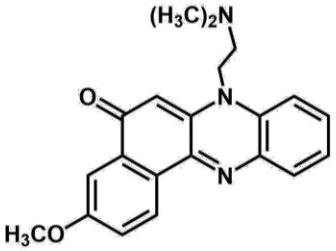
CI_{50} = 0,62 mM (HL-60)

(373)



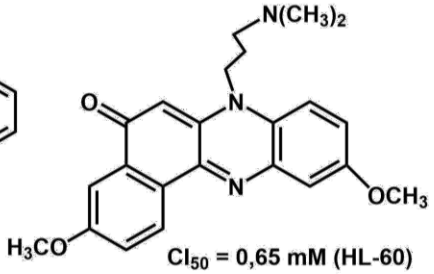
CI_{50} = 0,38 mM (HL-60)

(374)



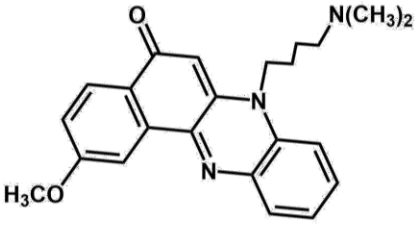
CI_{50} = 2,85 mM (HL-60)

(375)



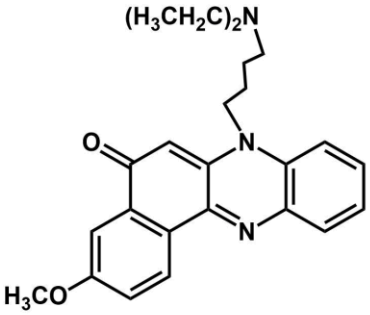
CI_{50} = 0,65 mM (HL-60)

(376)



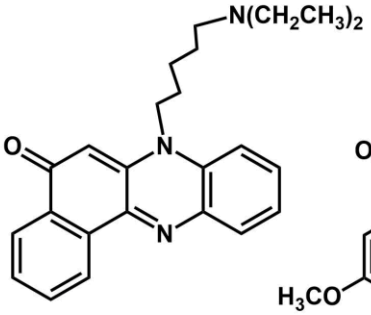
CI_{50} = 0,22 mM (HL-60)

(377)



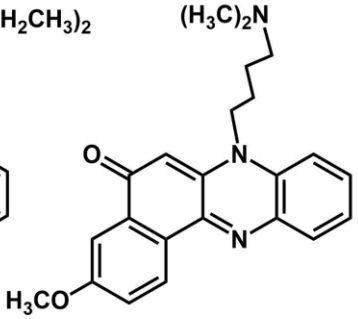
CI_{50} = 0,23 mM (HL-60)

(378)



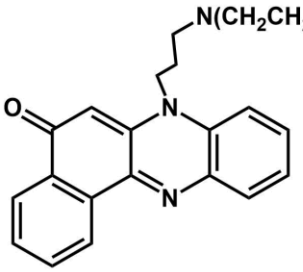
CI_{50} = 0,22 mM (HL-60)

(379)



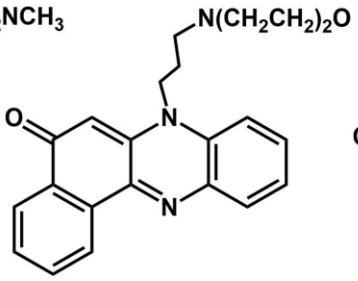
CI_{50} = 0,15 mM (HL-60)

(380)



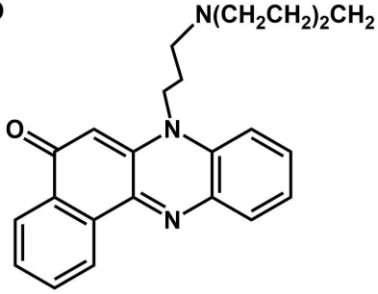
CI_{50} = 1,22 mM (HL-60)

(381)



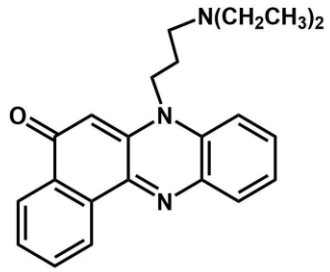
CI_{50} = 1,28 mM (HL-60)

(382)



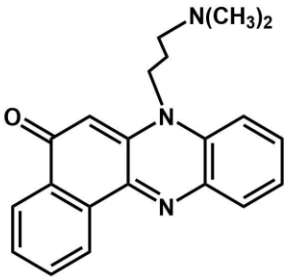
CI_{50} = 0,52 mM (HL-60)

(383)



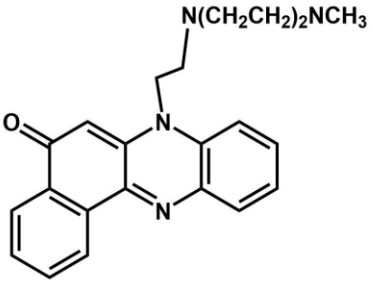
CI_{50} = 1,50 mM (HL-60)

(384)



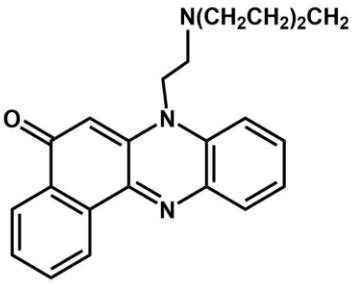
CI_{50} = 0,21 mM (HL-60)

(385)



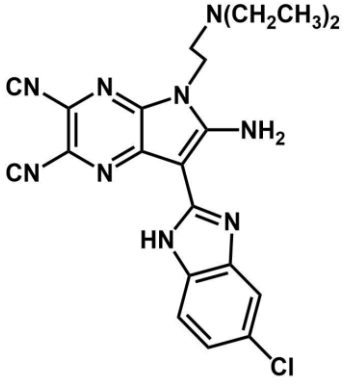
CI_{50} = 0,38 mM (HL-60)

(386)



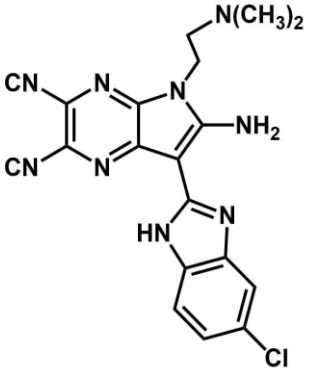
CI_{50} = 0,93 mM (HL-60)

(387)



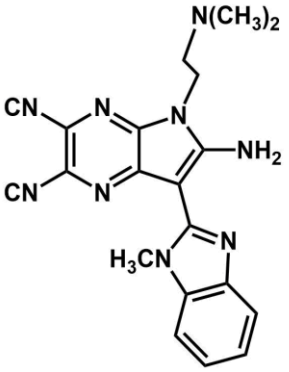
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(388)



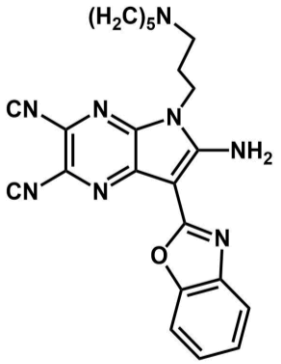
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(389)



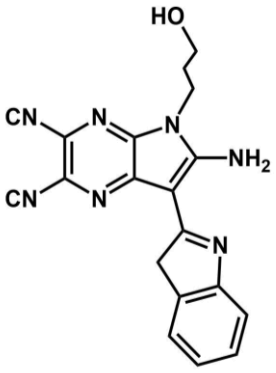
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(390)



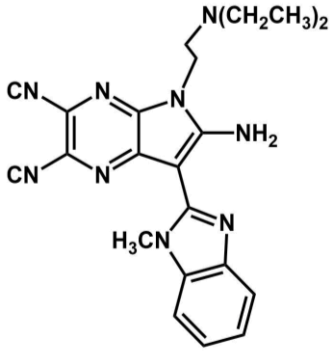
CI_{50} = 32,23 mM (MDA-MB-201)

(391)



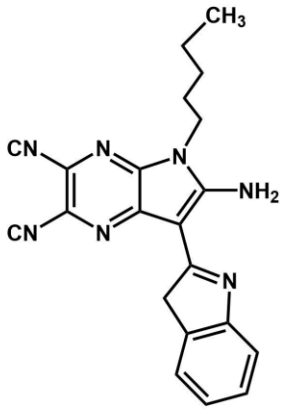
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(392)



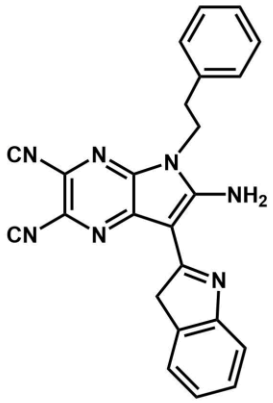
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(393)



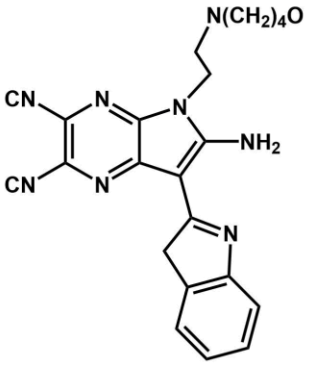
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(394)



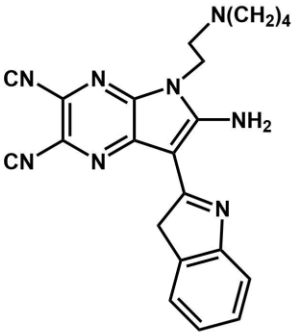
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(395)



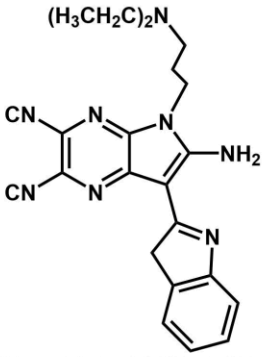
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(396)



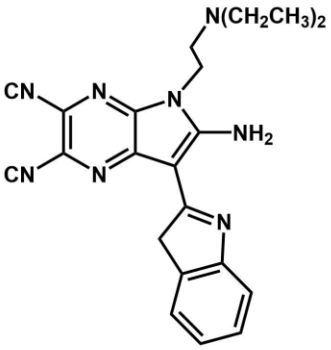
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(397)



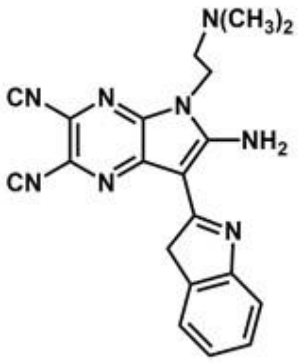
CI_{50} = 28,9 mM (MDA-MB-201)

(398)



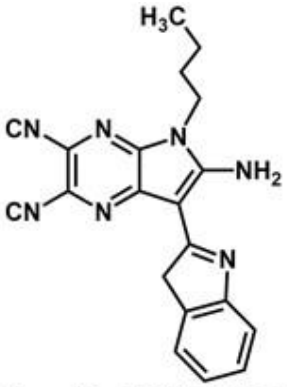
CI_{50} = 25,43 mM (MDA-MB-201)

(399)



