

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

OTIMIZAÇÃO E PROPOSTA DE UM
NANOCARREADOR DA NAFTOQUINONA 6B,7-DI-HIDRO-5H-
CICLOPENTA[B]NAFTO [2,1-D] FURANO-5,6 (9AH)-
DIONA E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO IN
SILICO E IN VITRO

TALLITA MARQUES MACHADO

MANAUS

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

TALLITA MARQUES MACHADO

OTIMIZAÇÃO E PROPOSTA DE UM
NANOCARREADOR DA NAFTOQUINONA 6B,7-DI-HIDRO-5H-
CICLOPENTA[B]NAFTO [2,1-D] FURANO-5,6 (9AH)-
DIONA E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO IN
SILICO E IN VITRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M149o Machado, Tallita Marques
Otimização e proposta de um nanocarreadora naftoquinona 6B,7-dihidro-5H-ciclopenta[B]nafto[2,1-D]furano-5,6 (9AH)-diona e avaliação do seu potencial farmacológico in silico e in vitro / Tallita Marques Machado . 2023
134 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos
Coorientadora: Fernanda Guilhon Simplicio
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Naftoquinona. 2. Nanotecnologia. 3. Atividade Biológica. 4. Docking molecular. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Otimização e proposta de um nanocarreador da naftoquinona 6b,7-dihidro-5h-ciclopenta[b]nafto [2,1-d] furano-5,6 (9ah)-diona e avaliação de seu potencial farmacológico in silico e in vitro”

DISCENTE: TALLITA MARQUES MACHADO

PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM,28/06/2023.

Prof. Dr. Emersom Silva Lima
Coordenador do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:

Documento assinado digitalmente
 MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS
Data: 03/08/2023 16:32:37-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora e Presidente da banca

Documento assinado digitalmente
 TATIANE PEREIRA DE SOUZA
Data: 18/10/2023 10:56:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Membro (UFAM)

Prof. Dr. Emersom Silva Lima Membro
(UFAM)

Documento assinado digitalmente
 KELSON MOTA TEIXEIRA DE OLIVEIRA
Data: 31/08/2023 13:37:30-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Kelson Mota Teixeira de Oliveira
Membro (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO
Data: 18/08/2023 11:50:59-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Jesus Rafael Rodríguez Amado
Membro (UFMS)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus que sempre foi e sempre será a luz que ilumina a minha vida, sendo a força que me levantou nos momentos que achei que fosse desmoronar... Também não poderia de deixar de agradecer a nossa mãezinha, Maria, a quem sempre peço que me acolha em seu colo e interceda por mim ao Pai.

À minha família, que sempre, sempre e sempre me ajuda e a qual serei eternamente grata!!! Vocês são a minha âncora, meu porto seguro, a minha casa!!! Agradeço por todo amor, dedicação, confiança e fé que depositam em mim!!!

Às minhas orientadoras, professora Marne e professora Fernanda, que me acompanham desde a graduação, tiveram paciência comigo nos momentos que achei que fosse surtar e me possibilitaram chegar até aqui. Obrigada por tudo! Por todo carinho, conselho, dedicação e pelos puxões de orelha também!

À professora Dra. Tatiane Pereira de Souza por me permitir utilizar o laboratório LIDETEF para a realização de algumas análises com o zetasizer e a estufa, além de me auxiliar respondendo minhas dúvidas sobre o mundo do planejamento fatorial. Obrigada professora!

Ao professor Dr. Emerson Silva Lima por me permitir utilizar o laboratório BIOPHAR para a realização de algumas análises com o HPLC e outros equipamentos, além de me auxiliar respondendo algumas dúvidas ao longo do doutorado. Obrigada professor!

Aos amigos que o FITOPHAR me deu, nós passamos por tantas coisas juntos, tantos momentos alegres como tristes também, só quero agradecer por toda ajuda e companheirismo. Obrigada Carlos, Verônica, Lívia, Carol, Janaína, Rodrigo, Rebeca,

Douglas, Natalie, Ingrid, Rhana, Aryane, Raquel, Gabriel (in memoriam) Juliana e Marcos!!! Obrigada Ana Cristina por todo o auxílio e conversas!

Aos amigos do BIOPHAR, por terem me ensinado os testes, pelas conversas, por todo ensinamento e amizade!!! Bárbara, Léo, Márcia, Lívia, Ísis e em especial, quero agradecer a Leica (Leilane Bentes), a Kríscia, a Ellenzinha (Ellen Aranha) e a Edna que me ajudaram em um nível que teria de viver várias vidas para poder agradecer tudo que elas fizeram por mim!!!!

Aos amigos do LIDETEF, Serafim, Jesus, Fernanda e Diego, muito obrigada por toda a ajuda com as nanoformulações, sugestões, almoços, conversas e a gigante ajuda com o zetasizer. Sou muito grata por tudo!!!!

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram com algumas análises, Raquel, Verônica, Rebeca e Thayza, muito obrigada por toda a ajuda!!!

Aos amigos Marcos Túlio, Rodrigo, Thiago, Bruno e Ana por sempre estarem me incentivando a não desistir, a perseverar mesmo quando tudo parece desmoronar. Obrigada!!!

Aos amigos do CEFET (sim, será sempre CEFET em meu coração) Juliana, Amanda, Bruno, Josemar e Tiago por toda força, incentivo, conversas e por me ajudaram a acreditar mais em mim. Obrigada!!!

À Universidade Federal do Amazonas, que ingressei na graduação e que me permitiu oportunidades únicas, e graças a elas pude chegar até aqui.

RESUMO

Desenvolver um fármaco é um processo longo, complexo e de alto custo, onde é necessário avaliar as características farmacocinéticas, toxicológicas e moleculares dos candidatos a fármacos para que consiga êxito durante o processo. A 6b,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona (CNFD) é uma naftoquinona semissintética que apresenta atividade citotóxica contra células de câncer de mama (MCF-7) e melanoma (SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-MEL-103 e B16F10), e antitumoral em modelo murino de melanoma, sendo considerada uma molécula promissora para utilização como fármaco. Contudo, o seu baixo rendimento na reação de obtenção impõe barreiras quanto a sua aplicação em larga escala, bem como suas características físico-químicas podem afetar suas características farmacocinéticas e tecnológicas. Assim, o presente projeto propôs otimizar o processo de obtenção da CNFD e melhorar suas características farmacocinéticas e tecnológicas por meio do desenvolvimento de um sistema nanocarreador. Para tanto, foram realizadas análises de *in silico* para a predição dos parâmetros farmacocinéticos e farmacológicos, bem como procedeu-se a otimização do processo de obtenção da CNFD, desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo a CNFD, a avaliação *in vitro* da citotoxicidade e influência no metabolismo da glicose e de lipídeos. A partir dos resultados obtidos, obteve-se a otimização da síntese da CNFD, o qual foi possível chegar a um rendimento de $48,16 \pm 1,58\%$ após 1 hora de reação, sendo superior ao encontrado na literatura que é de 15% após 3 horas de reação, além disso, a CNFD apresenta uma alta taxa de absorção intestinal (97%) e forte ligação às proteínas plasmáticas (93%) sem inibir a glicoproteína-P, apresentando especificidade e complementaridade na inibição de CYP1A2, 2C19 e 2C9 no metabolismo de fase 1. As nanoesferas mostram-se modelos mais estáveis para o encapsulamento da CNFD que em comparação as nanocápsulas, apresentando perfis tecnológicos aceitáveis que não se alteraram de forma significativa durante os 5 meses analisados, além de apresentarem citotoxicidade frente as células neoplásicas por um mecanismo que não envolve a influência da CNFD frente ao metabolismo de glicose e lactato desidrogenase em microambiente tumoral.

Palavras-chave: naftoquinona, nanotecnologia, atividade biológica, docking molecular.

ABSTRACT

Developing a drug is a long, complex and costly process, where it is necessary to evaluate the pharmacokinetic, toxicological and molecular characteristics of drug candidates to succeed during the process. 6b,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione (CNFD) is a semi-synthetic naphthoquinone that exhibits cytotoxic activity against breast cancer cells (MCF -7) and melanoma (SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-MEL-103 and B16F10), and antitumor in a murine model of melanoma, being considered a promising molecule for use as a drug. However, its low yield of restriction control reaction regarding its large-scale application, as well as its physicochemical characteristics may affect its pharmacokinetic and technological characteristics. Thus, this project photographed the process of obtaining CNFD and its pharmacokinetic and technological characteristics through the development of a nanocarrier system. Therefore, they were analyzed *in silico* for the prediction of pharmacokinetic and pharmacological parameters, as well as the optimization of the process of obtaining CNFD, development and characterization of polymeric nanoparticles containing CNFD and the *in vitro* evaluation of cytotoxicity, and influence on the glucose and lipid metabolism. From the results obtained, the optimization of the synthesis of CNFD was obtained, which it was possible to reach a yield of $48.16 \pm 1.58\%$ after 1 hour of reaction, being higher than that found in the literature, which is 15% after 3 hours of reaction, in addition, CNFD has a high rate of intestinal absorption (97%) and strong binding to plasma proteins (93%) without inhibiting P-glycoprotein, showing specificity and complementarity in the sequence of CYP1A2, 2C19 and 2C9 in phase 1 metabolism. Nanospheres are more stable models for CNFD encapsulation than nanocapsules, presenting acceptable technological standards that did not change significantly during the 5 months analyzed, in addition to presenting cytotoxicity against receptors neoplastic cells by a mechanism that does not involve the influence of CNFD on glucose and lactate dehydrogenase metabolism in the tumor microenvironment.

Keywords: naphthoquinone, nanotechnology, biological activity, docking molecular.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Etapas do desenvolvimento de fármacos.....	20
Figura 2 - Benzoquinonas (A e B), naftoquinonas (C e D) e antraquinonas (E).....	25
Figura 3 - Lapachol (A), β -lapachona (B) e Lausona (C).....	27
Figura 4 - Estrutura química no formato 2D da CNFD.....	28

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Rota sintética utilizada para obtenção da CNFD.....	36
Figura 2 - Processo de síntese e purificação da CNFD. (A) Quebra da molécula de dicitropentadieno; (B) Síntese dos derivados; (C) Extração dos derivados com diclorometano; (D) Cromatografia em coluna; (E) Derivado purificado e seco.....	42
Figura 3 - Síntese do CNFD. (A) CCD das reações em 30 minutos nas concentrações 2,0 (S1), 2,5 (S2) e 3,0 (S3) equivalentes. (B) CCD das reações no tempo de 45 minutos na concentração 2,0 equivalentes (S10 e S11).....	45
Figura 4 - Espectro de massas da CNFD sintetizada. (A) íon molecular da CNFD fragmentado. (B) formação de adutos com a CNFD.....	46
Figura 5 - Identificação dos carbonos da estrutura química da CNFD.....	47

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de uma nanocápsula. (A) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (B) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas.....	53
---	----

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoesfera. (A) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (B) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	54
Figura 3 - Esquema simplificado de elaboração das nanocápsulas.....	59
Figura 4 - Cromatograma da CNFD padrão.....	65
Figura 5 - Gráfico de linearidade (10-125 µg/mL) para a quantificação da CNFD por CLAE.....	65
Figura 6 - Aspectos visuais das nanocápsulas. (A) Formulação recém preparada (estável); (B) Precipitação; (C) Mudança de coloração; (D) e (E) Cremação.....	69
Figura 7 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula. (A) NAN09-B; (B) NAN10-B; (C) NAN11-B; (D) NAN12-B.....	72
Figura 8 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula da NANO11 após 30 dias de análise.....	76
Figura 9 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula da NANO09-B após 150 dias de análise.....	77

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Estrutura química da 2D da CNFD destacando a sua contagem carbônica.....	91
Figura 2 - Principais sítios de metabolismo da CNFD obtidos a partir do SMARTCyp®. Em vermelho o átomo com maior probabilidade, em laranja o segundo e em amarelo o terceiro.....	93
Figura 3 - Previsão de metabólitos CNFD e suas respectivas reações químicas.....	94
Figura 4 - Análise das interações da CNFD com CYPs avaliadas: CYP1A2 (A), CYP2C9 (B), CYP2C19 (C), CYP2D6 (D) e CYP3A4 (E).....	97

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Análise de ancoragem molecular da CNFD com diferentes alvos biológicos. (A) Topoisomerase I; (B) Topoisomerase II beta; (C) ERK1; (D) mTOR quinase; (E) PI3K/mTOR (F) SHP2 fosfatase; (G) KRAS; (H) c-Kit quinase.....	117
Figura 2 - Fotografia representativa da proliferação dos esferoides de HepG2 nas concentrações de 50, 100 e 150x10 ⁴ células, visualizados por microscopia óptica com a objetiva de 40x.....	121
Figura 3 - Análise morfológica dos esferoides obtidos nas concentrações de 50, 100 e 150 x10 ⁴ células de HepG2 nos tempos de 5, 10, 15 e 18 dias.....	122
Figura 4 - Viabilidade celular após tratamento com a CNFD e a NANO09-B na concentração de 1 µM em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.....	126
Figura 5 - Avaliação da influência da CNFD e NANO09-B na concentração de 1 µM na atividade enzimática de LDH em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA <i>two way</i> seguido de teste Bonferroni.....	126
Figura 6 - Avaliação da influência da CNFD e NANO09-B na concentração de 1 µM captação de glicose em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.....	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Planejamento fatorial 3^2 utilizado para a obtenção da CNFD.....	39
Tabela 2 - Matriz do planejamento factorial 3^2 utilizado para a obtenção da CNFD.....	39
Tabela 3 - Reação da obtenção da CNFD sob diferentes condições reacionais...	42
Tabela 4 - Condições reacionais utilizadas nas sínteses 17 a 21.....	44
Tabela 5 - Rendimento das reações para obtenção do CNFD em diferentes condições de reação no planejamento fatorial 3^2	44
Tabela 6 - Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da CNFD em comparação ao padrão.....	47