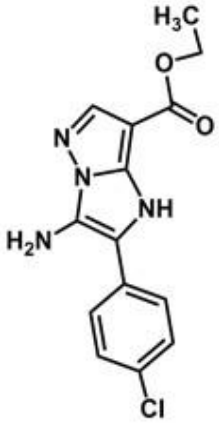
CI_{50} = 43,46 mM (MDA-MB-201)

(400)



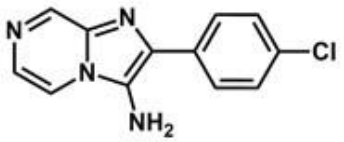
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(401)



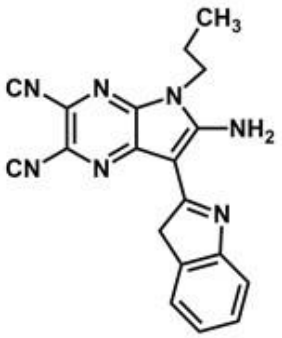
CI_{50} = 27 mM (HEK-293)

(402)



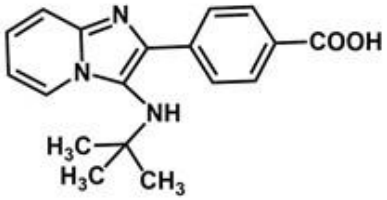
CI_{50} = 17 mM (HEK-293)

(403)



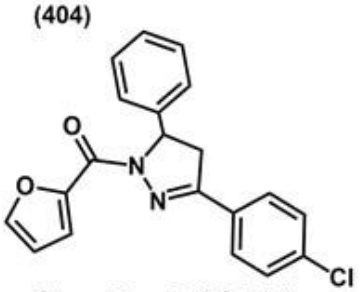
CI_{50} > 50 mM (MDA-MB-201)

(404)



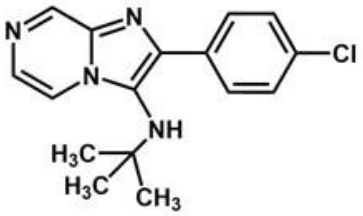
CI_{50} = 75 mM (HEK-293)

(405)



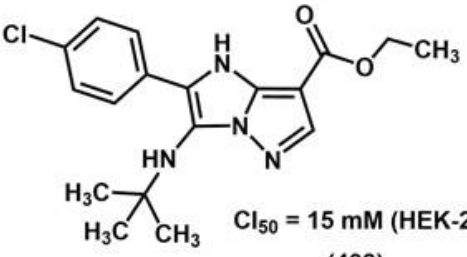
CI_{50} > 50 mM (HCT-15)

(406)



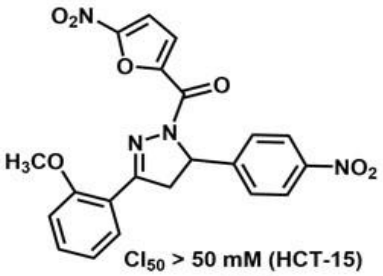
CI_{50} = 10 mM (HEK-293)

(407)



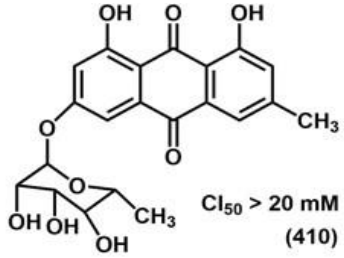
CI_{50} = 15 mM (HEK-293)

(408)



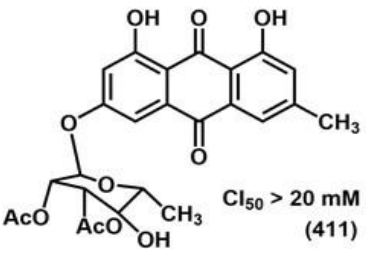
CI_{50} > 50 mM (HCT-15)

(409)



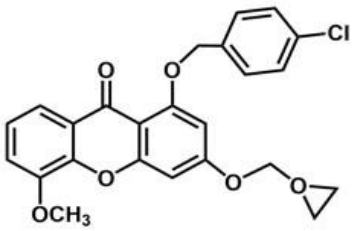
CI_{50} > 20 mM (HL-60)

(410)



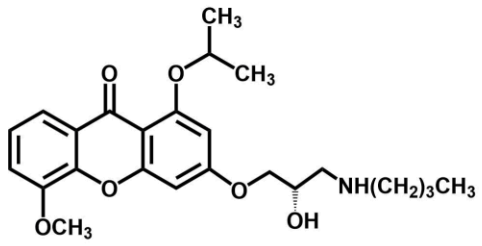
CI_{50} > 20 mM (HL-60)

(411)



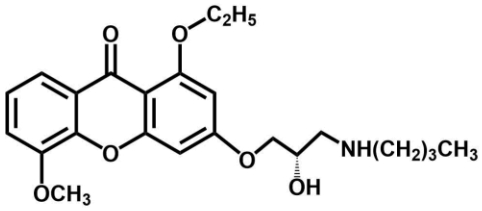
CI_{50} > 50 mM (HCT-15)

(412)



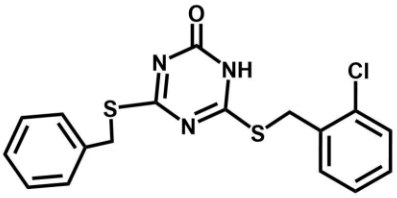
CI_{50} = 14,39 mM (HCT-15)

(413)



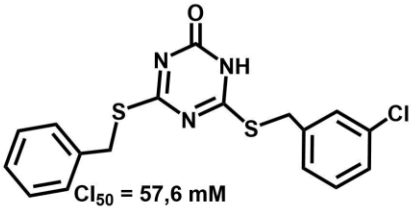
CI_{50} = 23,48 mM (HCT-15)

(415)



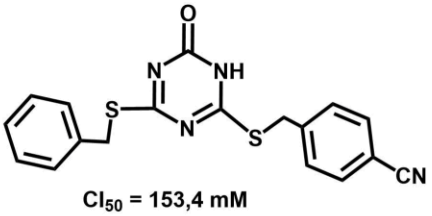
CI_{50} = 94,1 mM

(417)



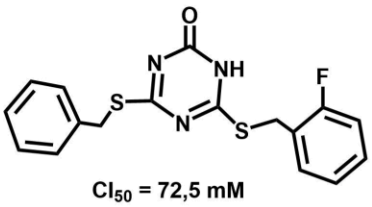
CI_{50} = 57,6 mM

(419)



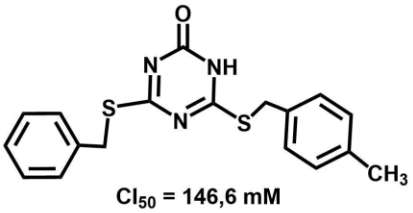
CI_{50} = 153,4 mM

(414)



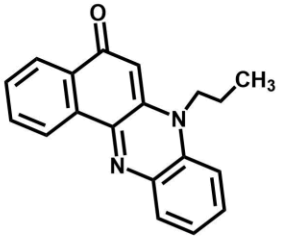
CI_{50} = 72,5 mM

(416)



CI_{50} = 146,6 mM

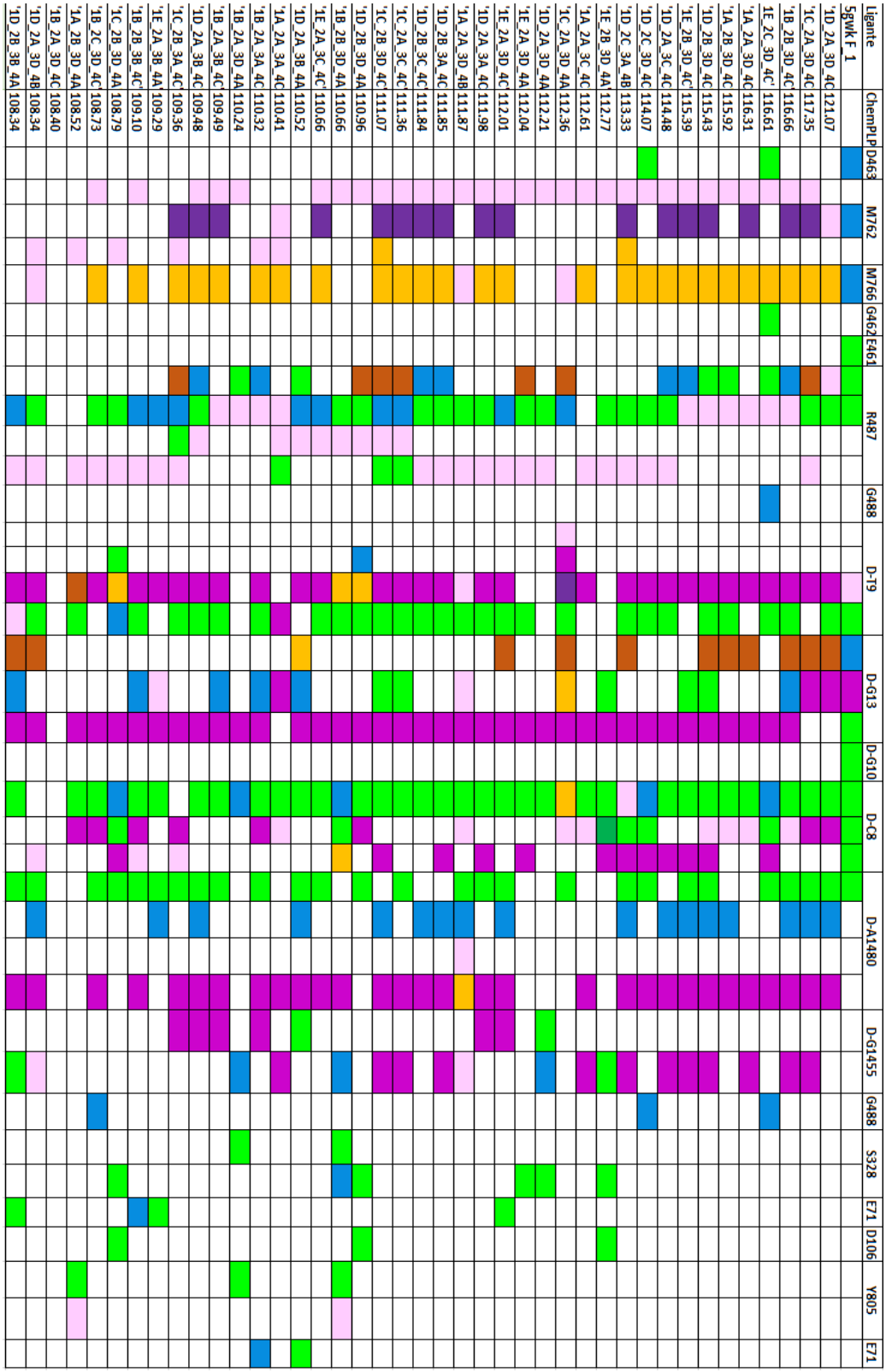
(418)