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição e condições das nanoformulações.....	59
Tabela 2 - Composição e condições das nanoformulações.....	61
Tabela 3 - Concentrações da curva de regressão linear da CNFD.....	66
Tabela 4 - Ensaio de repetibilidade.....	66
Tabela 5 - Avaliação da exatidão.....	67
Tabela 6 - Nanoformulações avaliadas visualmente após o preparo.....	68
Tabela 7 - Nanoformulações avaliadas visualmente após o preparo.....	71
Tabela 8 - Caracterização das nanoesferas pelo potencial zeta, mobilidade, condutividade e tamanho de partícula.....	71
Tabela 9 - Monitoramento do pH das formulações de nanopartículas.....	74

Tabela 10 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade das formulações NANO11 e NANO09-B durante cinco meses de estudo.....	75
--	----

CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Energia de interação (Kcal/mol) da CNFD em comparação aos ligantes cocristalizados nas em diferentes enzimas.....	116
--	-----

Tabela 2 - Efeito da CNFD e da NANO09-B na viabilidade celular de linhagens tumorais e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 72h. Os valores estão representados como CI50 (intervalo de confiança de 95%).....	119
---	-----

Tabela 3 - Efeito da CNFD e da NANO09-B na viabilidade celular do modelo de esferoides com HepG2 utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI50 (intervalo de confiança de 95%).....	124
--	-----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 3

Quadro 1 - Condições cromatográficas estabelecidas.....	57
---	----

CAPÍTULO 4

Quadro 1 - Principais enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos.....	83
---	----

Quadro 2 - Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos da CNFD.....	88
---	----

Quadro 3 - Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de metabolismo da CNFD.....	88
--	----

Quadro 4 - SOMs da CNFD obtidos no programa Way2Drug®.....	92
--	----

Quadro 5 - SOMs da CNFD obtidos no programa SMARTCyp®.....	93
--	----

Quadro 6 - Metabólitos prováveis de CNFD, reações químicas e valor provável da ocorrência da reação.....	94
--	----

Quadro 7 - Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do redocking.....	95
---	----

Quadro 8 - Energia de interação (Kcal/mol) da CNFD com as enzimas avaliadas.....	96
--	----

CAPÍTULO 5

Quadro 1 - Exemplos de algoritmos de busca e programas de ancoragem molecular.....	104
--	-----

Quadro 2 - Alvos biológicos selecionados no PDB.....	108
--	-----

Quadro 3 - Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do redocking.....	114
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAN	Nitrato de amônio cérico
CYP	Citocromo P450
CES	Carboxilesterases
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLA	Ácido poliláctico
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PLLA	Poli(L-ácido láctico)
EROS	Espécies reativas de oxigênio
PDB	Protein Data Bank
AKT1	Homólogo de oncogene viral de timoma murino V-akt 1
ASK1	Quinase 1 reguladora de sinal de apoptose
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
MAPK14	Proteína quinase ativada por mitogênio 14
ErbB4	Receptor tirosina-proteína quinase erbB-4
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
PI3K	Fosfoinositida 3-quinase
Bcl-2	linfoma 2 de células B
SHP2	Proteína tirosina fosfatase 2
KRAS	Kras proto-oncogene GTPase
MCL1	Leucemia de células mielóides 1
c-Kit	Receptor do fator de crescimento

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 1	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1. Desenvolvimento de fármacos	20
1.2. Câncer	23
1.3. Naftoquinonas e o câncer	24
2. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2	34
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SINTÉTICO PARA OBTENÇÃO DA 7-DI-HIDRO-5H-CICLOPENTA[B]NAFTO[2,1-D]FURANO-5,6(9AH)-DIONA ...	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. METODOLOGIA	38
2.1. Obtenção da CNFD padrão	38
2.2. Síntese da CNFD	38
2.3. Planejamento Fatorial para otimização da obtenção da CNFD	39
2.4. Confirmação estrutural	40
2.5. Análise estatística	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO	48
5. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 3	51
DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOFORMULAÇÃO CONTENDO A 7-DI-HIDRO-5H-CICLOPENTA[B]NAFTO[2,1-D]FURANO-5,6(9AH)-DIONA ...	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. METODOLOGIA	56
2.1 Obtenção da substância teste	56
2.2. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da CNFD	56
2.2.1 Linearidade	58
2.2.2. Avaliação da Precisão - Teste de repetibilidade	58

2.2.3. Avaliação da Exatidão	58
2.3. Desenvolvimento das nanoformulações	59
2.3.1. Desenvolvimento de nancocápsulas contendo a CNFD	59
2.3.2. Desenvolvimento de nanoesferas contendo a CNFD	61
2.4. Caracterização das nanopartículas	62
2.4.1. Tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade	62
2.4.2. Eficiência de encapsulamento	62
2.4.3. Teste de estabilidade.....	63
2.5. Análise estatística	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1. Validação do método analítico	64
3.2. Desenvolvimento das nanoformulações	68
3.2.1. Nanocápsulas	68
3.2.2. Nanoesferas	71
3.3. Caracterização físico química das nanopartículas	73
3.3.1. Taxa de eficiência de encapsulação.....	73
3.3.2. Estabilidade das formulações	73
4. CONCLUSÃO.....	77
5. REFERÊNCIAS	78
1. INTRODUÇÃO	102
1.1. Ancoragem molecular.....	102
1.2. Modelos de cultura tridimensional de células.....	105
2. METODOLOGIA.....	107
2.1 Obtenção da substância teste	107
2.2 Triagem virtual por ancoragem molecular.....	107
2.2.1 Seleção e preparo dos alvos biológicos	107
2.2.2. Preparo do ligante.....	108
2.2.3. Ancoragem molecular.....	108
2.3. Cultivo celular	109
2.4. Avaliação da citotoxicidade in vitro	110
2.5. Modelo 3D de esferoides de HepG2.....	110
2.5.1. Fabricação de hidrogéis e Formação dos esferoides tridimensionais.....	110
2.5.2. Produção dos esferoides de HepG2.....	111
2.5.3 Monitoramento dos esferoides por fotomicroscopia	112
2.6. Ensaio de viabilidade celular, absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em meio com diferentes concentrações de glicose	112
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	113

3.1. Triagem Virtual	113
3.2. Análise de citotoxicidade por Alamar Blue em modelo 2D.....	119
3.3. Modelo 3D de esferoides de HepG2.....	120
3.4. Avaliação de viabilidade celular em modelo 3D.....	123
3.5. Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 3D.....	124
4. CONCLUSÃO.....	128
5. REFERÊNCIAS	128
CONCLUSÃO FINAL	131
REFERÊNCIAS	132

INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças complexas cuja origem está em alterações na homeostase celular associadas a componentes genéticos, que culminam no crescimento desordenado de células anômalas incapazes de formar uma estrutura funcional e que podem invadir outros tecidos e órgãos (DE ANDA-JÁUREGUI; HERNÁNDEZ-LEMUS, 2020; FLOOR et al., 2012; WHO, 2020).

A quimioterapia é um dos tratamentos sistêmicos mais utilizados no câncer, englobando diversos fármacos com diferentes mecanismos de ação. No entanto, os efeitos adversos e a resistência das células cancerígenas aos agentes antineoplásicos tem levado à busca por novas opções terapêuticas (GARRAWAY; JÄNNE, 2012; HOUSMAN et al., 2014).

Neste contexto, os produtos naturais situam-se como fonte valiosa de moléculas biotivas, devido sua grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares (GUO, 2017; KOEHN; CARTER, 2005).

As naftoquinonas representam uma relevante classe de moléculas bioativas que têm despertado interesse, não somente pela sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também pela gama de atividades biológicas que apresentam, tais como: atividade antitumoral, leishmanicida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e antiviral (AMININ; POLONIK, 2020; FERREIRA; FERREIRA; DA SILVA, 2010).

A CNFD (6b,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona), é uma piranoftoquinona semissintética derivada da lausona, naftoquinona de origem natural, por meio de uma cicloadição oxidativa mediada pelo nitrato de amônio cérico (IV) (CAN) (FREIRE et al., 2010), que vem sendo amplamente estudada quanto às suas propriedades biológicas. Apesar da CNFD ser uma molécula promissora, aspectos relacionados a sua obtenção, suas características farmacocinéticas e tecnológicas

precisam ser reavaliadas e otimizadas para que possa ser considerada um candidato a fármaco.

Uma das formas de otimização e melhoria das características farmacocinéticas de diversas fármacos é o emprego da nanotecnologia, que vem sendo aplicada também para melhorar a especificidade das moléculas para células tumorais, promovendo seu acúmulo em alguns tipos de tumores (PASUT, 2019; WONG et al., 2010), modificando ainda sua toxicidade, estabilidade e solubilidade e, permitindo assim, a potencialização de sua ação (HARE et al., 2017).

Na área da oncologia, a nanotecnologia tem desempenhado um papel cada vez mais importante, tanto no diagnóstico como no tratamento de diversos tumores. Agentes terapêuticos nanoestruturados possuem um período de circulação prolongado na corrente sanguínea, o que lhes permite atingir o tecido alvo de forma mais eficiente (GMEINER; GHOSH, 2015; JI et al., 2017; MI et al., 2016).

Além disso, permitem solubilizar de forma eficiente substâncias hidrofóbicas, conferem proteção do fármaco contra a degradação, aumento da estabilidade química, aumento do efeito desejado, redução dos efeitos adversos e biocompatibilidade (CHAVES et al., 2017; FROZZA et al., 2010; OWENS; PEPPAS, 2006; PANYAM; LABHASETWAR, 2012; POHLMANN et al., 2013).

Diante das propriedades biológicas da CNFD, em especial seu potencial antitumoral, e das inúmeras vantagens da utilização da nanotecnologia como ferramenta de otimização farmacocinética e farmacodinâmica de diferentes fármacos, inclusive anticâncer, o presente projeto pretendeu otimizar o rendimento da síntese da CNFD por meio de um planejamento fatorial, e desenvolver sistemas nanoestruturados de carreamento com essa molécula, avaliando parâmetros farmacocinéticos *in silico* e *in*

vitro, contribuindo para o prosseguimento dos estudos não clínicos e clínicos visando seu emprego como novo fármaco anticâncer.

A presente tese está estruturada em 5 capítulos, onde são mencionados a introdução, a metodologia, os resultados e discussão, e a conclusão de acordo com a apresentação abaixo:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica.

Capítulo 2: Otimização do processo sintético para obtenção da 7-dihidro-5h-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9ah)-diona.

Capítulo 3: Desenvolvimento de uma nanoformulação contendo a 7-dihidro-5h-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9ah)-diona.

Capítulo 4: Avaliação *in silico* da farmacocinética da 7-dihidro-5h-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9ah)-diona.

Capítulo 5: Potencial farmacológico da 7-dihidro-5h-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9ah)-diona.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver um sistema nanoparticulado contendo a 6b,7-diidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona (CNFD) e investigar suas propriedades farmacológicas *in silico* e *in vitro*.

Objetivos específicos

- Melhorar o rendimento do processo de obtenção da CNFD;
- Avaliar os parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos *in silico* da CNFD;
- Identificar os possíveis metabólitos formados após o metabolismo de fase 1;
- Desenvolver e caracterizar nanoformulações contendo a CNFD;
- Avaliar a citotoxicidade da nanoformulação em diferentes linhagens celulares;
- Avaliar a influência da nanoformulação no metabolismo de lipídios e glicose

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Desenvolvimento de fármacos

Planejar e desenvolver um novo fármaco é um processo longo e complexo, que consome em média de 10 a 20 anos para ser concluído (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016), cujo início se dá a partir da descoberta ou síntese de uma molécula ativa em um alvo biológico apropriado, como também a partir do melhoramento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de moléculas conhecidas (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; DOYTCHINOVA, 2022).

Além de ser um processo complexo e rigoroso, levar um medicamento ao mercado envolve um custo que pode variar de 300 milhões a 2,8 bilhões de dólares. As etapas que compreendem o desenvolvimento de fármacos vão da descoberta da molécula até os testes clínicos em humanos (FAKUNLE; LORING, 2012; WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020) (Figura 1).

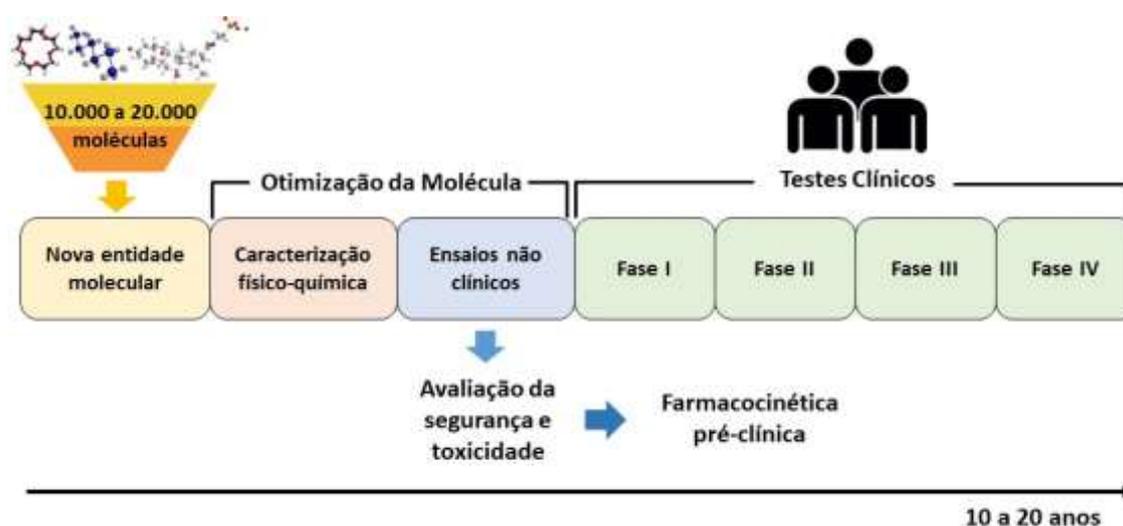


Figura 1 - Etapas do desenvolvimento de fármacos.