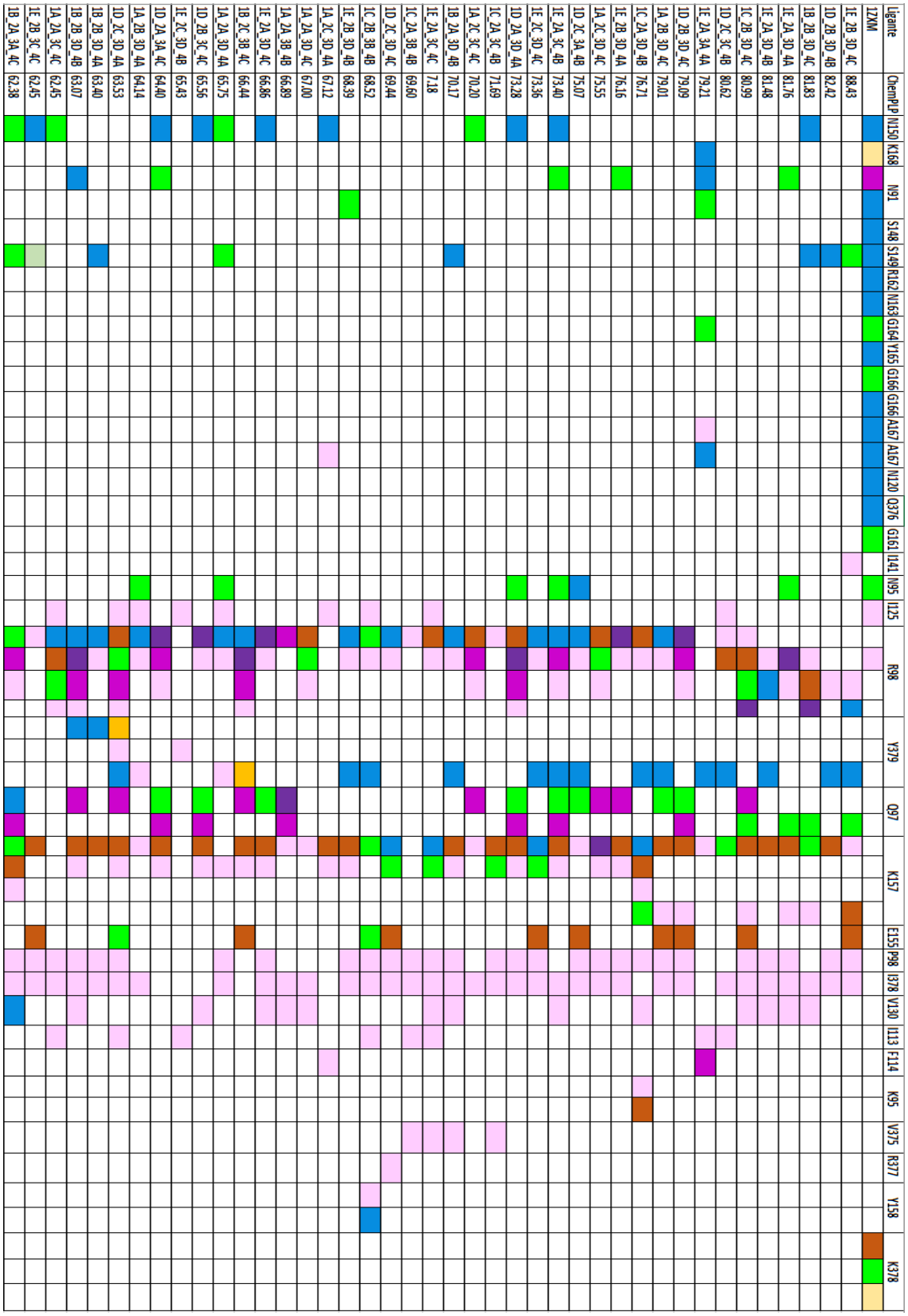
CI_{50} = 32 mM (HL-60)

(420)

9.5) Anexo 5: Interações das 40 melhores poses da ancoragem molecular (PDB id:5GWK)



9.6) Anexo 6: Interações das 40 melhores poses da ancoragem molecular (PDB id: 1ZXM)



MEDWIN PUBLISHERS
Committed to create value for Researchers

Medicinal & Analytical Chemistry International Journal
ISSN: 2639-2534

Phosphine- and Isatin-Copper Complexes: Anticancer Activity, Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship Examples from the Last Ten Years

Vieira MA[1,2], Farias RL[2], Netto AVG[2] and Nascimento-Júnior NM[1]*

[1]Department of Organic Chemistry, São Paulo State University, Brazil

[2]Department of General and Inorganic Chemistry, São Paulo State University, Brazil

Review Article

Volume 3 Issue 2

Received Date: July 15, 2019

Published Date: July 31, 2019

DOI: 10.23880/macij-16000142

***Corresponding author:** Nailton M Nascimento-Júnior, Laboratory of Medicinal Chemistry, Organic Synthesis and Molecular Modeling (LaQMedSOMM), Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University-UNESP. Rua Professor Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha, 14800-060, Araraquara, São Paulo, Brazil, Tel: +55 16 3301-9897; Email: nailton.monteiro@unesp.br

Abstract

Platinum-based metallodrugs candidates are extensively evaluated as antineoplastic agents against several tumoral cell lines, representing a considerable advance in cancer treatment. On the other hand, the hostile off-site toxicity has been limited their potential uses in clinical step. Thus, the search for novel active and selective antitumor drugs is a leading issue in the medicinal inorganic chemistry. As follow, the research focused on less toxic metals has strategic importance and several copper complexes have revealed promising activity. In addition, copper is an essential metal, which can increase the chances of reduced side effects. This review brings some copper complexes that showed highlighted anticancer activity as drug prototypes from the last ten years (2010-2019), involving phosphine and isatin ligands, different redox states, modes of action and the study of structure-activity relationship (SAR).

Keywords: Copper Complexes; Anticancer Activity; Phosphine; Isatin; Structure-Activity Relationship

Abbreviations: SAR: structure-activity relationship, Ctr: Copper transporter, SOD1: Superoxide Dismutase 1, ROS: Reactive Oxygen Species, SI: Selectivity Index, UPS: Ubiquitin-Proteasome System, MDR: MultidrugResistance, MM: Molecular Modeling, CEA: Carcinoembryonic Antigen.

Introduction

Copper is an essential element with vital roles in several biological processes in the body. This metal can be found in metalloenzymes acting as cofactor. The two more suitable redox states, Cu(I) and Cu(II), as well as the tetrahedral, square-planar and octahedral geometries around the metal center, make copper an attractive metal for design of novel metallodrugs [1,2]. Even though this metal possesses two accessible redox states, the cell uptake of copper species into eukaryotic cells occurs by members of the Ctr copper transporter family (Figure 1) [3].

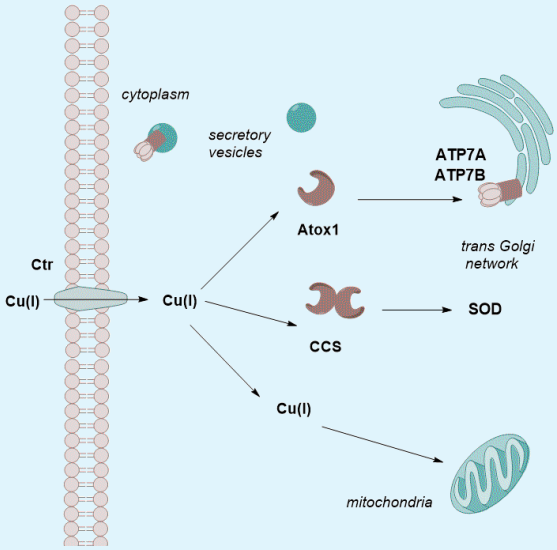


Figure 1: Copper uptake pathways in human cells (adapted from Boal & Rosenzweig, 2009).

Copper transporter (Ctr) proteins comprise the cell cooper absorption system in eukaryotes. They are identified in yeast, plants and humans (hCtr1), containing three transmembrane segments with carboxyl and amino terminal located on opposite site of the plasma membrane. As represented in Figure 1, the delivery of copper to the Cu, Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) is by the copper chaperones for superoxide dismutase (CCS). Primarily, in the cytosol, occurs the metalation of SOD1, however, a minor quantity of SOD1 is also restricted to the mitochondrial intermembrane space, when superoxide dismutase is present.

The SOD1 catalyzes the conversion of superoxide ion to molecular oxygen and hydrogen peroxide (Equations 1 and 2). Superoxide dismutase's (SODs), for example, belong to the family of isoenzymes connected in the scavenging of free O2 radicals occurred in respiratory chain. One of the cellular protection systems from oxidative damages is the SOD1 [4].

Equation 1:

$$SOD\text{-}Cu^{2+} + O_2^{-} \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{+} + O_2$$

Equation 2:

$$SOD\text{-}Cu^{+} + O_2^{-} + 2H^{+} \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

The proper function of important metalloproteins can be affected by redox activity of copper (Cu). The Cu is bound to albumin, ceruloplasmin (glycoprotein produced in liver) and transcuprein (a macroglobulin), all in the blood. The genetic disorders can be reflective of unappropriated Cu homeostasis. In humans, the copper concentration is controlled at the cell and organ levels. The cooper distribution occurs in the liver via ceruloplasmin and albumin proteins when it is earlier absorbed in the small intestine and stomach. The human Cu dietary is recommended between 1.5 and 3.0 mg Cu/day [5]. Regarding to the redox states, the Cu(II) ion is typically found in the blood, while the cell uptake mechanism involves the reduced Cu(I) form.

Copper is important for antioxidant activity, collagen synthesis, iron transport (the both metabolisms are tightly linked) and lipid peroxidation. The lack or overload of copper concentration can be responsible by declining hematopoiesis by means of anemia and leukopenia (neutropenia), bone abnormalities, myelopathy, optic neuropathy, growth and progression of cardiovascular diseases, among others. Likewise, the reduction of Cu absorption in the blood causes genetic disease, for instance, Menkes syndrome (mutation in the gene encoding ATP7A). On the other hand, the excess of Cu on liver and brain tissues can origin to Wilson disease (mutation in the gene ATP7B 2). Including other human diseases associated to no regulation of Cu concentration are Alzheimer, Parkinson (both neurodegenerative disorders), ulcers, diabetes and cancer.

Concerning cancer, the Fenton reaction with formation of reactive oxygen species (ROS) is also linked to excess of free Cu ions [6]. Breast and prostate tumoral cells contain higher concentrations of Cu than normal cells. The level amounts to 1.67µg Cu/ mL in serum of tumor breast cells line and 0.98µg Cu/ mL in healthy breast cells control. However, the molecular mechanisms of Cu increasing of tumor cells are not totally elucidated yet. One hypothesis can be associated with the process of copper in angiogenesis.

Copper and Production of Reactive Oxygen Species (ROS)

Living aerobic species have molecular oxygen as fundamental molecule in cell breathing. The breathing sequence affords photo-sensible peroxides, superoxide, singlet oxygen, and hydroxyl radical active species (Fenton reaction). In the presence of UV light, an electron

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

is promoted from fundamental state (S_0) to excited empty state (S_1) (also, to an excited triplet state), generating an unstable and energetic chemical compound contain oxygen [7].

The copper can bring oxidative stress in Fenton reaction, since Cu(II) ion can suffer reduction in presence of superoxide radical to form a Cu(I) ion and a molecular oxygen. In sequence, the production of hydroxyl radical species can be catalyzed by Cu(I) ions. Thus, the ROS level can significantly increase. There are critical biological processes that are affected by abnormal production of ROS, mainly the programmed cell death (apoptosis), mutation in the biomolecular structure of DNA (AT-GC and GC-AT), changes in cell motility, and disturbs in cell signaling by irreversible oxidation of key proteins. In addition, endogenous cooper complexes play vital role in biological processes, mainly oxygen and electron transfer and oxidative DNA damage, both related with elderly and cancer [7,8].

Cancer

Cancer can be defined as a group of diseases where mutant cells undergo excessive proliferation. After disruption of basal membrane, the tumor cells access the blood system and can extent to other tissues of the body (metastasis) [9]. Cancer has been increasingly investigated for being considered the second cause of death in the world. The WHO reported that occurs at least 14 million of new cases/year being 8.8 million of deaths, which have represented US$ 1.16 trillion of costs in public health and loss of productivity [10,11].

The most important landmark for therapeutic of cancer in the 20th century was the discovery of the neoplastic activity for cisplatin. The free Pt(II) ion is high toxic for human cells, but when further coordinated to ammine and chloride ligands, $[PtCl_2(NH_3)_2]$, became to an extremely effective metallodrug to treat a diversity of cancers, for instance, testicular cancer. Unfortunately, the administration of this platinum metallodrug is still limited by its aggressive adverse effects, due to its low selectivity index [10-12].

The variety of coordination numbers, redox states, geometries, and intrinsic properties of cationic metal ions are great features for the design of therapeutic agents. Metals, such as Ru(II), Pt(II), Pd(II) and Cu(I) and Cu(II) have been extensively studied for the development of metal-based complexes over last decades [13]. Among them, copper-based complexes have aroused much attention since many of them have exerted their anticancer activities with promising selectivity index.

Copper Complexes as Anticancer Agents

Copper-based complexes have been investigated because endogenous metals may promote less side effects in comparison with cisplatin. The mechanisms of action of copper complexes can occur by degradation of DNA, topoisomerase and/or proteasome inhibition. The biological activities of these complexes have been attributed to the synergism between the Cu(I) or Cu(II) metal ions and their ligands. Thus, several ligands for various copper complexes can be explored to find candidates for cancer treatment. As follows, an important feature concerns the oxidation state of copper metal center. Even if Cu(I) species are found in Ctr proteins to active internalization of biological copper in mammalian cells, this same Cu(I) as antitumor agent is rarely found because it is difficulty to stabilize, especially in aqueous environment. So, Cu(I) is easily oxidized to Cu(II) in most part of applications. Therefore, when Cu(I) ions are handled for design of new active complexes, where ligands able to establish robust metal-ligand bond with Cu(I) are mandatory. In this context, the phosphines have been used to prevent the hydrolysis and degradation of the complexes. In addition, soft donor base, such as S-, P-, C-atoms and aromatic amines have preference to bond soft Pearson acids, such as Cu(I). These complexes are frequently four-fold coordinated assuming generally tetrahedral geometry. This spatial orientation is preferred by means of its [Ar] $3d^{10}$ electronic configuration.

Instead, there are much more Cu(II)-based complexes as anticancer agents in literature, because Cu(II) is chemically more stable in aqueous environment. Then, in different Cu(I)-based complexes, a high number of ligands can be exploited [14]. Others types of Cu(II) complexes, with general formula $Cu[(N\text{-}N)(A\text{-}A)]NO_3$, where N-N represents a diamine donor-like (phen or bipy) and A-A stands for amino acid, have showed both *in vitro* and *in vivo* antineoplastic activity [15]. Moreover, Cu(II)-based complexes containing aromatic heterocyclic ligands have aroused particular attention for the detection of their genotoxic activity. Herein, the ion complex $[Cu(phen)_2]^{2+}$, with planar geometry ligand, exhibited strong interactions to DNA double-helix by intercalation [16].

In view of that, this review explores some copper complexes in two different oxidations states, including

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

phosphine and isatin moieties, as examples of promising ligands to reach anticancer activity.

Phosphine (Derived) Ligands

Taking into account the π-acid profile, the phosphine ligands strongly bind to electron-rich d^{10} metal ions, such as Zn(II), Ag(I) and Cu(I). As follows, regarding to the drug response in tumor cells and normal ones, the structure-activity relationship studies have shown direct association between hydrophilic/lipophilic properties of phosphine ligands and the magnitude of selectivity index (SI) for these complexes. Accordingly, different range of solubility can be acquired by the choice of an appropriated phosphine ligand [1,17]. Among a plethora of suitable ligands that are able to stabilize a specific redox state of metal ions, phosphines are the most attractive category of ligands. As follows, these P-donor ligands may stabilize Cu(I) complexes, which have been explored as antitumor agents as well as to form other hydrophilic soluble complexes [18]. The use of phosphine-derived ligands in medicinal inorganicchemistry has given metal-based complexes with promising anti-arthritic, anti-inflammatory and anticancer activities [19].

In vitro cytotoxic activities of Cu(I) and Cu(II) complexes containing phosphine fluoroquinolone derivatives as ligands were performed by Bykowska and Komarnicka [20]. In this study, the Cu(I) cations are four-fold coordinated in a tetrahedral geometry by one P atom from phosphine ligand, one iodide anion and two N-atoms from dmp ligand, resulting in a five-membered metallaring, Figure 2 (1,2). Instead, the Cu(II) cations are coordinated by the quinolone fragment in OPCp or OPNr ligands, that are acting as k^2O,O-donors, forming six-membered metallarings and two N-atoms from phenanthroline (phen). Each Cu(II) cation is four-fold coordinated in a square-planar environment, Figure 3 (3, 4).

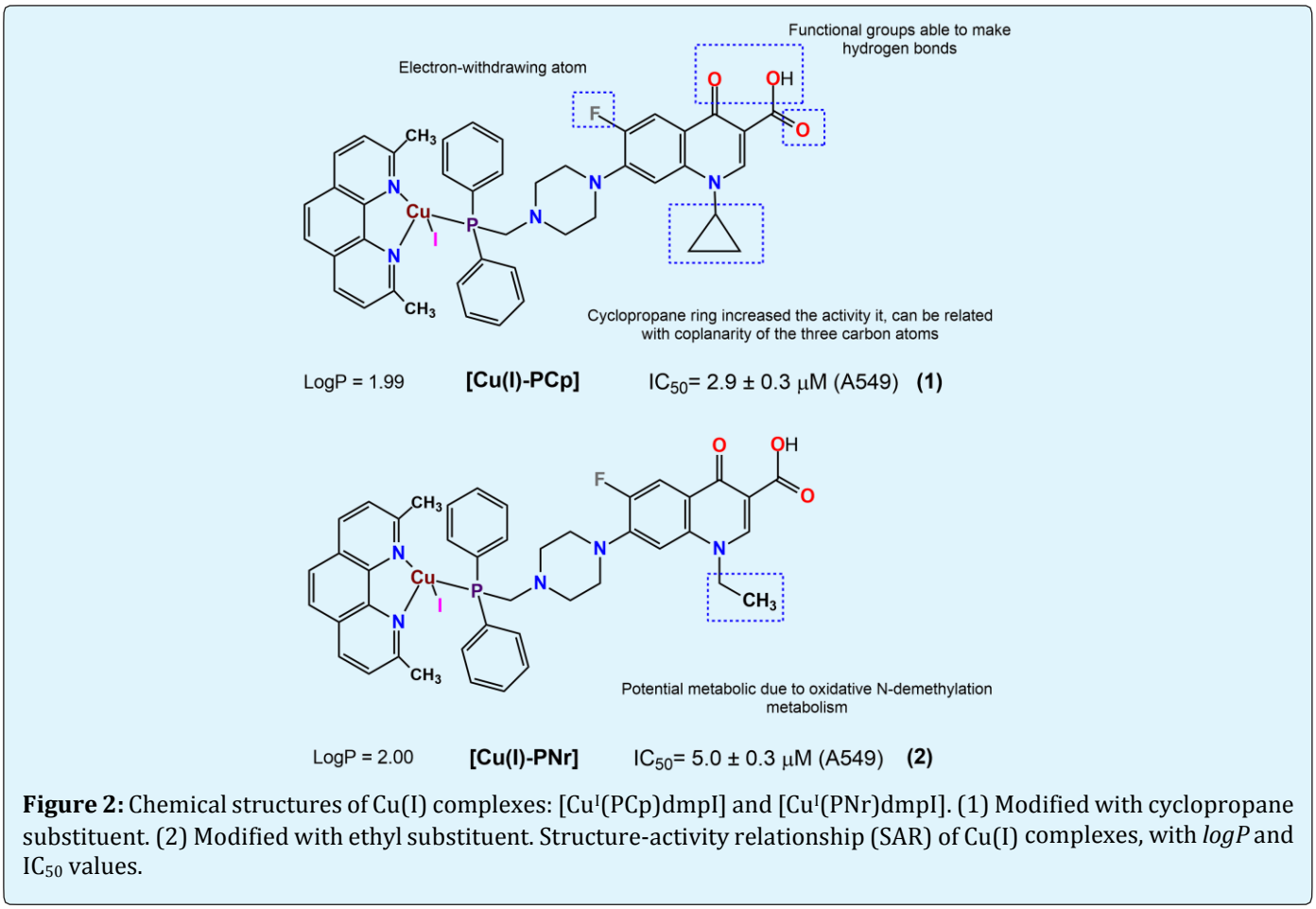


Figure 2: Chemical structures of Cu(I) complexes: [Cu^{I}(PCp)dmpI] and [Cu^{I}(PNr)dmpI]. (1) Modified with cyclopropane substituent. (2) Modified with ethyl substituent. Structure-activity relationship (SAR) of Cu(I) complexes, with *logP* and IC_{50} values.

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

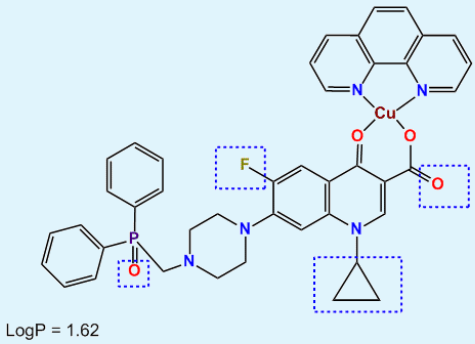


Figure 3: Chemical structures of Cu(II) complexes $[Cu^{II}(OPCp)phen]^+$ and $[Cu^{II}(OPNr)phen]^+$. (3) Modified with cyclopropane substituent. (4) Modified with ethyl substituent. Structure-activity relationship (SAR) of Cu(II) complexes, with *logP* and IC_{50} values.

The tumor cell lines A549 (human lung) and CT26 (mouse colon) were used to screening the ability of all compounds to inhibit the cell viability via MTT assay. Also, the DNA-affinity of them was assessed by means of fluorescence staining, flow cytometry and gel electrophoresis methods. As a result, the Cu(I) complexes were more active than Cu(II) derivatives in both tumor cell lines. These complexes induced apoptosis, in prevalence. In addition, all cooper complexes appear as DNA-binding metallo-intercalators into two different modes. The Cu(II) complexes damaged the plasmid DNA in the presence of ROS, while the Cu(I) derivatives triggered single-strand breaks on DNA backbone chain. Remarkably, the free ligands did not present significant DNA-affinity. The calculated *logP* values revealed that $[Cu^{II}(OPCp)phen]$ (3) and $[Cu^{II}(OPNr)phen]$ (4) possess more hydrophilic profile when compared with more hydrophobic complexes: $[Cu^{I}(PCp)dmpI]$ (1) and $[Cu^{I}(PNr)dmpI]$ (2) (Figure 2&3). It is hypothesized that Cu(I) complexes had efficient uptake through lipid cell membrane than Cu(II) derivatives.20 Therefore, the structure-activity relationship (SAR) analysis disclosed that cytotoxic profile of the Cu(I) compounds isdependent on the lipophilic property of the fluoroquinolone ligand [21].