Fonte: adaptado de Farid e colaboradores (2020).

O processo de desenvolvimento de um fármaco se dá com a identificação de um *hit*, que é uma entidade química com alta afinidade para o alvo terapêutico pretendido, o qual passa por uma série de análises para avaliar suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e toxicológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este processo, que é determinante para a continuidade do processo, é denominada etapa não clínica (ANDRADE et al., 2016; ZHOU; ZHONG, 2017). Nessas fases iniciais, podem ser identificadas moléculas de baixa potência e afinidade, bem como moléculas com baixo rendimento de obtenção, as quais necessitam ser otimizadas para que possam ser selecionadas como moléculas-líderes (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Com o intuito de reduzir a taxa de insucesso na fase não clínica, tem-se utilizado a abordagem *in silico* na seleção e otimização de moléculas com maior potencial de desenvolvimento, tanto para auxiliar na predição do comportamento farmacocinético como prever possíveis mecanismos de ação, avaliar a toxicidade, compreender alterações moleculares, otimizar formulações e entre outros (GRIME; BARTON; MCGINNITY, 2013; LOMBARDO et al., 2017; PIÑERO; FURLONG; SANZ, 2018).

Uma vez os candidatos a fármacos sejam avaliados nos estudos não clínicos, os mesmos seguem para os estudos clínicos, que correspondem à pesquisa conduzida em seres humanos, onde se utiliza voluntários sadios ou enfermos, e abrange desde a administração da substância pela primeira vez ao ser humano, até a obtenção dos dados sobre sua eficácia e segurança terapêutica em grandes grupos populacionais, bem como os estudos de pós-comercialização (CHEN et al., 2018; TAYLOR, 2016).

Os ensaios clínicos são divididos em 4 fases: na fase I, o medicamento é testado pela primeira vez em voluntários sadios para se avaliar a tolerância, posologia e a segurança do novo fármaco; na fase II, os voluntários são pacientes acometidos pela patologia de estudo, com o intuito de se verificar a eficácia frente a patologia, estabelecer

o intervalo de dose e determinar os regimes de administração; na fase III, já ocorrem estudos multicêntricos e internacionais, onde o medicamento é dado a um grupo extenso de pacientes para avaliar a eficácia e segurança do produto. Geralmente, nos estudos desta fase os pacientes são divididos em dois grupos denominados grupo controle, que recebe o tratamento padrão ou placebo, e o grupo teste, que recebe o novo fármaco (ARÁNYI, 2018; BRICK; HOSSNE; HOSSNE, 2008; TAMIMI; ELLIS, 2009; UMSCHEID; MARGOLIS; GROSSMAN, 2011).

A última etapa dos estudos clínicos, denominada de fase IV, compreende o processo posterior ao registro e lançamento do novo medicamento no mercado. Nesta fase são realizados estudos a longo prazo de vigilância pós-comercialização para verificar a ocorrência de novos efeitos terapêuticos ou reações adversas, bem como interações medicamentosas não observadas nas fases anteriores (CHEN et al., 2018; ZHANG et al., 2016).

Cerca de 80 a 90% dos candidatos a fármacos falham antes de chegarem aos testes clínicos, apenas 0,1% dos candidatos conseguem chegar a etapa final. A maioria falha por problemas relacionados a efeitos colaterais inesperados, tolerabilidade, falta de eficácia e perfis de segurança insatisfatórios que não foram previstos em estudos pré-clínicos (FOGEL, 2018; SEYHAN, 2019). Inadequações das propriedades farmacocinéticas são uma das causas relacionadas a estas falhas, sendo a instabilidade metabólica um dos fatores principais, assim, observa-se a necessidade de se realizar estudos farmacocinéticos nos estágios iniciais do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (MOHS; GREIG, 2017; NUNES, 2015).

Além dos aspectos farmacocinéticos, a toxicidade incontrolável, fracas propriedades *drug-like* e mau planejamento estratégico e comercial, como o baixo

rendimento na obtenção e impurezas associadas a síntese das moléculas, também são fatores que impedem o sucesso no desenvolvimento de fármacos (SUN et al, 2022).

1.2. Câncer

Câncer é um grupo de doenças que possuem origem multicausal e podem afetar qualquer parte do corpo. Sendo considerado um problema de saúde pública, visto que é uma das causas de morte prematura em 134 dos 183 países do mundo, além de ser o responsável por uma em cada seis mortes em todo o mundo (PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016; WHO, 2020). Nas próximas quatro décadas, espera-se que as mortes por câncer superem as por doenças isquêmicas do coração, com um aumento de 2,08 vezes até o ano de 2060, tornando-se a principal causa de mortalidade em todo o mundo imediatamente após o ano de 2030 (MATTIUZZI; LIPPI, 2019).

No Brasil, segundo as estimativas para triênio 2023-2025, ocorrerão cerca de 704 mil novos casos de câncer, sendo a segunda maior causa de morte após as doenças cardiovasculares, onde, excetuando o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama feminina (73 mil) e o de próstata (71 mil) serão os mais incidentes. Em seguida, o câncer de cólon e reto (45 mil), pulmão (32 mil), estômago (21 mil) e o câncer do colo do útero (17 mil) (SANTOS et al., 2023).

Devido à magnitude desta doença, durante as últimas décadas houve grandes esforços e avanços na compreensão das causas do câncer, em particular, sobre os genes que afetam o seu desenvolvimento, possibilitando melhorias nas ferramentas para a detecção e tratamento. Nesse sentido, é importante destacar que a precocidade no diagnóstico do tumor é um fator importante para o êxito da terapia (KRZYSZCZYK et al., 2018; WARDLE et al., 2015).

O panorama da terapia antineoplásica se modificou bastante nas últimas décadas. Existem atualmente quatro linhas de abordagens de tratamento que são: remoção cirúrgica, imunoterapia, radioterapia e a quimioterapia (KATTNER et al., 2019). Alguns indivíduos requerem apenas um tratamento, mas na maioria das vezes, uma combinação de tratamentos é usada para combater a natureza resistente do câncer (JAAKS et al., 2022).

A remoção cirúrgica representa um método eficaz de eliminar tumores sólidos que não metastatizaram e estão localizados em áreas acessíveis do corpo, enquanto que a radioterapia e a quimioterapia, são formas de tratamento em caso de metástase, podendo ser combinadas, reduzindo a morbimortalidade associada ao câncer. Entretanto, como envolvem altas doses de radiação e fármacos tóxicos, tendem a causar danos adicionais às células saudáveis (KRZYSZCZYK et al., 2018).

Apesar da vasta quimioterapia anticâncer disponível, alguns agentes quimioterápicos possuem um mecanismo de ação inespecífico, tendo como principal entrave a semelhança entre as células malignas e sadias do organismo, o que leva a lesão de ambas. Além disso, muitos fármacos estão sujeitos à resistência, o que acarreta no impedimento do tratamento do paciente e se torna uma das principais causas de morte na maioria dos cânceres em estágio avançado (HOUSMAN et al., 2014; ZARGAR et al., 2019). Assim, é necessário a obtenção de novas substâncias ou aprimoramento de moléculas ativas existentes, para que se forneçam novas estratégias e opções terapêuticas mais eficazes e seguras.

1.3. Naftoquinonas e o câncer

A utilização de produtos naturais no tratamento e prevenção de doenças tem sido uma importante área para a descoberta de novos fármacos. Além disso, diversas

substâncias extraídas de produtos naturais vêm sendo estudada quanto às suas atividades antitumorais, e mais de 3.000 espécies vegetais já foram utilizadas em terapêuticas modernas contra o câncer, com cerca de 85 moléculas derivadas de produtos naturais já testadas e aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (CRAGG; PEZZUTO, 2016; NEWMAN; CRAGG, 2020).

A diversidade de espécies de plantas, animais, micro-organismos e organismos marinhos resultam em uma variedade de metabólitos secundários com diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que possibilitam com que estas moléculas se tornem compostos líderes e protótipos para o planejamento e desenvolvimento de fármacos (PHAM et al., 2019).

Entre os produtos naturais com potencial anticâncer, encontram-se as quinonas que são pequenos anéis α , β -dienônicos de seis membros classificadas de acordo com seu esqueleto de carbono aromático em: benzoquinonas, possui um anel de benzeno; naftoquinonas, possui um anel de naftaleno; e antraquinonas, que possui um anel antraceno, linear ou angular (CAHYANA; MAFAZI; LIANDI, 2020; DEMIR, 2020; FUTURO et al., 2018) (Figura 2).

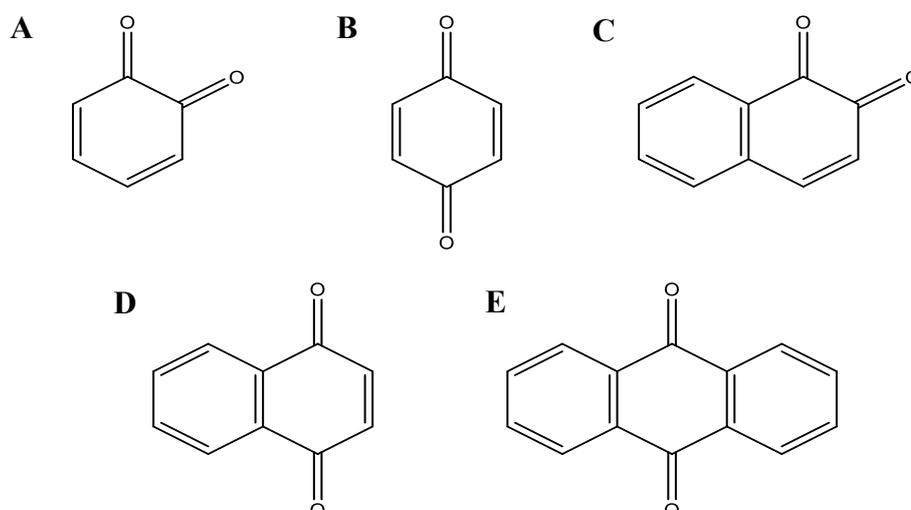


Figura 2 - Benzoquinonas (A e B), naftoquinonas (C e D) e antraquinonas (E).

As quinonas apresentam diversas atividades, como antibacteriana (DA SILVA et al., 2020), antifúngica (ALDHOLMI et al., 2019; FANG et al., 2020), anti-inflamatória (DANDAWATE et al., 2010) e antiviral (ROA-LINARES et al., 2019), além de serem base de moléculas citotóxicas cuja ação tem sido associada à inibição da topoisomerase I e II do DNA humano, e à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (LIANG et al., 2019; PEREYRA et al., 2019).

Dentre as quinonas, destacam-se as naftoquinonas que são derivados do naftaleno contendo dois grupos carbonila na posição 1,4, isoforma mais estável e amplamente encontrada, e na posição 1,2, com menor incidência (QIU et al., 2018). As naftoquinonas são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente em plantas e em diversos microrganismos (FUTURO et al., 2018).

A forma como as naftoquinonas atuam está relacionada com a formação de ligações covalentes com os alvos biológicos ou por meio de sua capacidade de sofrer reações reversíveis de oxirredução. O mecanismo de ação geralmente envolve de EROS pelo ciclo redox em condições aeróbias, pela inibição do transporte de elétrons, por agentes intercalantes ou alquilantes do DNA ou como inibidores da topoisomerase (LEE et al., 2019).

De forma geral, as naftoquinonas possuem a capacidade de aceitar um ou dois elétrons para formar a semiquinona e a hidroquinona, que são reoxidados pelo oxigênio molecular e geram EROS, que são poderosos agentes oxidantes e provavelmente os responsáveis por danos a macromoléculas como o DNA e proteínas, levando ao estresse oxidativo e apoptose (FUTURO et al., 2018; PEREYRA et al., 2019).

As naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas na química medicinal, por apresentarem diversas atividades farmacológicas e possuírem estrutura passível de sofrer modificações químicas mais simples, o que as torna bons materiais de partida para

semissíntese de novas moléculas. Além disso, a busca por quinonas tem se intensificado nos últimos anos devido à relevância farmacológica de importantes naftoquinonas naturais, como o lapachol, β -lapachona e lausona (RANI et al., 2022) (Figura 3).

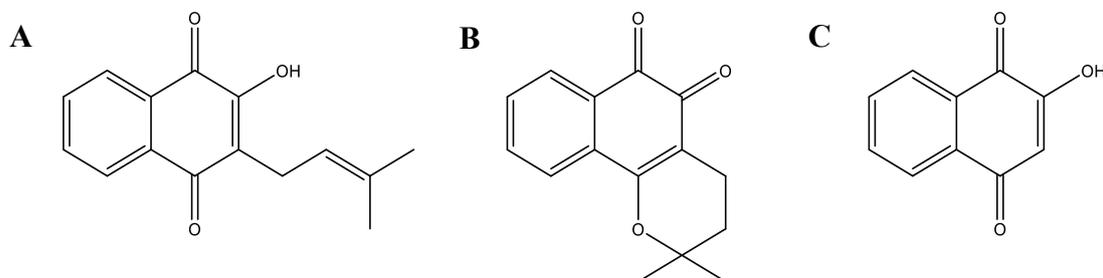


Figura 3 - Lapachol (A), β -lapachona (B) e Lausona (C).

Lapachol (2-hidroxi-3-[3-metil-2-butenil]-1,4-naftoquinona) é uma quinona natural isolada da família Bignoniaceae encontrada no Brasil (PAJOURDO et al., 2020), possuindo atividades farmacológicas como microbiana, anti-inflamatória, antiproliferativa, antifúngica, tripanossomicida e antitumoral (EPIFANO et al., 2014; EYONG et al., 2020; PERES et al., 2017). A β -lapachona é uma piranonaftoquinona isômera do lapachol encontrada em espécies do gênero *Tabebuia* (FERREIRA et al., 2009). A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona) apresenta atividades como antifúngica, anti-inflamatória, anticâncer, antibacteriano, antiangiogênica, bem como ocasiona danos ao DNA (HUSSAIN; GREEN, 2017).

A partir da lausona, foi obtida uma piranonaftoquinona semissintética denominada de CNFD (7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona) (figura 4) por meio de uma cicloadição oxidativa [3+2] mediada pelo nitrato de amônio cérico (IV) (CAN) a partir da lausona e do ciclopentadieno, a qual apresentou atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras do gênero *Cryptococcus* sp. (FREIRE et al., 2010).

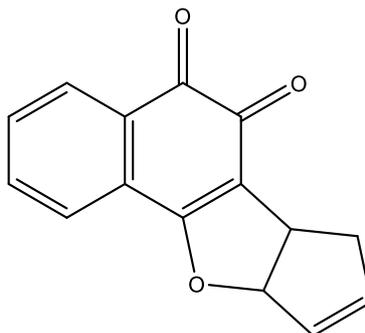


Figura 4 – Estrutura química no formato 2D da CNFD.

A CNFD também apresentou potencial anticâncer, onde foi observado sua ação citotóxica em diferentes linhagens tumorais, especialmente em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), com uma concentração inibitória média (CI50) de 3,06 e 0,98 μM durante 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Além de apresentar potente atividade antitumoral em estudos *in vivo* utilizando o modelo murino de melanoma, inibindo o crescimento tumoral em 46,8%, 50,7% e 52,9% utilizando doses de 10, 30 e 60 mg/Kg/dia, respectivamente (ALMEIDA et al., 2021).

Diante do potencial anticâncer da CNFD é de suma importância a avaliação de parâmetros como características físico-químicas, farmacocinéticas, toxicológicas e tecnológicas visando sua aplicação como fármaco, bem como a sua avaliação quanto ao rendimento de obtenção de modo que a mesma possa obter o perfil necessário para a continuação dos estudos de desenvolvimento de fármacos, e assim possa atuar como uma nova possibilidade de terapia para o tratamento do câncer.

2. REFERÊNCIAS

ALDHOLMI, M. et al. A Decade of Antifungal Leads from Natural Products: 2010–2019. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 182, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fph12040182>

ALMEIDA, P. D. O et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chem.-Biol**

Interact, v. 30, n. 343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109444>

ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, 12 dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165646>

ARÁNYI, P. Ethical aspects of drug development. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 244–246, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.015>

BRICK, V. D. S.; HOSSNE, W. S.; HOSSNE, R. S. Clinical research on new drugs (Phase I). Profile of scientific publications: Data from the pre-clinical phase and bioethical aspects. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 531–535, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502008000600010>

CAHYANA, A. H.; MAFAZI, A.; LIANDI, A. R. Synthesis of antioxidant agents based on improvement of hydroxyl groups prepared from lawsone compounds. **AIP Conference Proceedings**, v. 2242, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0007889>

CHEN, J. et al. Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 12, p. 4302–4312, 2018.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000443404>

DA SILVA, C. C. et al. Antibacterial Activity of 2-Amino-1,4-naphthoquinone Derivatives Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains and Their Interaction with Human Serum Albumin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 9, p. 1838–1851, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200070>

DANDAWATE, P. R. et al. Perspectives on Medicinal Properties of Benzoquinone Compounds. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 436–454, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2174/138955710791330909>

DEMIR, Y. Naphthoquinones, benzoquinones, and anthraquinones: Molecular docking, ADME and inhibition studies on human serum paraoxonase-1 associated with cardiovascular diseases. **Drug Development Research**, v. 81, n. 5, p. 628–636, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.21667>

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>

DOYTCHINOVA, I. Drug Design-Past, Present, Future. **Molecules**, v. 5, n. 27, p. 1496, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27051496>

EPIFANO, F. et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 37, n. 13, p. 37–49, 2014.

EYONG, K. O. et al. Antiproliferative activity of naphthoquinones and indane carboxylic acids from lapachol against a panel of human cancer cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 6, p. 1058–1066, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02545-0>

FAKUNLE, E. S.; LORING, J. F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 709-716, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.10.007>

FANG, J.-Y. et al. Synthetic Naphthofuranquinone Derivatives Are Effective in Eliminating Drug-Resistant *Candida albicans* in Hyphal, Biofilm, and Intracellular Forms: An Application for Skin-Infection Treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2053, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02053>

FARID, S. S. et al. Benchmarking biopharmaceutical process development and manufacturing cost contributions to R&D. **mAbs**, v. 12, n. 1, p. 1754999, 2020. DOI: [doi: 10.1080/19420862.2020.1754999](https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1754999)

FERREIRA, D. C. M. et al. Ex vivo Activities of β -Lapachone and α -Lapachone on Macrophages: A Quantitative Pharmacological Analysis Based on Amperometric Monitoring of Oxidative Bursts by Single Cells. **ChemBioChem**, v. 10, n. 3, p. 528–538, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.200800517>

FOGEL, D. B. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. **Contemporary Clinical Trials Communications**, v. 2, n. 11, p. 156-164, 2018.

FREIRE, C. P. V. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, v. 1, n. 3, p. 229, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0MD00074D>

FUTURO, D. O. et al. The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 1187–1214, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170815>

GRIME, K. H.; BARTON, P.; MCGINNITY, D. F. Application of in silico, in vitro and preclinical pharmacokinetic data for the effective and efficient prediction of human pharmacokinetics. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1191–1206, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/mp300476z>

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avancados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades

of patent research(1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 10, p. 1111–1121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339792>

JAAKS, P. et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. **Nature**, v. 603, p. 166-173, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04437-2>

KATTNER, P. et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 4, n. 38, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09836-y>

KRZYSZCZYK, P. et al. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. **Technology**, v. 06, n. 03n04, p. 79–100, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1142/s2339547818300020>

LEE, M. H. et al. Analysis of the mechanisms of action of naphthoquinone-based anti-acute myeloid leukemia chemotherapeutics. **Molecules**, v. 24, n. 17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24173121>

LIANG, X. et al. A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, n. 1, p. 129-168, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.034>

LOMBARDO, F. et al. In Silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 9097-9113, 2017.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217–222, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2991%2Fjegh.k.191008.001>

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651-657, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 3, n. 83, p. 770-803, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NUNES, I. K. DA C. The importance of metabolism study in the early stages of drugs development. **Revista Virtual de Quimica**, v. 7, n. 2, p. 649–662, 2015.

PAJODORO, D. N. et al. Antioxidant Properties of Lapachol and Its Derivatives and Their Ability to Chelate Iron (II) Cation: DFT and QTAIM Studies. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155%2F2020%2F2103239>

PERES, R. S. et al. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 47,

2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1236-x>

PEREYRA, C. E. et al. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 2, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8>

PHAM, J. V. et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>

PIÑERO, J.; FURLONG, L. I.; SANZ, F. In silico models in drug development: where we are. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 42, p. 111-121, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.007>

PODOLSKIY, D. I.; GLADYSHEV, V. N. Intrinsic versus extrinsic cancer risk factors and aging. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 10, p. 833–834, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.08.001>

QIU, H. Y. et al. Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 91, n. 3, p. 681-690, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.13141>

RANI, R. et al. Natural naphthoquinones and their derivatives as potential drug molecules against trypanosome parasites. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 100, n. 6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.14122>

ROA-LINARES, V. C. et al. Anti-herpetic, anti-dengue and antineoplastic activities of simple and heterocycle-fused derivatives of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-antraquinone. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24071279>

SANTOS, M. de O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>

SEYHAN, A. A. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. **Translational Medicine Communications**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2019.

SUN, D. et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? **Acta Pharm Sin B**, v. 7, n.12, p. 3049–3062, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>.

TAMIMI, N. A. M.; ELLIS, P. Drug Development: From Concept to Marketing! **Nephron Clinical Practice**, v. 113, n. 3, p. c125–c131, 2009.

TAYLOR, D. The pharmaceutical industry and the future of drug development. **Issues in Environmental Science and Technology**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781782622345-00001>

UMSCHEID, C. A.; MARGOLIS, D. J.; GROSSMAN, C. E. Key concepts of clinical trials: A narrative review. **Postgraduate Medicine**, v. 5, n. 123, p.194-204, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3810%2Fpgm.2011.09.2475>

WARDLE, J. et al. Screening for prevention and early diagnosis of cancer. **American Psychologist**, v. 70, n. 2, p. 119–133, 1 fev. 2015.

WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 9, n. 323, p. 844-853, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>

ZARGAR, A. et al. Overcoming the challenges of cancer drug resistance through bacterial-mediated therapy. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 5, n. 4, p. 258–266, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.cdtm.2019.11.001>

ZHANG, X. et al. Overview of phase IV clinical trials for postmarket drug safety surveillance: A status report from the ClinicalTrials.gov registry. **BMJ Open**, v. 11, n. 6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010643>

ZHOU, S.; ZHONG, W. Drug Design and Discovery: Principles and Applications. **Molecules**, v. 2, n. 22, p. 279, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules22020279>

CAPÍTULO 2
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO SINTÉTICO PARA OBTENÇÃO
DA 7-DIHIDRO-5H-CICLOPENTA[B]NAFTO[2,1-D]FURANO-
5,6(9AH)-DIONA

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são fontes de diversos metabólitos secundários, que além de apresentarem uma diversidade química e estrutural, apresentam um grande potencial farmacológico, sendo utilizado como fonte de moléculas empregadas como pontos de partida muito bons para o *design* e a síntese de análogos (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; TWAJI; HASAN, 2022). Embora grande parte das moléculas líderes sejam provenientes de produtos naturais, dificilmente podem ser empregados diretamente em aplicações clínicas. Portanto, modificações estruturais destas moléculas são essenciais em vários casos visto que produtos naturais e seus derivados semi-sintéticos são fontes valiosas de novos candidatos a fármacos com uma variedade de atividades farmacológicas (MAIJHI; DAS, 2021).

Entre os processos disponíveis para a obtenção de moléculas ativas oriundas de produtos naturais estão as reações de semissíntese, que surgiram como uma ferramenta para promover modificações estruturais e modular suas propriedades biológicas, sendo realizado por meio de uma sequência de reações partindo, geralmente, de precursores mais simples (LI; LOU, 2018). Neste sentido, encontra-se a CNFD (7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona), que é uma piranaftoquinona semissintética derivada da lausona (FREIRE et al., 2010).

A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é a substância majoritária da *Lawsonia inermis*, uma espécie vegetal reconhecida por sua importância medicinal, cosmetológica e cultural, principalmente no Oriente (ALEM et al., 2020). A lausona é uma naftoquinona amplamente estudada quanto à sua atividade biológica, sendo a precursora na síntese de

substâncias com potencial atividade biológica, onde muitos de seus derivados apresentam atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica (NAVARRO-TOVAR et al., 2023).

A CNFD é uma molécula obtida de forma sintética por meio de uma cicloadição oxidativa [3+2] mediada por nitrato de amônio cérico (IV) (CAN) a partir da lausona e do ciclopentadieno (FREIRE et al., 2010). O mecanismo desta reação proposto por Nair e colaboradores (2001) (Figura 1) demonstra a atuação do CAN, inicialmente, na oxidação da lausona formando um radical (1), que se acopla ao ciclopentadieno (2), e posteriormente, na oxidação desse intermediário, promovendo a formação de um cátion (3), que sofre um rearranjo, podendo formar dois intermediários isoméricos (4) e (5), cuja ciclização, resulta, respectivamente, na CNFD e seu distômero, a IVS320.