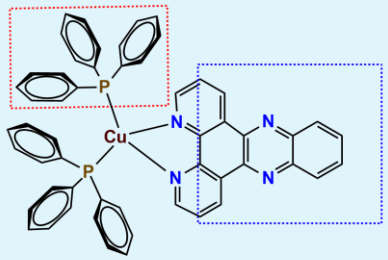
Still concerning the SAR analysis, the absence of ethyl group and fluorine atoms on piperidone and fluoroquinolone rings, respectively, can be the reason of increasing activity. The ethyl group has established prospective metabolic availability due to oxidative N-demethylation pathway [22]. Likewise, cyclopropyl group on piperidone ring appear as an auxophore moiety, as observed in 1 and 3. The enhanced π-characteristic regarding to the coplanarity, decreased C-C bonds distances, and increased polarity of C-H bonds rather than in alkane derivatives (2 and 4), result on increased bioavailability. The fluorine atoms have strong electron-

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

withdrawing properties, so they exert influence on special orientation, pKa, membrane permeability, and pharmacokinetic properties [23]. In addition, each hydrogen bonding-donor/acceptor O-atom supports the water solubility and increases the molecule hydrophilicity [24,25].

The Cu(II) complexes, 3 (IC_{50} = 8.3 ± 1.7 μM) and 4 (IC_{50} = 15.9 ± 2.1 μM), are less active than Cu(I) complexes 1 (IC_{50} = 2.9 ± 0.3 μM) and 2 (IC50 = 5.0 ± 0.3 μM). For the Cu (I)-based complexes, the mechanism is related with breaks of the backbone and DNA interactions, through redox reactivity involving ROS generation. In Cu(II) complexes, the mechanism can be associated with ROS amount inside the cells.

Villarreal and collaborators synthesized a Cu (I)-phosphine polypyridyl metal complex, where the Cu(I)-metal center is four-fold coordinated by two P-atoms from PPh_3 ligand and two N-atoms of the dppz ligand. The complex display a general formula [Cu $(PPh_3)_2$ (dppz)]NO_3 (5) (Figure 4) [26].



[Cu(PPh$_3$)$_2$ (dppz)]NO$_3$ IC_{50}= 0.78 ± 0.04 μM (DU-145) **(5)**

Figure 4: Chemical structure of Cu (I) complex with IC50 value in human prostate cell line (DU-145).

In this work, the binding constant (k_b) of complex 9 with *Calf thymus* DNA (ct-DNA) measured 1.80 ± 0.17 (x 10^4mol L^{-1}). This data supported a reversible interaction concerning the complex 9 and ct-DNA allied to intercalative mode. This similar intermolecular contact was observed during crystal packing analysis for dppz ligand (blue-square in Figure 4). Moreover, the PPh3 groups (red-square in Figure 4) were chosen to avoid the kinetic instability [27].

Thus, the cytotoxicity of the complexes was evaluated by MTT assays in different types of tumoral cells, such as A549 (human lung), DU-145 (human prostate), MCF-7 (human breast) and the non-tumor cells lines V79-4 (Chinese hamster lung), as well as MRC-5 (human lung). The complex 9 showed IC_{50} (μM) values: 0.36 ± 0.01 (A549); 2.63 ± 0.25 (MCF7); 0.78 ± 0.04 (DU-145); 0.34 ± 0.04 (V79-4) and 0.52 ± 0.02 (MRC-5), which supported its powerful cytotoxicity. In all tested cell lines, the ligands showed no drug response at IC_{50} >50μM, therefore considered inactives.

In another study of Marzano and collaborators, Cu(I)-based complexes (Figure 5) containing tridentate tris(pyrazolyl)borate and tertiary phosphine ligands: [HB(pz)$_3$]-Cu(PCN) (6), and [HB(3,5-Me$_2$pz)$_3$]Cu(PCN) (7), where HB means tris(pyrazol-1-yl) borate, were founded out as promising drug candidates [28]. The poly (pyrazolyl) borates (HB), presented in green square in 6, were chosen for the chemical stabilization of metal complexes [29]. The alkyl chain bonded in phosphine atom (represented in red square in 6) increased lipophilicity, while the CN substituents increased inhibition [30].

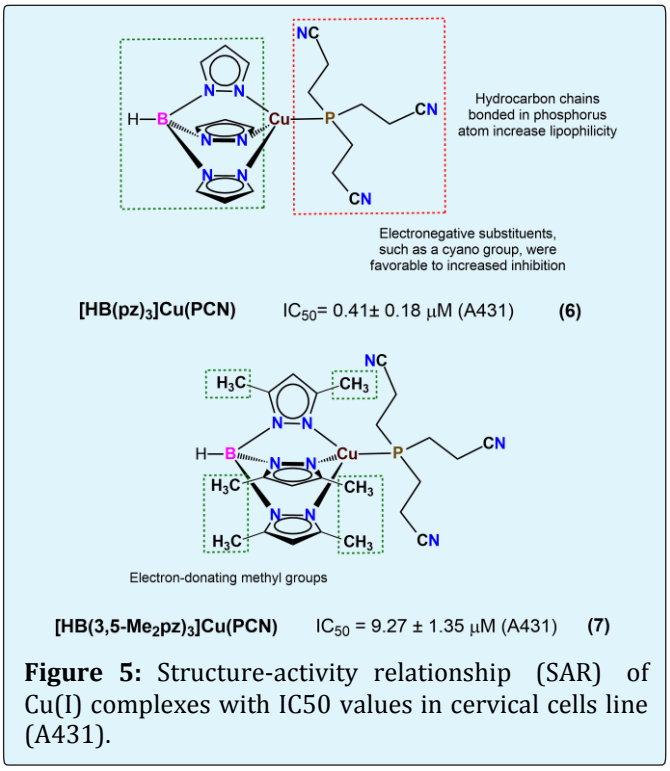


Figure 5: Structure-activity relationship (SAR) of Cu(I) complexes with IC50 values in cervical cells line (A431).

The electron-donating methyl groups in the pyrazolyl moieties of the [HB(3,5-Me$_2$pz)$_3$]Cu(PCN) (green squares in 7) resulted in significant reduction of the *in vitro* antitumor activity. The antiproliferative activity for the Cu(I) complexes were tested against human tumor cell

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

lines of, colon (HCT-15), breast (MCF-7), melanoma (A375), cervical (A431), pancreatic (BxPC3), lung (A549), and neuroblastoma (SHSY5Y). The IC_{50} values were calculated by MTT assay after 72 hours of incubation with the complexes. The values obtained for 6 (in μM) are: 0.73 ± 0.17 (MCF7); 0.41 ± 0.18 (A431); 0.99 ± 0.54 (HCT-15); 0.65 ± 0.23 (A375); 0.62 ± 0.46 (BxPC3); 0.77 ± 0.83 (SHSY5Y) and 0.84 ± 0.25 (A549). In the same context, for 7 the values of IC_{50} are: 8.02 ± 2.36; 9.27 ± 1.35; 10.15 ± 1.57; 5.63 ± 1.25; 5.74 ± 2.15; 5.36 ± 1.19 and 10.08 ± 2.54, respectively. In addition, 6 were more effective against tumor the cell lines than cisplatin. A similar behavior is observed for phosphine-copper (I) complexes, where a different modus operandi from cisplatin can be observed. In addition, the use of phosphine donors can stabilize reduced copper (I) species, which are commonly incorporated by eukaryotic cells.

In the work by Santini and collaborators, three sequence of water soluble complexes with tetrahedral geometry (Figures 6 & 7), named $[M(thp)_4]^+$ (THP: tris(hydroxypropyl)phosphine), $[M(thpp)_4]^+$ (THPP: tris(hydroxypropyl)phosphine) and $[M(PTA)_4]^+$ (PTA: 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane), where M = Cu(I), Ag(I) and Au(I), were tested. The Cu(I) complexes were always found to be the most effective against human breast (MCF-7), lung (A549), colon (HCT-15), cervix(HeLa) and melanoma (A375) cell lines. The IC_{50} (μM) for $[Cu(thp)_4]PF_6$ (8) was 9.11 ± 2.71 (A549), $[Cu(thhp)_4]PF_6$ (9) was 18.22 ± 2.11 (A549) and $[Cu(PTA)_4]PF_6$ (10) was 17.40 ± 1.76 (A549). The best value found to colon cells (HCT-15) for 8 (IC_{50} = 2.00 ± 0.03). Among the tested compounds, metal-THP species present better cytotoxic activity than metal-PTA and metal-THPP. The calculated *logP* specified that all tried complexes were hydrophilic in nature sorted as 8 (logP= -1.23) > 10 (*logP*= - 0.97) > 9 (*logP*= - 0.62), which can be related with antiproliferative activity of the complexes.

The SAR (Figures 6 and 7) revealed that the presence hydroxyl groups in 8 and 9 increased hydrophilicity. In a more acid cancer tissue, the most active aqua-form of PTA would be predominant through introduction of electron-withdrawing groups [31]. Herein the absence of these in PTA complexes could explain no significant IC_{50} values. Thus, the decreasing lipophilicity of a molecule is an effective approach to design active Cu (I) complexes with hydrophilic tertiary phosphine ligands. In this context, the copper complexes are promising when compared with other metal complexes with phosphine derived ligands. Furthermore, the cytotoxic effects of these copper complexes have proven to induce damage in ubiquitin-proteasome system (UPS). The UPS is a key mechanism in which eukaryotic cells degrades proteins to preserve the protein homeostasis. In normal cells, the natural load of degraded substrates is in equilibrium with the cell UPS. Instead, regarding the cancer cells this load is amplified for the reason of the overexpression of modified proteins [32-34].

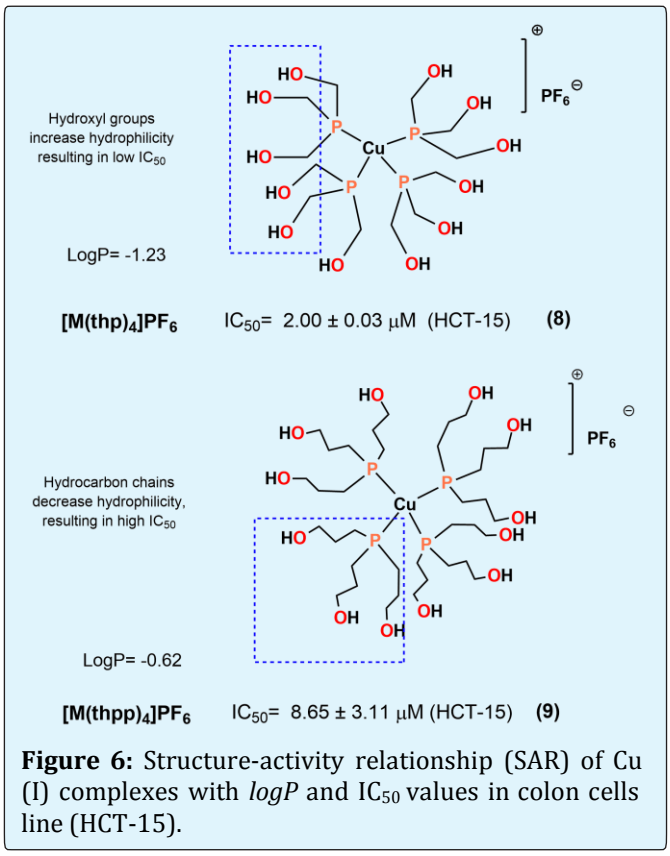


Figure 6: Structure-activity relationship (SAR) of Cu (I) complexes with *logP* and IC_{50} values in colon cells line (HCT-15).

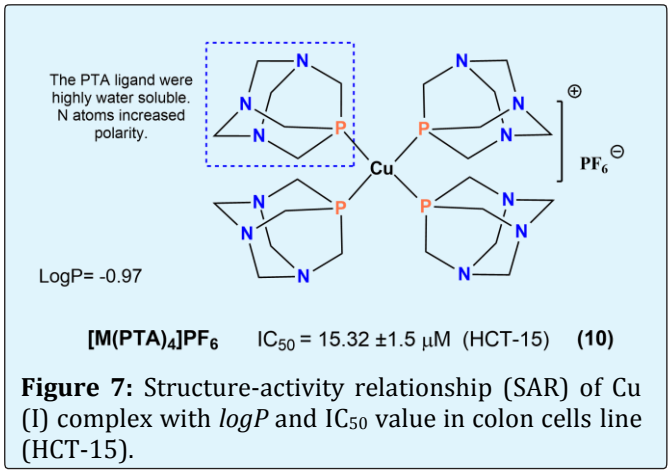


Figure 7: Structure-activity relationship (SAR) of Cu (I) complex with *logP* and IC_{50} value in colon cells line (HCT-15).

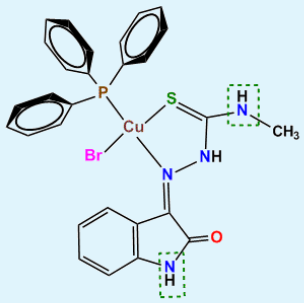
Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

Isatin Derived Ligands

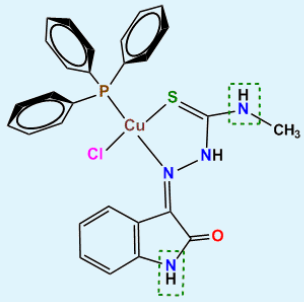
Isatin (2,3-dioxindole) is an important heterocyclic moiety, structurally related with the indole privileged structure. In addition, isatin is also a privileged substructure for the design of novel molecules [35]. Some biological activities for derived compounds found in literature are antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, anti-mycobacterial, anticonvulsant, antiviral, anthelmintic, antioxidant, and CNS depressant effects [36]. Among these, undoubtedly the antitumor activity has been defined as more evident, mainly for halogenated isatin-derivatives [37]. Then, complexes containing these worthy biologically active scaffolds cover a remarkable class of compounds for design of novel target-specific drugs. In fact, many copper complexes of isatin Schiff-base ligands exhibit a wide range of pharmacologic properties, such as antimicrobial, antibacterial, antifungal and antitumor [38-42]. Complexes formed by N^1-substituted- isatin-3-thiosemicarbazone and Cu(I) halides were reported by Sharma and collaborators, as represented in Figure 8 [43]. Isatin-thiosemicarbazone ligands are described as k^2N,S- or k^3O,N,S-donors. The isatin-β- thiosemicarbazone has been recognized to be more selective to promote selective cell death to overexpressing P-glycoprotein cells. The P-glycoprotein is a key carrier in multidrug resistance cells (MDR) [44].

In the complex 11, Cu(I) ion is four-fold coordinated in a distorted tetrahedral environment. The metal center is connected by one bromide, one P atom from triphenylphosphine and one neutral isatin-N^1-methyl-thiosemicarbazone that act as k^2N,S-donor. The complex 12 differs from the former only by the halide ligand. These Cu(I)-compounds were screened in human tumor cell lines L123 (lung) and HepG2 (liver) to check their cytotoxicity profile. The IC_{50} values for complexes 11 and 12 ranged at 8.31-25.50 μM (L123) and 18.65–25.50 μM (HepG2), respectively. These data showed the influence of the electron-withdrawing effect from halide ligand, i.e., the higher electron-withdrawing properties of bromineatom than chloride one influence in cytotoxic efficiency.

The Cu (I)-complexes [CuBr(N^3,S-H_2itsc-N^1-Me)(Ph_3P)] (11) and [CuCl(N^3,S-H_2itsc-N^1-Me)(Ph_3P)] (12) are shown in Figure 8. In addition, chlorine atom presents an electron-withdrawing property higher than bromine atom,resulting in changes of pKa, membrane permeability, preferential orientation, potency and pharmacokinetic properties, as well as in better inhibition, with the lowest IC_{50} value.



[CuBr(N^3,S-H_2itsc-N^1-Me)(Ph_3P)] IC_{50}= 25.50 μM (HepG2) **(11)**



[CuCl(N^3,S-H_2itsc-N^1-Me)(Ph_3P)] IC_{50}= 18.65 μM (HepG2) **(12)**

Figure 8: Cu (I) complexes with bidentate N^3,S-chelating ligand. The IC50 values was done by MTT assay, as represented for hepatocellular carcinoma cells (HepG2).

Molecular modeling (MM) studies are extremely useful for better understanding of the correlation between drug candidates and their biological interactions [45]. The docking studies of the complexes to MFE-23 (anti-carcinoembryonic antigen, PDB ID 1QOK) indicated the promising anticancer activity for them. The MFE-23 is an important antibody used as biomarker of carcinoembryonic antigen (CEA). Thus, several research groups have put efforts to design antitumor drugs with MFE-23-affinity. Based on MM studies, it was observed that H-donor group NH (green squares in Figure 8) forms hydrogen bonding interactions with O atom from side chains of glutamine (Q249) and tyrosine (Y247) residues. Likewise, NH group, showed hydrogen bonding contacts with S atom of cysteines (C248 and C184) and N atom of tryptophan (W195) residue.

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

On the other hand, the Cu(II) complexes can be used to cleave the DNA via oxidative pathway. In this case, in the work of Teoh and contributors, Cu(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives demonstrated this capacity [46]. Each Cu(II) metal center is bonded by one tridentate k^3O,N,S-donor ligand, one chloride anion and the metals are linked each other through two sulfide bridges comprising a binuclear complex. Each metal center is embedded in a distorted square pyramidal environment. Their activity in the human colorectal carcinoma cell line (HCT116) is represented in Figure 9.

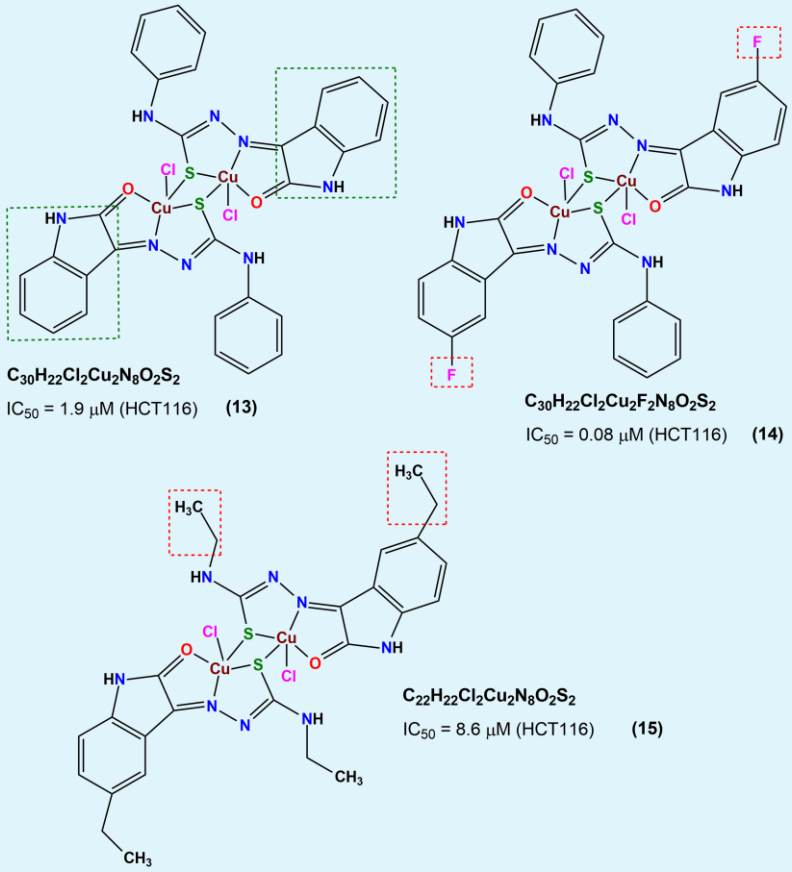


Figure 9: Binuclear Cu(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives. The IC_{50} values were obtained out by MTT assay, as represented for colorectal carcinoma cell line (HCT116).

These binuclear Cu(II) complexes demonstrate the biological importance of indole moiety for activity, highlighted in green squares (Figure 9). In addition, as evidenced in red squares in 14, the fluorine atom, with strong electron-withdrawing properties, resulted in high inhibition of tumor cells growth.23 In the case of complex 15, the presence of alkyl group as substituent resulted in decreased potency [47].

Furthermore, the cleavage DNA via oxidative pathway is observed. The complexes were incubated with H_2O_2 and DNA was degraded. These results support that Cu(II) complexes can cleavage plasmid DNA (pBR322 DNA) via ROS formation. The reduction of H2O2 into hydroxyl radical by the oxidation of transition metal complexes can damage DNA structure by strand-chain breakage. In this case, this process occurs through the redox conversion into Cu(II)/Cu(I) species [48-51].

In different analysis about targets, Bulatov and collaborators, reported the pharmacological evaluation of isatin-Schiff base analogues and its Cu(II) complex in

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

different tumor cell lines by assessing their effects on cellular metabolism, real-time cell proliferation and toward p53-positive in MCF7 cells. Also, it was promoted p53-dependent gene expression inducing apoptosis. The tumor suppressor of p53 normally reduces the efficiency to arrest damaged cells from perpetrating their genetic errors into future generations. In fact, p53 is the most altered gene in cancer. The inactivation of tumors suppressors occurs in most types of human cancers [52,53].

Thus, the work, as represented in Figure 10, explored potential antitumor properties of Cu(II) complex 17 inp53-positive tumors, such as breast cancer (MCF7) cell line. To validate p53 associated effects of Cu(II) complex on tumor cells, a comparison between cells lines in different p53 status was performed, (p53 positive versus p53 negative).