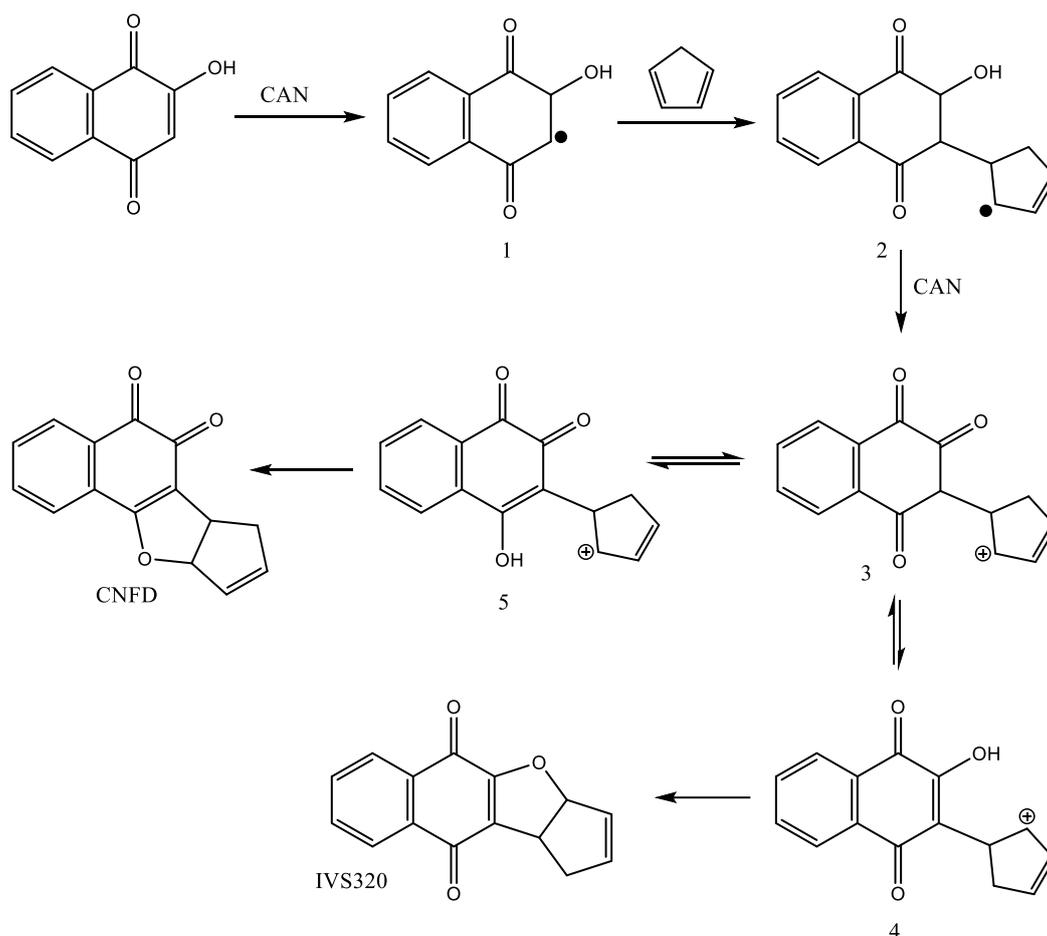


Figura 1 – Rota sintética utilizada para obtenção da CNFD.

Fonte: Nair et al., 2001.

A CNFD apresenta ação citotóxica em diferentes linhagens tumorais, além de uma potente atividade antitumoral em estudos *in vivo* utilizando o modelo murino de melanoma (ALMEIDA et al., 2021). Embora seja uma molécula promissora, aspectos relacionados à sua obtenção precisam ser avaliados e otimizados para que possa ser considerada um potencial candidato a fármaco e consiga ser inserida dentro da indústria farmacêutica, visto que seu processo de síntese tem rendimento de 15%, o que implica em alto custo e inviabiliza sua produção em larga escala (FREIRE et al., 2010; VAMATHEVAN et al., 2019).

Otimizar um processo significa avaliar quais variáveis envolvidas produzem a melhor resposta por meio da variação dos parâmetros analisados, onde o uso de ferramentas estatísticas tem sido de grande importância frente a enorme combinação das diversas várias relacionadas ao processo (TAYLOR et al., 2023). Destacando-se o planejamento fatorial que, quando efetuado corretamente, acarreta na redução da variabilidade de resultados, tempo de análise, número de ensaios e custos envolvidos no processo, bem como no estudo simultâneo de diversas variáveis e seus respectivos efeitos (JANKOVIC; CHAUDHARY; GOIA, 2021).

A literatura mostra inúmeras aplicações da utilização do planejamento fatorial na otimização de sínteses. Bonouri (2020) determinou as condições ótimas de temperatura, tempo de contato e estequiometria da síntese de brometo de neodímio (III) através de apenas oito experimentos, resultando num rendimento de 97,80%. Além da temperatura, Zimmer (2017) também avaliou a influência do tempo reacional durante o processo de isomerização utilizado na obtenção de lactulose a partir de resíduos ricos em lactose. Também é possível observar que um parâmetro não tenha influência no processo de obtenção, fato avaliado por Machado e colaboradores (2018), que observaram que o

tamanho da partícula cristalizada de óxido de zinco depende do tipo de precursor e da temperatura da síntese, mas não do tempo reacional.

Desse modo, é de grande interesse que seja desenvolvido um processo para a obtenção da CNFD que vise menores custos, utilização de reagentes mais simples e etapas com rendimentos otimizados, que possam ser aplicáveis de forma vantajosa em escalas maiores. Por todo exposto, este trabalho propôs a otimização do processo de obtenção da CNFD, tendo em vista sua aplicação como uma molécula promissora para o tratamento do câncer.

2. METODOLOGIA

2.1.Obtenção da CNFD padrão

A CNFD, obtida sinteticamente a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona conforme protocolo de Freire e colaboradores (2010), foi cedida pelo professor Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira da Universidade Federal Fluminense para que fosse utilizada como padrão durante a execução do processo de otimização.

2.2.Síntese da CNFD

O método reacional foi adaptado das condições descritas por Freire e colaboradores (2010), onde foi utilizado 1 mmol de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona solubilizada em 10 mL de tetrahidrofurano (THF), 1 mmol de ciclopentadieno previamente clivado, ao qual foi adicionada uma solução de concentração variável de nitrato de amônio cérico IV (CAN), e a mistura obtida foi mantida sob agitação a uma temperatura que variou de 0 a 5 °C.

Após o tempo determinado, adicionou-se 20 mL de água destilada e extraiu-se três vezes com 15 mL de diclorometano. Sulfato de sódio anidro foi adicionado e filtrado. O

solvente foi evaporado e o produto bruto foi separado em coluna cromatográfica aberta (1,5 de diâmetro e 14 cm de altura) contendo sílica gel 60G (70-230 mesh), onde foi utilizado éter de petróleo:acetato de etila (96:4 v/v) como fase móvel e volume de coleta de 10 mL para cada fração obtida.

2.3.Planejamento Fatorial para otimização da obtenção da CNFD

A partir do método descrito no item 2.2., foi proposto um experimento exploratório utilizando como variável qualitativa o tipo de solvente e como variáveis quantitativas o tempo de reação e a quantidade de catalisador utilizado, visando aumentar o rendimento. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 3^2 , onde a concentração do catalisador e o tempo de reação foram escolhidos como fatores (Tabela 1).

Tabela 1. Planejamento fatorial 3^2 utilizado para a obtenção da CNFD.

Variáveis	Níveis		
	1	2	3
Concentração do catalisador (equivalente-grama)	2	2.5	3
Tempo (minutos)	30	45	60

De acordo com a matriz de planejamento fatorial, 9 experimentos foram propostos para avaliar a influência dos fatores no rendimento do produto (Tabela 2), e esses experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 2. Matriz do planejamento factorial 3^2 utilizado para a obtenção da CNFD.

Síntese	Tempo reacional (minutos)	Concentração do catalisador (equivalente-grama)
S1	30	2
S2	45	2
S3	60	2

S4	30	2.5
S5	45	2.5
S6	60	2.5
S7	30	3
S8	45	3
S9	60	3

A reações foram acompanhadas por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando éter de petróleo:acetato de etila (96:4 v/v) como fase móvel e revelada com luz UV 254 nm e revelador químico anisaldeído-sulfúrico. Todas as sínteses obtidas foram purificadas conforme descrito no item 2.1. e a CNFD obtida teve sua estrutura confirmada.

2.4.Confirmação estrutural

A confirmação da estrutura química foi realizada no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Central Analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por meio da espectrometria de massas (ESI-MS/MS-MS) em espectrômetro do tipo íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), operando com fonte de elétron spray (ESI).

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada em RMN de 300 MHz modelo Fourier 300 (Bruker, Massachusetts, EUA) para hidrogênio-1 (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C). Onde foi utilizado o clorofórmio deuterado como solvente, foram utilizados 550µL de solvente em tubo de RMN de 5mm. Todos os picos obtidos nos espectros foram comparados com a amostra padrão.

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão da média e seu intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas através da análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de realizar uma síntese racional, foi proposto um estudo exploratório que permitisse avaliar quais seriam as melhores condições reacionais para a obtenção da CNFD, visto que no estudo de Xia e Lee (2013), observou-se que conforme se alterava o tipo de solvente ou quantidade de catalisador permitia a formação ou não formação do produto esperado. Desta forma, neste estudo optou-se por utilizar diferentes solventes, como a acetonitrila (ACN) e tetrahidrofurano (THF), bem como misturas de acetonitrila e água (ACN/H₂O) e diclorometano e acetonitrila (DCM/ACN), os quais foram escolhidos de acordo com a solubilidade da lausona, a qual possui baixa solubilidade em solventes de alta polaridade, e do catalisador, que possui maior solubilidade em solventes mais polares (HO, 2001; HUSSAIN; SHAFEEQ, 2020).

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a figura 2. Ao final da reação, realizou-se a extração em funil de separação, onde se padronizou o processo com 20 mL de água destilada e três repetições da extração com 15 mL de diclorometano. O produto bruto permaneceu por 24 horas em capela de exaustão para a eliminação total do solvente residual. Em seguida, realizou-se a purificação cromatográfica em coluna utilizando como fase móvel uma mistura de éter de petróleo e acetato de etila (96:4).



Figura 2 - Processo de síntese e purificação da CNFD. (A) Quebra da molécula de dicitlopentadieno; (B) Síntese dos derivados; (C) Extração dos derivados com diclorometano; (D) Cromatografia em coluna; (E) Derivado purificado e seco.

Em relação ao catalisador, inicialmente foi proposto utilizar concentrações que variassem de 0,5 a 1 equivalente, enquanto o tempo de reação variou de 1 a 3 horas, visto que no protocolo estabelecido por Freire e colaboradores (2010), a CNFD foi obtida no tempo reacional de 3 horas, utilizando 2 equivalentes do catalisador. Em relação ao método original descrito, somente a quantidade de lausona foi mantida inalterada, que foi de 1 mmol. A partir destas condições propostas, conseguiu-se obter a CNFD e os rendimentos estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 - Reação da obtenção da CNFD sob diferentes condições reacionais*.

Síntese	Solvente	Catalisador (Eq)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	THF	1	1	17,0 ± 1,27
2	THF	0,5	1	4,1 ± 0,95
3	THF	1	3	13,7 ± 1,68
4	THF	0,5	3	4,8 ± 1,12
5	ACN	1	1	18,1 ± 1,67
6	ACN	0,5	1	8,9 ± 0,89
7	ACN	1	3	4,7 ± 2,39
8	ACN	0,5	3	4,3 ± 1,89
9	DCM/ACN	1	1	11,5 ± 2,01
10	DCM/ACN	0,5	1	13,0 ± 1,07
11	DCM/ACN	1	3	13,4 ± 1,43
12	DCM/ACN	0,5	3	12,2 ± 1,19
13	ACN/água	1	1	1,4 ± 0,49
14	ACN/água	0,5	1	4,2 ± 1,09

15	ACN/água	1	3	17,0 ± 1,22
16	ACN/água	0,5	3	5,0 ± 1,88

*Condições reacionais: lausona (1mmol), ciclopentadieno (2mmol), solvente (10 mL), temperatura de 0 a 5° C, sob agitação constante. A formação do produto esperado foi observada por CCD.

Os maiores rendimentos observados foram obtidos quando se utilizou o solvente acetonitrila, tetrahidrofurano e a mistura acetonitrila/água que foram $18,1 \pm 1,67\%$, $17,0 \pm 1,27\%$ e $17,0 \pm 1,22\%$, respectivamente, bem como a utilização da concentração de 1 equivalente-grama do catalisador e tempo reacional de 1 hora. Porém este resultado foi considerado insatisfatório, visto que para obter a quantidade de produto necessária para viabilizar a continuação do estudo da CNFD, seriam necessárias grandes quantidades de reagentes.

Ao comparar a variável tempo reacional, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no tempo de 1 e 3 horas. Contudo, observou-se que quando há o aumento na quantidade de catalisador, ocorre o aumento do rendimento da reação, o que corrobora para o mecanismo proposto por Nair e colaboradores (2001), que indica a necessidade da atuação do catalisador em duas fases da reação.

Devido as diferenças de solubilidade dos reagentes em diferentes polaridades, observou-se que ocorria uma incompleta solubilização dos componentes reacionais o que poderia influenciar no baixo rendimento observado. Assim, com o intuito de reduzir tais interferências observadas durante as sínteses, e analisar a relação solvente/rendimento, foi proposto modificar as variáveis: tipo de solvente e quantidade de catalisador, sendo mantida o tempo reacional de 1 hora. A partir disso, foram utilizadas as condições descritas na tabela 4.

Tabela 4 - Condições reacionais utilizadas nas sínteses 17 a 21.

Síntese	Solvente	Catalisador (Equivalente-grama)	Tempo (horas)	Rendimento (%)
17	THF/água	2,5	1	42,04 ± 2,09
18	ACN	2,5	1	23,96 ± 2,13
19	DCM/ACN	2,5	1	28,59 ± 1,53
20	ACN/água	2,5	1	19,46 ± 1,88
21	THF	2,5	1	42,46 ± 2,34

A partir das novas condições reacionais realizadas, pode-se observar um aumento significativo no rendimento da obtenção da CNFD em relação às condições iniciais, sendo que o maior rendimento obtido foi utilizando como solvente o tetrahydrofurano e a mistura de tetrahydrofurano/água, ambos os sistemas com 2,5 equivalentes-grama do catalisador, onde se obteve o rendimento de $42,46 \pm 2,34\%$ e $42,04 \pm 2,09\%$, respectivamente, os quais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si, sugerindo assim que ambos os solventes poderiam ser utilizados para a obtenção da CNFD. Tal rendimento obtido foi superior ao método inicial descrito por Freire e colaboradores (2010), onde obtiveram rendimento de 15%. Assim, pode-se afirmar que, conforme há o aumento do catalisador, há o aumento no rendimento da obtenção da CNFD.

Para observar o efeito da influência do catalisador e verificar se um tempo reacional inferior a uma hora poderia afetar no rendimento, optou-se por realizar um planejamento fatorial 3^2 , utilizando o sistema tetrahydrofurano/água como solvente. Os resultados são exibidos na tabela 5.

Tabela 5 - Rendimento das reações para obtenção do CNFD em diferentes condições de reação no planejamento fatorial 3^2 .

Síntese	Catalisador (equivalente-grama)	Tempo (minutos)	Rendimento %
S1	2,0	30	-
S4	2,5	30	-
S7	3,0	30	-
S10	2,0	45	30,34 ± 5,17

S13	2,5	45	26,27 ± 3,27
S16	3,0	45	36,82 ± 2,02
S19	2,0	60	41,76 ± 2,82
S22	2,5	60	45,75 ± 2,04
S27	3,0	60	48,16 ± 1,58

A partir dos experimentos realizados no tempo de 30 minutos, observou-se que em todas as concentrações avaliadas do catalisador não houve formação de CNFD, conforme observado por meio da avaliação com a CCD (Figura 3A). Só foi possível observar a formação do produto após 45 minutos de iniciada a reação (Figura 3B).

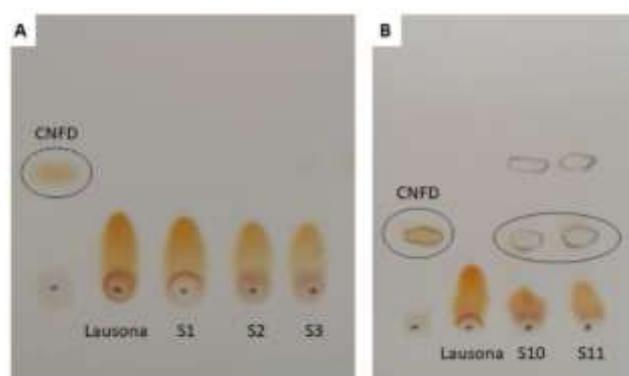


Figura 3 - Síntese do CNFD. (A) CCD das reações em 30 minutos nas concentrações 2,0 (S1), 2,5 (S2) e 3,0 (S3) equivalentes. (B) CCD das reações no tempo de 45 minutos na concentração 2,0 equivalentes (S10 e S11).

Ao analisar a variável concentração do catalisador, não se observou diferença estatística nas concentrações de 2,5 e 3 equivalente-grama ($p > 0,05$) no rendimento da CNFD ao se comparar todas as concentrações testadas. Já em relação ao tempo reacional, verificou-se que só houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando se utilizou a concentração de 2 equivalentes onde se observou um maior rendimento no tempo de 60 minutos.

Assim, ao se avaliar as condições de análise para a CNFD, pode-se inferir que concentrações inferiores a 2 equivalentes do catalisador não permitem um aumento no

rendimento do produto, visto que nas primeiras tentativas, onde se utilizou concentrações de 0,5 e 1 equivalente, obteve-se um rendimento máximo de 18,1%. Além disso, observou-se que é necessário um tempo superior a 30 minutos para se observar a formação do produto reacional.

Os produtos obtidos foram submetidos à análise de espectrometria de massas no modo positivo, e apresentaram um espectro de íons totais que revelou a presença de um pico base de m/z 239,17 conferindo com a massa da molécula desejada (Figura 4A). Além disso, foi possível observar a presença de dois íons com peso molecular superior ao da CNFD. Acredita-se que o íon 261,15 seja o resultado da formação do aduto de sódio com a molécula, e que o íon 499,04 seja oriundo do aduto de sódio com a CNFD dimerizado na fonte de ionização ou no analisador quadrupolo (Figura 4B).

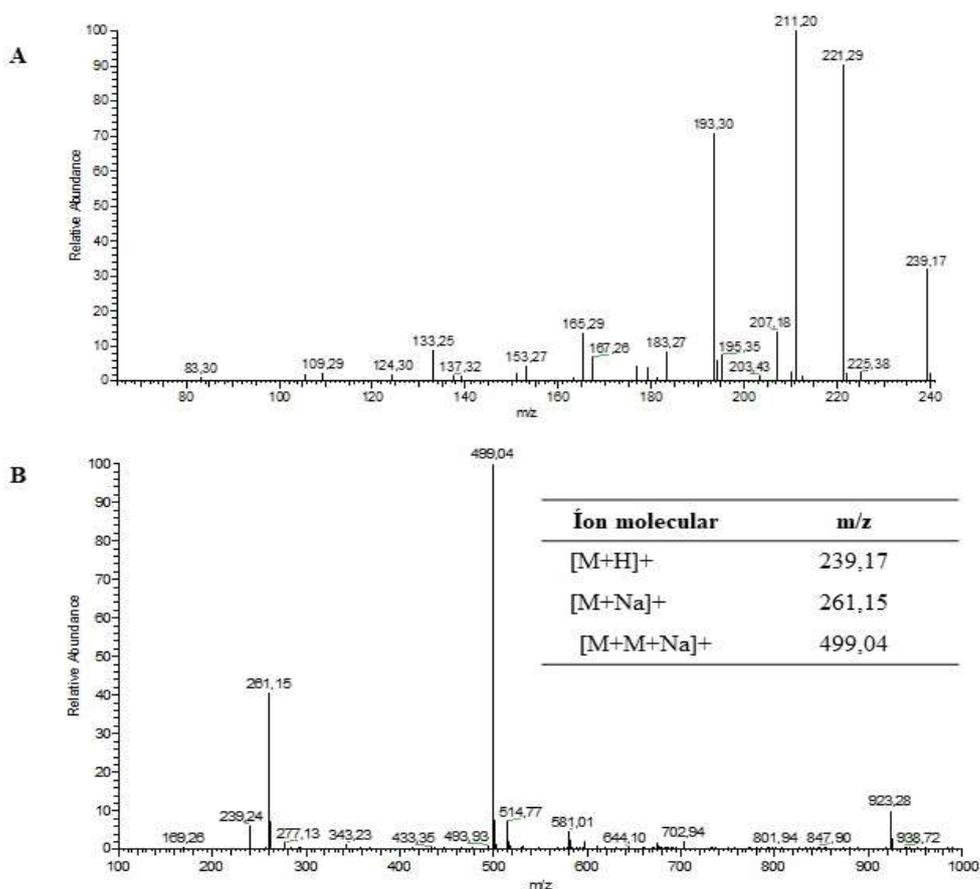


Figura 4 - Espectro de massas da CNFD sintetizada. (A) íon molecular da CNFD fragmentado. (B) formação de adutos com a CNFD.

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) é uma técnica importante para determinação da estrutura de uma molécula, auxiliando na identificação do esqueleto carbono-hidrogênio da mesma (KELMAN et al, 2012). Desse modo, essa técnica foi utilizada para confirmação da estrutura da CNFD (Figura 5).

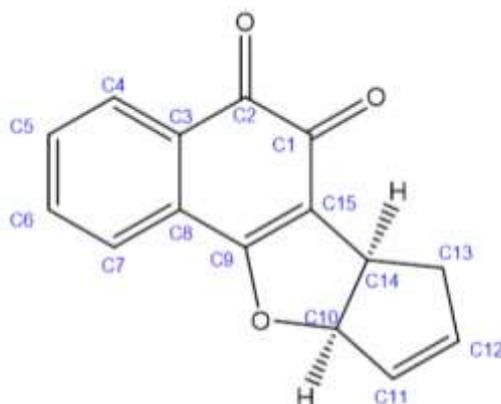


Figura 5 – Identificação dos carbonos da estrutura química da CNFD.

A Tabela 6 apresenta os deslocamentos de hidrogênio e carbono presentes identificados na amostra em comparação ao padrão.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da CNFD em comparação ao padrão.

Carbono	CNFD padrão		CNFD sintetizada	
	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
1	-	182,2	-	181,3
2	-	178,43	-	175,4
3	-	31,66	-	38,1
4	7,92	124,84	8,06	124,7
5	7,75	128,03	7,74	129,2
6	7,66	135,27	7,59	134,4
7	7,61	123,7	7,53	119,3
8	-	32,51	-	41,1
9	-	167,32	-	158,2
10	6,21	97,84	6,20	97,6

11	6,21	128,03	6,20	127,8
12	5,99	129,07	5,94	129,2
13	2,50; 2,54	41,08	2,69	41,1
14	2,77	39,86	2,70	38,1
15	-	102,84	-	99,6

A CNFD obtida em todas as reações foi caracterizada e teve sua estrutura química confirmada pela análise de RMN de ^1H e ^{13}C quando comparada com os sinais de deslocamentos da CNFD padrão, além de corroborar com os sinais de deslocamentos descritos por Freire e colaboradores (2010). A elucidação estrutural apresentada neste trabalho é inequívoca, pois existem deslocamentos químicos típicos apresentados por esta estrutura na literatura, o que foi claramente detectado em nossos espectros.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, este estudo foi capaz de otimizar o processo de semissíntese de CNFD, onde pode-se inferir que um tempo maior que uma hora não influencia no rendimento da reação, e que o fator limitante para o aumento do rendimento é a quantidade de catalisador seguido do tipo de solvente. No entanto, um tempo inferior a 30 minutos não é suficiente para obter a formação da CNFD, e concentrações acima ou igual a 2,5 equivalentes-grama do catalisador não apresentam diferença estatística no rendimento da reação. Bem como as condições otimizadas permitiram o aumento do rendimento da reação de 15% para cerca de 48% em comparação ao método original.

5. REFERÊNCIAS

ALEM, F. et al. Lawsone quantification in *Lawsonia inermis* L. by HPLC-MS: How does the temperature and pluviometry affect lawsone concentration? **Industrial Crops and**

Products, v. 158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112960>

ALMEIDA, P. D. O et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chem.-Biol Interact**, v. 30, n. 343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109444>

BOUNOURI, Y. et al. Optimization and modeling of synthesis parameters of neodymium (III) bromide by dry method using full factorial design analysis. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.003>

FREIRE, C. P. V. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, v. 1, n. 3, p. 229, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0MD00074D>

HO, T. L. Cerium(IV) Ammonium Nitrate. In: Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research(1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 10, p. 1111–1121, 2017. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339792>

JANKOVIC, A.; CHAUDHARY, G.; GOIA, F. Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. **Energy and Buildings**, v. 250, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111298>

KELMAN, D., WRIGHT, A. D. The importance of ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy for reference standard validation in analytical sciences. **PlosOne**, v. 7, n. 7, 2012.

LI, G.; LOU, H. Strategies to diversify natural products for drug Discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/med.21474>

MACHADO, M. M. et al. Effect of Temperature, Precursor Type and Dripping Time on the Crystallite Size of Nano ZnO Obtained by One-Pot Synthesis: 2k Full Factorial Design Analysis. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, v. 18, n. 6, p.4409-4412, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15043>

MAJHI, S.; DAS, D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. **Tetrahedron**, v. 78, n. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131801>

NAIR, V. et al. Hetero Diels–Alder reactions of o-thioquinones with cyclic dienes: an efficient synthesis of novel heterocyclic compounds. **Tetrahedron**, v. 57, n. 39, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00814-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00814-6)

NAVARRO-TOVAR, G. et al. The Relevance and Insights on 1,4-Naphthoquinones as Antimicrobial and Antitumoral Molecules: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 16, p. 496, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16040496>

TAYLOR, C. J. et al. A Brief Introduction to Chemical Reaction Optimization. **Chemical Reviews**, v. 6, n. 123, p. 3089-3126, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00798>

TWAJI, B. M.; HASAN, N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>

VAMATHEVAN, J. et al. Applications of machine learning in drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 18, p. 463-477, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038%2Fs41573-019-0024-5>

ZIMMER, F. C. et al. Application of Factorial Design for Optimization of the Synthesis of Lactulose Obtained from Whey Permeate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2326-2333, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170083>

CAPÍTULO 3

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOFORMULAÇÃO
CONTENDO A 7-DIHIDRO-5H-CICLOPENTA[B]NAFTO[2,1-
D]FURANO-5,6(9AH)-DIONA**

CAPÍTULO 3

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia surgiu como uma grande promessa de inúmeros benefícios a diversos campos, incluindo o medicinal. Nesse sentido, o ramo da ciência denominado de nanomedicina busca no universo nanobiotecnológico meios que também possam favorecer terapias para doenças das mais diferentes naturezas, incluindo as doenças cancerígenas (ABDUSSALAM-MOHAMMED, 2019).

A utilização da nanotecnologia visando aumento da biodisponibilidade dos fármacos foi revolucionária para a indústria farmacêutica. Os produtos elaborados a partir desta tecnologia têm alcançado melhoria na resposta terapêutica, uma vez que tem se observado uma maior estabilidade dos níveis dos fármacos no organismo. Além disso, também é possível alcançar melhor eficácia utilizando doses menores dos ativos farmacêuticos (SUN; YANG; TENG, 2020).

A incorporação de nanofármacos para tratamento do câncer têm como alvo o aumento da distribuição do medicamento na região tumoral, que deve ser convertida em uma resposta antitumoral intensificada. Contudo, para que isso ocorra, é necessário investigar modelos específicos que simulam processos *in vivo* em termos de interação de proteínas séricas, microambiente tumoral e matriz extracelular (KOPECKOVA et al., 2019).