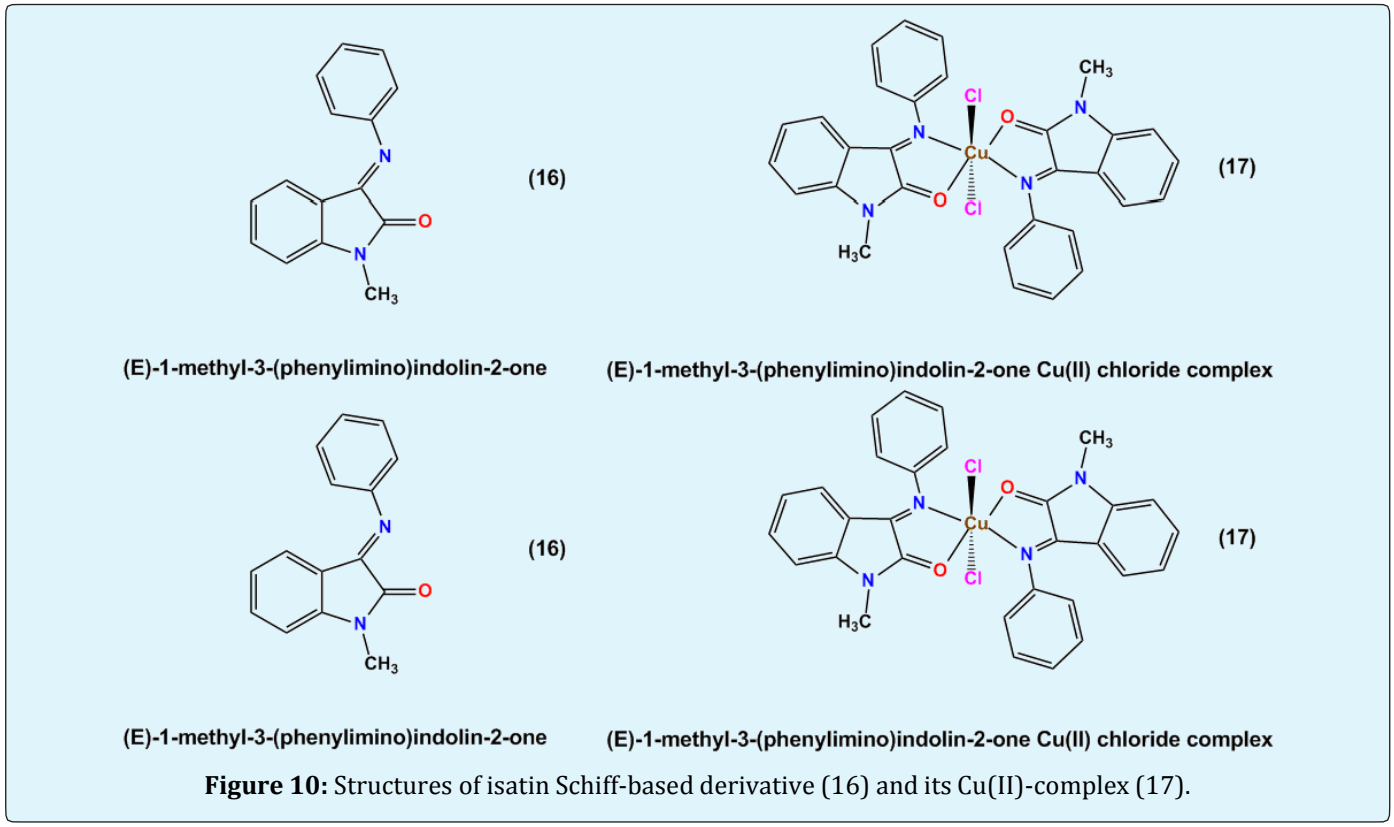


Figure 10: Structures of isatin Schiff-based derivative (16) and its Cu(II)-complex (17).

In this context, the treatment of MCF7 $p53^{WT}$ cells with 17 increased the p53-protein levels. However, ligand 16 did not have effect on p53 activation. These findings suggested the higher cytotoxicity and more reduced proliferation of tumor cells from the complexes than free ligands [54].

The studies with p53 are extremely important in cancer research because this protein family works as tumors suppressor. Since inactivation of tumors suppressors occurs, the apoptosis mechanism is affected. Mutant p53 are expressed by p53-positve and p53- negative. They are performed to act into several important cell pathway, such as regulating cell division and metabolism. Thus, disturbs related with p53 can result in cancer promoting. Because of the loss function of p53, the over-expression of mutant p53 is generally considered as a bad prognosis factor, associated with nodal metastasis [51,55,56]. The Cu(II) complex 22 exhibited improved cytotoxicity toward p53-positive and p53-negative MCF7 cells and induced apoptosis signaling in both p53 MCF7 cells.

As a way to exemplify other applications of copper complexes on inorganic medicinal chemistry, Sreekanth and collaborators, studied 5-methoxyisatin

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

thiosemicarbazones with different N-terminal substituents and their Cu(II) complexes, as represented in Figure 11 [57]. The isatin-derivative ligand acts as a tridentate k3O,N,S-donor to Cu(II). Chloride anion completes a square-planar geometry around the metal center. Three different terminal substituents were chosen: pyrrolidine (18), morpholine (19) and cyclohexyl ammine (20).

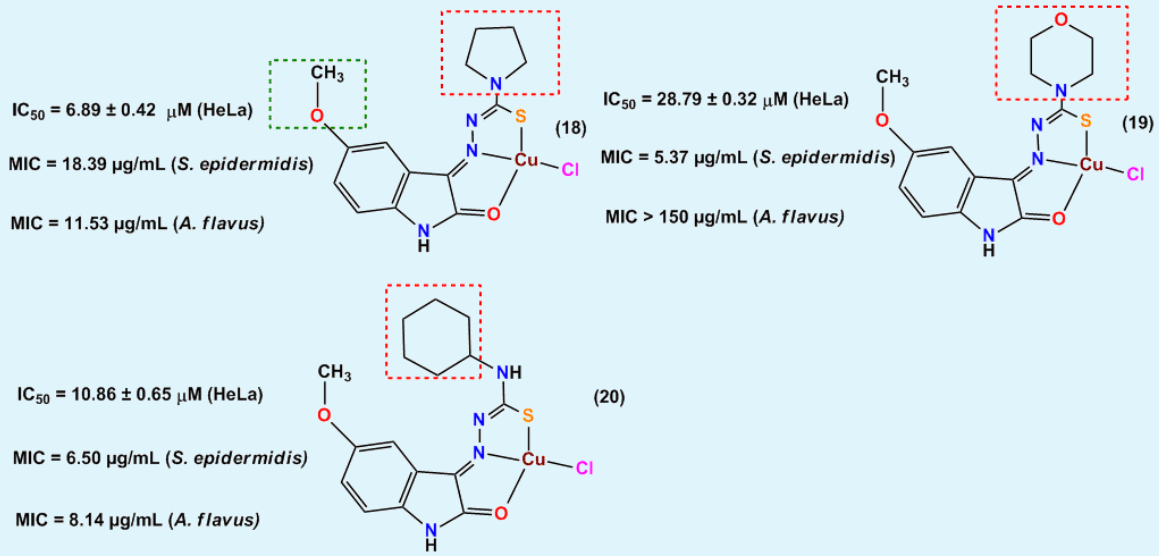


Figure 11: Cu(II) complex with pyrrolidine (18), morpholine (19), and cyclohexylamine (20) as substituent. The IC_{50} values were done by MTT assay, as represented for cervical carcinoma cell line (HeLa).

The complexes 18 and 19 were evaluated for their antifungal, antibacterial, and antitumor activities in *S. aureus, B. subtilis and S. epidermidis (Gram-positive), E. Coli, P. aeruginosa and P. Vulgaris (Gram-negative), A. niger, A. flavus, F. solani, C. albicans and C. lunata* and HeLa (cervical), A549 (lung), MCF-7 (breast) and HEK293 (normal embryonic kidney).

The Cu(II) complex 18 was the most active against tumors cells. It exhibited wide range of wide range of activity in MCF-7, A549 and HeLa cells, presenting IC_{50} = 14.83 ± 0.45 μM, 17.88 ± 0.16 μM and 6.89 ± 0.42 μM, respectively. Doxorubicin was used as control. For Cu(II) complex 19 the IC_{50} values obtained was 49.38 ± 0.16 μM, 55.52 ± 0.63 μM and 28.79 ± 0.32 μM, respectively in MCF-7, A549 and HeLa. As highlighted in red square for complex 18, the pyrrolidine substituent is more hydrophobic than cyclohexyl substituent from complex 20 (MCF-7, A549 and HeLa, with IC_{50} values 25.02 ± 0.51 μM, 64.97 ± 1.06 μM and 10.86 ± 0.65 μM, respectively), due to the absence of the protic hydrogen (NH). Additionally, the authors concluded that the highestactivity against tumor cells of complex 18 can be explained because of its greater hydrophobic nature in comparison with complexes 19 and 10. The compound 18 can interact with the hydrophobic center of DNA more effectivelly.46 On the other hand, the complex 20 showed promising potency as antimicrobial drug against *B. subtilis* (MIC: 10.35 μg/mL), *S. aureus* (MIC: 8.56 μg/mL), *P. aeruginosa* (MIC: 21.36 μg/mL), *S. epidermidis* (MIC: 6.50 μg/mL), and *P. vulgaris* (MIC: 17.64 μg/mL) in comparison with ciprofloxacin. The presence of H atom at N4-position makes the complex less lipophilic. Additionally, possible H-bonding contacts from this moiety (red square, in 20) can be the reason of activity against bacteria. Regarding the antifungal activity data, the complex 20 had better results against *A. niger* (MIC: 11.67 μg/mL), average activity in *C. albicans, A. flavus, and C. lunata* (MIC: 17.56 μg/mL, 8.14 μg/mL, and 14.38 μg/mL, respectively), compared to standard Nystatin and the other complexes 18 and 19. It is also important to highlight that the methoxy group (in green square, Figure 11), as an electron-donating group, can increase the electron density on aromatic ring, resulting on important properties for biological activity [58].

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

Conclusion

Some copper complexes with phosphine and isatin derivates as ligands, studied through 2010-2019 were reported in this review. We have to consider that copper allows different oxidation states, ligands and geometries of the metal center, leading to drug design versatility. In addition, as copper is an essential metal, it increases the chances for obtaining complexes with less side effects.

Copper complexes have different mechanisms of action to induce apoptosis in tumoral cells. For Cu(I)- based complexes the mechanism is related with the break of DNA backbone without redox activity. On the other hand, for the Cu(II)-based complexes, the mechanism can be linked to ROS production inside the cells. In addition, Cu(II)-complex can also bound to DNA by intercalation when planar ligands are used. Some copper complexes can show their cytotoxic effects through ubiquitin- proteasome system (UPS) and inducing mutant p53 for apoptosis. These aspects, combined with SAR information were explored in this review, furnishing suitable features for the design of novel bioactive copper complexes targeting anticancer activity.

References

1. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, et al. (2014) Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. Chem Rev 114(1): 815-862.

2. Englinger B, Pirker C, Heffeter P, Terenzi A, Kowol CR, et al. (2019) Metal Drugs and the Anticancer Immune Response. Chem Rev 119(2): 1519-1624.

3. Boal AK, Rosenzweig AC (2009) Structural Biology of Copper Trafficking. Chem Rev 109(10): 4760-4779.

4. Paolo M, Simona D, Anna S, Mariarosaria S (2016) The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. Front Physiol 7: 594.

5. Festa RA, Thiele DJ (2011) Copper: an essential metal in biology. Curr Biol 21(21): 877-883.

6. Ayoglu H, Sezer U, Akin M, Okyay D, Ayoglu F, et al. (2016) Selenium, copper, zinc, iron levels and mortality in patients with sepsis and systemic inflammatory response syndrome in Western Black Sea Region, Turkey. J Pak Med Assoc 66(4): 447-452.