A maioria dos medicamentos anticâncer têm baixa solubilidade em água, rápida depuração do sangue, baixa seletividade do tumor e efeitos colaterais graves para tecidos saudáveis, sendo necessária à sua modulação para melhoria das suas propriedades tecnológicas e farmacológicas. Nesse sentido, as nanoformulações vem ganhando

destaque por permitir a modulação de características físico-químicas que facilitam a liberação do fármaco e seu comportamento biológico, permitindo melhorar a biodisponibilidade e facilitar o processo de carreamento de um fármaco (DENG et al., 2020; LI et al., 2019; PASUT, 2019).

Dentre os diversos tipos de nanoformulações, encontram-se as nanopartículas poliméricas, que são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , perfil granulométrico homogêneo e monomodal (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZIELINSKA et al., 2020). Neste grupo, estão incluídas as nanocápsulas, que são nanopartículas constituídas de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica (DENG et al., 2020; KOTHAMASU et al., 2012) (Figura 1).

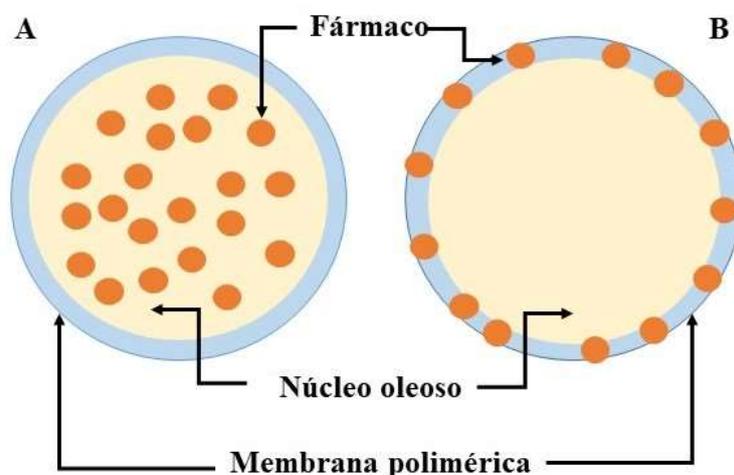


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de uma nanocápsula. (A) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; (B) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas.

Fonte: adaptado de Zielinska e colaboradores (2020).

As nanoesferas são estruturas formadas por matrizes poliméricas que, diferentemente das nanocápsulas o núcleo não se apresenta diferenciado (isento de óleo). Os fármacos neste tipo de estrutura estão distribuídos ou encapsulados de forma homogênea na matriz polimérica, e ainda, podem estar adsorvidos na superfície da nanoesferas, onde o processo de

liberação do fármaco a partir deste tipo de nanoestrutura será por difusão (DIAS, 2018; BOLTNAROVA et al., 2021) (Figura 2).

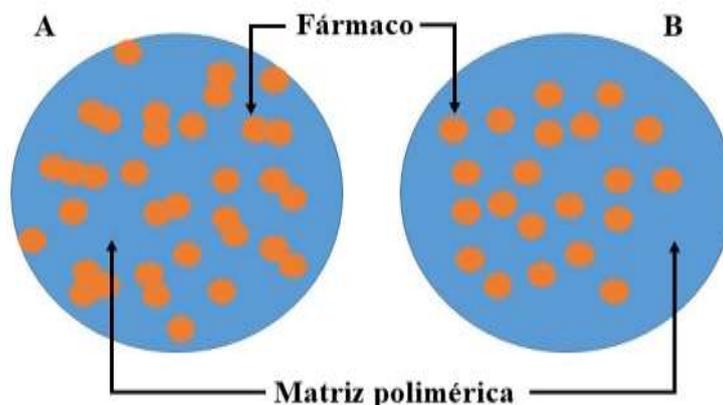


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoesfera. (A) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; (B) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: adaptado de Zielinska e colaboradores (2020).

Os sistemas compostos de nanopartículas poliméricas, sendo eles as nanocápsulas e nanoesferas, podem auxiliar na aquisição das características necessárias a um fármaco anticancerígeno. Os sistemas nanoparticulados podem aumentar a relação área/volume e a reatividade, com possibilidades de promover a encapsulação de substâncias de baixa solubilidade, fornecer proteção a moléculas, viabilizar a modulação de características físico-químicas de agentes farmacológicos bem como minimizar seus efeitos indesejados, modificar a biodistribuição dos agentes terapêuticos, prolongar o tempo de circulação do fármaco, facilitar a absorção, melhorar o direcionamento e fornecer liberação controlada (YURGEL; COLLARES; SEIXAS, 2013; DIAS, 2018; DENG et al., 2020).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores conhecidas por melhorar potencialmente a estabilidade do fármaco e duração do efeito terapêutico, além de minimizar a degradação, o metabolismo e o efluxo celular (MASOOD, 2016; PATHAK; RAGHUVANSHI, 2015). Devido ao seu tamanho de partícula e sua característica coloidal, são capazes de entregar o fármaco de forma eficaz ao tecido linfático, e em

seguida, liberá-lo diretamente na corrente sanguínea (ZIELINSKA et al., 2020). Além disso, conseguem contornar o efluxo da glicoproteína-P das células epiteliais intestinais, aumentando assim a sua absorção (PRIDGEN; ALEXIS; FAROKHZAD, 2015; SRIKAR; RANI, 2019).

Nanopartículas à base de poliéster, incluindo os polímeros poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), ácido polilático (PLA) e policaprolactona (PCL) tem sido usados como matriz polimérica para sistemas de administração oral (BABADI et al., 2020). Mattos e colaboradores (2016) avaliaram nanopartículas de PLA com 5-fluorouracil para terapia anticâncer oral, bem como o efeito da modificação com polietilenoglicol (PEG) na absorção oral de 5-fluorouracil nanoencapsulado. Verificou-se que houve um aumento da biodisponibilidade oral do 5-fluorouracil quando nanoencapsulado, sendo que ambas as formulações apresentaram parâmetros farmacocinéticos semelhantes, incluindo a concentração máxima e tempo de meia-vida.

Em relação ao processo de eliminação das nanopartículas poliméricas, observa-se que este processo depende de vários fatores, como a escolha do polímero e dos copolímeros, o tamanho do polímero, a carga do polímero e a existência de direcionamento ativo para o tecido (MOSS; SICCARDI, 2014).

De acordo com o tamanho de partícula e composição da nanoformulação, elas são capazes de se difundir nos tecidos por meio de processos bem caracterizados, como maior permeabilidade e efeito de retenção, podendo se direcionar e se acumular em órgãos específicos. Característica desejada no tratamento de doenças como o câncer, que apresenta tecidos com permeabilidade vascular aumentada em comparação com os vasos encontrados nos tecidos normais. Contudo, para que o efeito de permeabilidade e retenção ocorra, alguns parâmetros devem ser observados, como a modulação do fluxo sanguíneo do tumor, a modulação da vasculatura tumoral e do estroma, bem como a capacidade do

fármaco de matar as células neoplásicas para reduzir sua função de barreira (NAKAMURA et al., 2016; PASUT, 2019).

Nesse sentido, a nanotecnologia é uma abordagem muito oportuna no estudo de novos candidatos a fármaco, como é o caso da CNFD, que apesar de se mostrar como uma molécula promissora, pouco se sabe sobre suas características tecnológicas, especialmente envolvendo a sua aplicação em nanoformulações

A partir do exposto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema carreador nanoestruturado polimérico contendo a CNFD, visando otimizar suas características físico-químicas e tecnológicas.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da substância teste

A CNFD foi obtida sinteticamente conforme protocolo otimizado descrito no capítulo 2. Onde se utilizou 1 mmol de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona em 10 mL de tetraidrofurano/água 1:1, 1 mmol de ciclopentadieno previamente quebrado, ao qual foi adicionado uma solução de 2,5 equivalente-grama de nitrato de amônio cérico. A mistura foi mantida em agitação por 1 hora, em temperatura de 0 a 5 °C sob agitação. A CNFD obtida foi purificada e mantida sob refrigeração até sua utilização.

2.2. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da CNFD

Para o desenvolvimento do método analítico, foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção ultravioleta

(CLAE-UV). O sistema de CLAE Shimadzu (Kyoto, Japão) compreendia um desgaseificador online DGU-20A5, uma unidade de bomba de solvente LC-20AT, um injetor automático SIL-10AF, um forno de coluna CTO-20A, um SPD-M20A (190-800 nm) detector de matriz de diodos e um controlador de sistema CBM-20A. A coluna analítica utilizada foi Luna 5u C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) da marca Phenomenex (Califórnia, EUA).

As condições cromatográficas utilizadas estão descritas no quadro 1. A identificação e quantificação da CNFD foi executada pelo monitoramento no comprimento de onda de 260 nm e os dados foram analisados utilizando o *software* LC Solution versão 1.25 SP1.

Quadro 1 – Condições cromatográficas estabelecidas.

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Luna 5u C18 100 A 250x4,6 mm, marca Phenomenex
Fluxo	0,8 mL/minuto
Volume de injeção	20 µL
Fase móvel	Acetonitrila e Água Ultrapura (80:20)
Temperatura da coluna	Ambiente
Detector	Arranjo de diodos
Comprimento de onda	260 nm
Tempo de corrida	12 minutos

Os ensaios para validação foram realizados de acordo com a RDC 166/2017 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.2.1 Linearidade

Para realização deste ensaio, foi preparada uma solução mãe (1mg/mL) do analito. Para isso, foram dissolvidos 5 mg da CNFD padrão em 500 µL de metanol, em seguida o volume foi completado para 5 mL usando acetonitrila.

Uma curva padrão com 5 pontos, utilizando soluções nas 10, 50, 75, 100 e 125 µg/mL foram preparadas partindo da solução mãe (1mg/mL), previamente filtrada por uma membrana Millipore® de 0,45 µm. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.2. Avaliação da Precisão - Teste de repetibilidade

Para a realização deste ensaio foram feitas nove injeções do analito, com concentração correspondente ao ponto médio da curva padrão (75 µg/mL). Foram estimados o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação.

2.2.3. Avaliação da Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado através do método de contaminação da amostra com a substância de referência, onde se utilizou o padrão de rotina. Este ensaio, também, é conhecido como teste de recuperação. Para este teste de acordo com ANVISA (2003) é possível uma variabilidade de até $100 \pm 10\%$, para matérias-primas e princípios ativos. O cálculo de recuperação foi feito pela seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = (\text{Quantidade recuperada} / \text{Quantidade real}) \times 100$$

2.3. Desenvolvimento das nanoformulações

2.3.1. Desenvolvimento de nancocápsulas contendo a CNFD

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de emulsificação-difusão do solvente (FESSI et al., 1989) envolvendo a mistura da fase orgânica na fase aquosa conforme o esquema apresentado na figura 3. Inicialmente, foram preparadas doze formulações em triplicata com o intuito de avaliar o efeito do polímero e dos tensoativos nas propriedades das nanopartículas obtidas. As condições das formulações estão descritas na tabela 1.

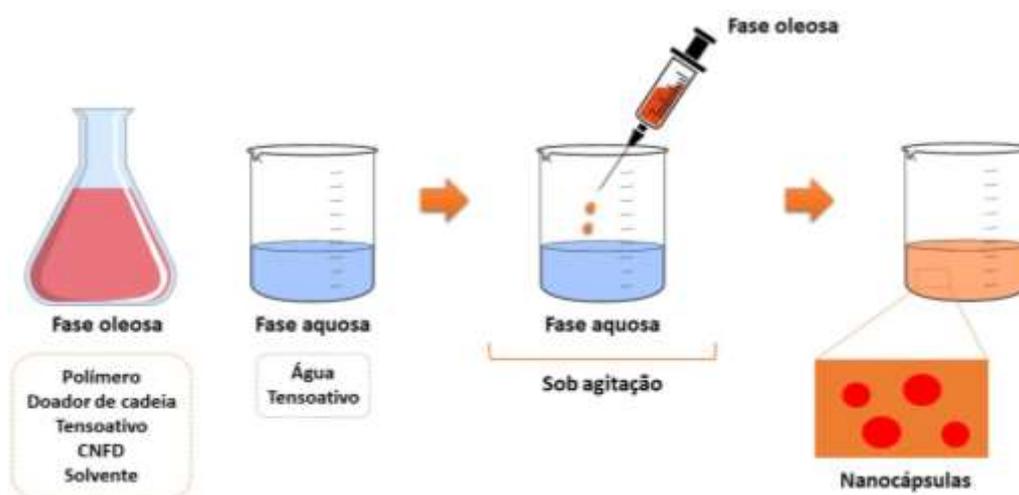


Figura 3 - Esquema simplificado de elaboração das nanocápsulas.

Fonte: adaptado de Tamashiro (2019).

Tabela 1 - Composição e condições das nanoformulações.