7. Shobha D, Thulasiram B, Aerva RR, Nagababu P (2018) Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents. J Fluoresc 28(5): 1195-1205.

8. Fu PP, Xia Q, Hwang HM, Ray PC, Yu H (2014) Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. J Food and Drug Anal 22(1): 64-75.

9. https://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/

10. Lavanya M, Jagadeesh M, Haribabu M, Karvembu R, Rashmi HK, et al. (2018) Synthesis, crystal structure, DNA binding and antitumor studies of β-diketonate complexes of divalent copper, zinc and palladium. Inorg Chim Acta 469: 76-86.

11. Muralisankar M, Sujith S, Nattamai S, Bhuvanesh P, Sreekanth A (2016) Synthesis and crystal structure of new monometallic and bimetallic copper (II) complexes with N-substituted isatin thiosemicarbazone ligands: Effects of the complexes on DNA/protein-binding property, DNA cleavage study and in vitro anticancer activity. Polyhedron 118: 103-117.

12. Rashid S (2017) Molecular Mechanism of Carcinogenesis. In: Cancer and Chemoprevention: An Overview, Springer, Singapore, pp: 27-29.

13. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, et al. (2015) Noble metals in medicine: Latest advances. Coord Chem Rev 284: 329-350.

14. Kr̆ikavova R, Vanc̆o J, Travnıc̆ek Z, Buchtík R, Dvořák Z (2016) Copper (II) quinolinonato-7-carboxamido complexes as potent antitumor agents with broad spectra and selective effects. RSC Adv 6: 3899-3909.

15. Ruiz-Azuara L, Bravo-Gómez ME (2010) Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. Curr Med Chem 17(31): 3606-3615.

16. Himasekar Ch, Mustafa S, Manabolu SB (2019) Synthesis, Characterization of Mixed Cu(II) Pyridyl Tetrazoles and 1,10-Phenanthroline Complexes - DFT and Biological Activity. Open Chem J 6: 1-7.

17. Santini C, Pellei M, Papini G, Morresi B, Galassi R, et al. (2011) In vitro antitumor activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

hydrophilic alkyl phosphine ligands. J Inorg Biochem 105(2): 232-240.

18. Kattesh VK, Hariprasad J, Charles JS, Douglas B (1999) Design and Development of Functionalized Water-Soluble Phosphines: Catalytic and Biomedical Implications. Acc Chem Res 32(1): 9-17.

19. Alessio Enzo (2011) Bioinorganic Medicinal Chemistry. 1st(Edn.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr, Weinheim, Germany, 1: 21.

20. Bykowskaa A, Komarnickaa KU, Jeżowska-Bojczuka M, Kyziołb A (2018) Cu^{I} and Cu^{II} complexes with phosphine derivatives of fluoroquinolone antibiotics-A comparative study on the cytotoxic mode of action. J Inorg Biochem 181: 1-10.

21. Magalhaes L, Ferreira L, Andricopulo A (2018) Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. An Acad Bras Cienc 90(1): 1233-1250.

22. Talele TT (2016) The "Cyclopropyl Fragment" is a Versatile Player that Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. J Med Chem 59(19): 8712-8756.

23. Gillis E, Eastman K, Hill M, Donnelly D, Meanwell N (2015) Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. J Med Chem 58(21): 8315-8359.

24. Williams DA, & Lemke TL (2008) Chapter 2/Drug Design and Relationship of Functional Groups to Pharmacologic Activity. In: Zavod R, Knittel J (Eds.), Foye's principles of medicinal chemistry 6th (Edn.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, United States 2: 26-53.

25. Lesiów M, Komarnicka K, Stokowa-Sołtys K, Rolka K, Lęgowska A, et al. (2018) Relationship between copper(II) complexes with FomA adhesin fragments of F. nucleatum and colorectal cancer. Coordination pattern and ability to promote ROS production. Dalton Trans 47(15): 5445-5458.

26. Villarreal W, Colina-Vegas L, Visbal G, Corona O, Corre^a R, et al. (2017) Copper(I)−Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. Inorg Chem 56(7): 3781-3793.

27. Lima J, Rodríguez L (2011) Phosphine-Gold(I) Compounds as Anticancer Agents: General Description and Mechanisms of Action. Anticancer Agents Med Chem 11(10): 921-928.

28. Marzano C, Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, et al. (2014) In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Copper(I) Complexes with Homoscorpionate Tridentate Tris(pyrazolyl)borate and Auxiliary Monodentate Phosphine Ligands. J Med Chem 57(11): 4745-4760.

29. Rasika H, Lobbia G, Papini G, Pellei M, Santini C (2009) Copper(I) Isocyanide and Phosphane Complexes of Fluorinated Mono- and Bis(pyrazolyl)borates. Eur J Inorg Chem 2009(26): 3935-3941.

30. Uhrig U, Höltje H, Mannholdb R, Weber H, Lemoine H (2002) Molecular modeling and QSAR studies on KATP channel openers of the benzopyran type. J Mol Graph Model 21(1): 37-45.

31. Murray BS, Babak MV, Hartinger CG, Dyson PJ (2016) The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. Coord Chem Rev 306(1): 86- 114.

32. Deshaies RJ (2014) Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. BMC Biol 12: 94.

33. Mani A, Gelmann EP (2005) The ubiquitin- proteasome pathway and its role in cancer. J Clin Oncol 23(21): 4776-4789.

34. Weaver B, Cleveland D (2006) Does aneuploidy cause cancer?. Curr Opin Cell Biol 18(6): 658-667.

35. Bulatov E, Sayarova R, Mingaleeva R, Miftakhova R, Gomzikova M, et al. (2018) Isatin-Schiff base-copper (II) complex induces cell death in p53-positive tumors. Cell Death Discov 4(1): 103.

36. Raj V (2012) Review on CNS activity of isatin derivatives. Int J Curr Pharm Res 4(4): 1-9.

37. Sabet R, Mohammadpour M, Sadeghi A, Fassihi A (2010) QSAR study of isatin analogues as in vitro anti-cancer agents. Eur J Med Chem 45(3): 1113- 1118.

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

38. Nitha LP, Aswathy R, Mathews NE, Kumari BS, Mohanan K (2014) Synthesis, spectroscopic characterization, DNA cleavage, superoxidase dismutase activity and antibacterial properties of some transition metal complexes of a novel bidentate Schiff base derived from isatin and 2-aminopyrimidine. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 118: 154-161.

39. Melo MCA, Teixeira LR, Pol-Fachin L, Rodrigues CG (2016) Inhibition of the hemolytic activity caused by Staphylococcus aureus alpha-hemolysin through Isatin-Schiff copper(II) complexes. FEMS Microbiol Rev 363(1): 207.

40. Shebl M (2014) Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity of binuclear metal complexes of a new asymmetrical Schiff base ligand: DNA binding affinity of copper(II) complexes. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 117: 127-137.

41. Raman N, Pothiraj K, Baskaran T (2011) DNA-binding, oxidative DNA cleavage, and coordination mode of later 3d transition metal complexes of a Schiff base derived from isatin as antimicrobial agents. J Coord Chem 64(22): 3900-3917.

42. Devi J & Batra N (2015) Synthesis, characterization and antimicrobial activities of mixed ligand transition metal complexes with isatin monohydrazone Schiff base ligands and heterocyclic nitrogen base. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 135: 710-719.

43. Khan A, Jasinski JP, Smoleaski VA, Paul K, Singh G, et al. (2016) Synthesis, structure and cytotoxicity evaluation of complexes of N1-substituted-isatin-3-thiosemicarbazone with copper (I) halides. Inorg Chim Acta 449: 119-126.

44. Dilworth JR, Hueting R (2012) Metal complexes of thiosemicarbazones for imaging and therapy. Inorg Chim Acta 389: 3-15.

45. Haribabu J, Jeyalakshmi K, Arun Y, Bhuvanesh NS, Perumal PT, et al. (2015) Synthesis, DNA/protein binding, molecular docking, DNA cleavage and in vitro anticancer activity of nickel (II) bis (thiosemicarbazone) complexes. RSC Adv 5(57): 46031-46049.

46. Ali AQ, Teoh SG, Eltayeb NE, Ahamed MBK, Majid AA (2014) Synthesis of copper (II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. Polyhedron 74: 6-15.

47. Özkay Y, Tunali Y, Karaca H, Işıkdağ İ (2010) Antimicrobial activity and a SAR study of some novel benzimidazole derivatives bearing hydrazone moiety. Eur J Med Chem 45(8): 3293-3298.

48. Gupta T, Patra AK, Dhar S, Nethaji M, Chakravarty AR (2005) Effect of copper-sulphur bond on the DNA photo-cleavage activity of 2-(methylthio) ethylpyridine-2-carbaldimine copper (II) complexes. J Chem Sci 117(2): 123-132.

49. Tardito S, Marchio L (2009) Copper compounds in anticancer strategies. Curr Med Chem 16(11): 1325-1348.

50. Wang M, Zhang H, Zhang W, Zhao Y, Yasmeen A, et al. (2014) In vitro selection of DNA-cleaving deoxyribozyme with site-specific thymidine excision activity. Nucleic Acids Res 42(14): 9262-9269.

51. Li DD, Huang FP, Chen GJ, Gao CY, Tian JL, et al. (2010) Four new copper (II) complexes with 1, 3- tpbd ligand: Synthesis, crystal structures, magnetism, oxidative and hydrolytic cleavage of pBR322 DNA. J Inorg Biochem 104(4): 431-441.

52. Dedon PC (2007) The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. Chem Res Toxicol 21(1): 206-219.

53. Kovács D, Igaz N, Keskeny C, Bélteky P, Tóth T, et al. (2016) Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. Sci Rep 6: 27902.

54. Shakir M, Hanif S, Sherwani MA, Mohammad O, Azam M, et al. (2016) Pharmacophore hybrid approach of new modulated bis diamine Cu^{II}/Zn^{II} complexes based on 5-chloro Isatin Schiff base derivatives: synthesis, spectral studies and comparative biological assessment. J Photochem Photobiol B 157: 39-56.

55. Lu W, Cheng F, Yan W, Li X, Yao X, et al. (2017) Selective targeting $p53^{WT}$ lung cancer cells harboring homozygous p53 Arg72 by an inhibitor of CypA. Oncogene 36(33): 4719-4731.

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.

56. Fradique C, Silva GD, Quaresma L, Silva G, Pupo A, et al. (2015) Mutant p53 can support decision making inthe treatment of gastric cancer. Rev Port Cir 34: 13- 26.

57. Aneesrahman KN, Ramaiah K, Rohini G, Stefy GP, Bhuvanesh N, et al. (2019) Synthesis and characterizations of copper (II) complexes of 5-methoxyisatin thiosemicarbazones: Effect of N-terminal substitution on DNA/protein binding and biological activities. Inorg Chim Acta 492: 131-141.

58. Kumar R, Mohanakrishnan D, Sharma A, Kaushik NK, Kalia K, et al. (2010) Reinvestigation of structure–activity relationship of methoxylated chalcones as antimalarials: Synthesis and evaluation of 2,4,5-trimethoxy substituted patterns as lead candidates derived from abundantly available natural β-asarone. Eur J Med Chem 45(11): 5292-5301.

Copyright© Nascimento-Júnior NM, et al.