Formulação	Polímero	Aquecimento	Tensoativo	Doador de cadeia	Agitação
NANO01	Policaprolactona	Sim	Tween 80	Manteiga de cacau	Agitador magnético
NANO02	Policaprolactona	Sim	Tween 80	Manteiga de cacau	Ultra-Turrax
NANO03	PEG 4000	Sim	Tween 80	Manteiga de cacau	Agitador magnético

NANO04	PEG 4000	Não	Tween 80	Manteiga de cacau	Agitador magnético
NANO05	Kollocoat 100MP	Não	Tween 80	Manteiga de cacau	Ultra-Turrax
NANO06	Kollocoat 100MP	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO07	Eudragit EPO	Sim	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO08	Policaprolactona	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO09	Eudragit EPO	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO10	Eudragit E100	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO11	Kollocoat 100MP	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax
NANO12	Kollocoat 100 MP	Não	Tween 80	Palmitato de isopropila	Ultra-Turrax

A fase orgânica foi preparada dissolvendo o polímero no solvente sob agitação magnética a 400 rpm, contendo 500 mg do Span 20 (éster de monolaurato de sorbitano), 50 mg da CNFD, previamente dissolvida em 15 mL de acetona e 500 mg doador de cadeia. A mistura foi agitada durante 10 minutos usando agitador magnético (Fisatom, SP, Brasil). A fase aquosa foi composta por 50 mL de água ultrapurificada Mili-Q e 500 mg de polissorbato 80 (Tween 80), também foi mantida sob agitação por 10 minutos a 400 rpm. Posteriormente, a fase orgânica foi adicionada sobre a fase aquosa em um fluxo de 1mL/min mantendo a agitação por mais cinco minutos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em aparelho Ultraturrax (IKA, Alemanha) a 10.000 rpm por 5 minutos e a suspensão de nanopartículas obtida foi concentrada em um rotaevaporador (Buchi, Suíça) para eliminação total da acetona e obtenção de uma concentração final de 1mg/mL.

2.3.2. Desenvolvimento de nanoesferas contendo a CNFD

As nanoesferas contendo a CNFD foram obtidas pelo método de deslocamento de solvente de acordo com a metodologia descrita por Paiva e colaboradores (2013), onde alterou-se somente o polímero utilizado. As condições estabelecidas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Composição e condições das nanoformulações.

Fase	Condições
Fase orgânica	Solução acetônica com a CNFD (1 mg/mL) Polímero (50 mg) Metanol ou diclorometano (0,5 mL) Span 85 (16,65 mg) Acetona (10 mL)
Fase aquosa	Tween 80 (0,167%, 25 mL)

Inicialmente foram preparadas quatro formulações em triplicata contendo diferentes polímeros: Policaprolactona, Polietilenoglicol 400 (PEG 400), Polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) e Kollicoat MAE 100 P.

A fase orgânica foi preparada dissolvendo o polímero no solvente sob agitação magnética a 400 rpm, onde foi adicionado o Span 85 (trioleato de sorbitano) e a CNFD. A mistura foi agitada durante 10 minutos usando agitador magnético (Fisatom, SP, Brasil). A fase aquosa foi composta pela solução de Tween 80 a 0,167% também foi mantida sob agitação por 10 minutos a 400 rpm. Posteriormente, a fase orgânica foi adicionada sobre a fase aquosa em um fluxo de 1mL/min mantendo a agitação por mais cinco minutos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em aparelho Ultraturrax (IKA, Alemanha) a 10.000 rpm por 5 minutos e a suspensão de nanopartículas obtida foi concentrada em um rotaevaporador (Buchi, Suíça) para eliminação total do solvente e obtenção de uma concentração final de 0,75 mg/mL.

2.4. Caracterização das nanopartículas

2.4.1. Tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade

O tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e a condutividade foram medidos por espectroscopia de correlação de fótons usando um Zetasizer (MALVERN, Reino Unido). Na análise de tamanho de partícula e índice de polidispersão, as nanopartículas foram diluídas 1:9 (v/v) em água ultrapurificada e filtradas em membrana Millipore® (0,45 µm). Foi utilizado um comprimento de onda do laser de 633 nm, 173° de ângulo de espalhamento, a 25°C (RODRIGUEZ et al., 2017). As medidas foram feitas em triplicata.

Na análise do potencial zeta e a condutividade, as amostras foram dissolvidas em água destilada (1:9) e as medidas foram feitas a 25°C, usando uma voltagem de 150V. As medidas foram feitas em triplicata.

2.4.2. Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulação da CNFD das nanopartículas foi avaliada em CLAE utilizando método previamente validado, conforme item 2.2. A separação das nanopartículas do meio líquido foi realizada por ultrafiltração/centrifugação (ANGELI, 2007; FESSI et al., 1989), utilizando dispositivo com membrana de celulose regenerada de tamanho de poro 10 kDa (Millipore®), no qual a suspensão passa pela membrana ficando retidas só as nanopartículas. Um volume exato da suspensão de nanopartículas (0,4 mL) foi colocada no dispositivo e centrifugado a 13.000 rpm, por 15 minutos, a temperatura de 24 °C. O líquido filtrado (200 µL) foi diluído em 400 µL de acetonitrila e filtrado por uma membrana Millipore® de 0,45 µm e injetado um volume de 20 µL no

equipamento. O conteúdo de CNFD encapsulada (EE) foi determinado por diferença entre a quantidade utilizada para preparação das nanopartículas (QT) e a quantidade determinada no líquido filtrado (QLF), conforme equação abaixo:

$$EE (\%) = [(QT - QLF) / QT] \times 100$$

2.4.3. Teste de estabilidade

Amostras das nanopartículas (25 mL) foram mantidas em frascos âmbar por 6 meses a 25 ± 2 °C e 65% de umidade relativa. O tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH foram medidos nos dias 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180.

A determinação dos valores de pH das nanocápsulas e nanoesferas foram realizadas utilizando um potenciômetro digital, previamente calibrado, à temperatura ambiente, sendo as medidas feitas diretamente nas suspensões.

Todas as medições foram feitas em triplicado e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

2.5. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão e/ou coeficiente de variação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e submetidos a análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação do método analítico

Para a avaliação das características de encapsulação, foi desenvolvido um método de separação de cromatografia líquida de alta eficiência analítico, tanto sua aplicação em como método para identificação da CNFD, como visando seu emprego em um método de separação para um cromatógrafo semi-preparativo, visto que é o método de purificação mais potente e versátil utilizado pela indústria farmacêutica (SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017).

Para a obtenção do método, utilizou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa, por permitir a separação de modo sensível de substâncias estreitamente semelhantes (BRAGA, 2018). Além disso, utilizou-se um método isocrático, visando facilitar a transposição do modo analítico para o semi-preparativo, que permite a separação e purificação de maiores quantidades de substâncias (SOARES et al 2022).

A composição da fase móvel foi definida após testar diferentes concentrações de acetonitrila, metanol e água ultrapura. Iniciou-se com proporções de metanol e água ultra pura (55:45) e (80:20), com tempo de análise de 20 minutos, porém o método não apresentou picos com boa resolução. Com a utilização da fase móvel acetonitrila e água (80:20), obteve-se o pico referente a CNFD com resolução satisfatória e tempo de retenção de 4,9 minutos (Figura 4).

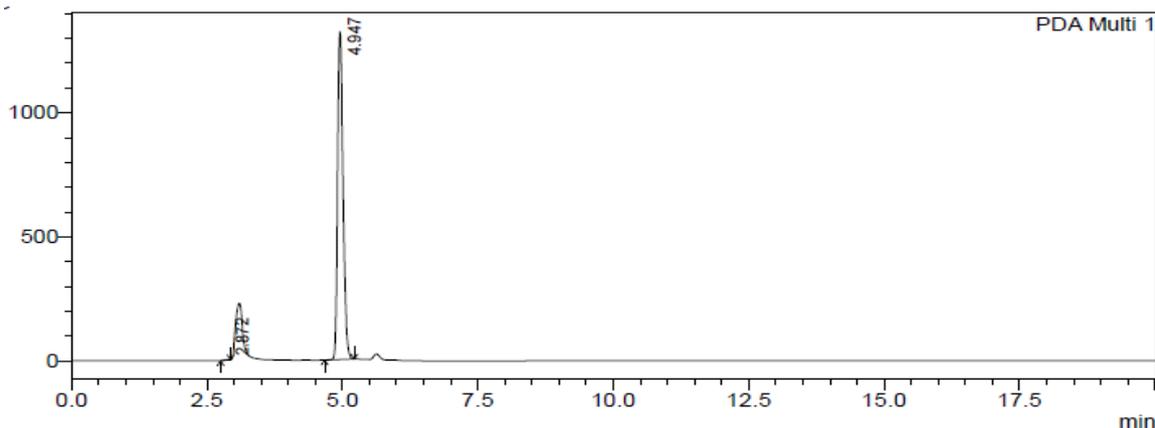


Figura 4 - Cromatograma da CNFD padrão.

As concentrações utilizadas para avaliação da linearidade da metodologia desenvolvida foram 10, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/mL}$. A linearidade corresponde à relação entre a resposta instrumental (área do pico cromatográfico) e a concentração do analito (CASSIANO et al., 2009). A correlação linear entre as concentrações e a área do pico de CNFD foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta determinada (Figura 5).

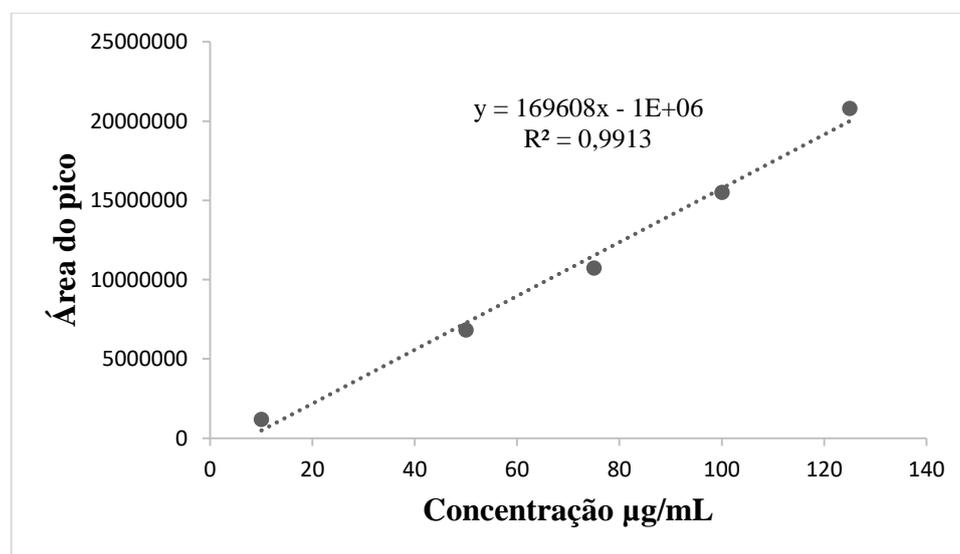


Figura 5 - Gráfico de linearidade (10-125 $\mu\text{g/mL}$) para a quantificação da CNFD por CLAE.

Na tabela 3 pode-se observar que os coeficientes de variação, em todos os níveis de concentração (como medida padronizada da dispersão em cada nível), foi menor que 5%,

estando de acordo com legislação vigente (ANVISA, 2012). Visto que a linearidade é a capacidade do método de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (SHABIR, 2003), dessa forma, a curva de calibração desenvolvida apresenta linearidade adequada para os estudos de identificação e quantificação da CNFD.

Tabela 3 - Concentrações da curva de regressão linear da CNFD.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas do pico	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
10	1184929	57740,19	4,87
50	6823950	287620,49	4,21
75	10738598	372700,93	3,47
100	15506109	682643,31	4,40
125	20796105	942305,05	4,53

Para avaliação da repetibilidade foram feitas nove injeções do analito no ponto médio de concentração da curva (75 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4. O valor do coeficiente de variação das nove determinações foi menor que o valor limite admitido pela norma, sendo inferior a 5% (BRASIL, 2003), indicando que o método pode ser considerado reprodutível.

Tabela 4 - Ensaio de repetibilidade.

Análise	Áreas do pico	Recuperação ($\mu\text{g/mL}$)
1	11583447	74,19
2	12227654	77,99
3	11830000	75,65
4	11820452	75,59
5	12000756	76,65
6	11730520	75,06
7	11813435	75,55
8	11871995	75,89
9	12013435	76,73
Média	11876854,89	75,92

Desvio padrão	135840,0741	0,80
Coefficiente de variação	1,14	1,05

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão mede o grau de repetibilidade do sistema, operando em condições normais em um curto intervalo de tempo (SHABIR, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003). O ensaio foi realizado com a concentração equivalente ao ponto central da curva de calibração e os resultados estão descritos na tabela 5. A legislação normaliza percentuais de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100%, porém, admite uma faixa de variabilidade de $100 \pm 20\%$ para matérias primas e princípios ativos (BRASIL, 2003).

Tabela 5 - Avaliação da exatidão.

CNFD + padrão interno			CNFD Padrão		
Área	Recuperação ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão ([QE/QT] $\times 100$) %	Área	Recuperação ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão ([QE/QT] $\times 100$) %
11628752	74,46	99,27	11583447	74,19	98,92
11925139	76,21	101,60	12227654	77,99	103,98
12006381	76,68	102,24	11830000	75,65	100,86
11810795	75,53	100,70	11820452	75,59	100,78
12002333	76,66	102,21	12000756	76,65	102,20
Média	75,91	101,21	-	76,01	101,35
Desvio padrão	0,65	0,97	-	1,04	1,39

Legenda: QE = quantificação experimental; QT = quantificação teórica.

A análise estatística dos resultados do ensaio de recuperação confirmou que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de recuperação da CNFD contaminada com padrão interno comparada com a recuperação da CNFD nas mesmas condições. Considerando que o valor de recuperação ficou abaixo que 105%, pode-se concluir que o método é exato na faixa de concentrações avaliadas.

3.2. Desenvolvimento das nanoformulações

3.2.1. Nanocápsulas

A partir de um estudo de pré-formulação, foram avaliados diferentes polímeros, concentrações dos excipientes e condições de aquecimento e agitação, os quais permitiram a obtenção de doze protótipos de nanocápsulas, as quais foram avaliadas macroscopicamente quanto a presença de instabilidades. Das formulações elaboradas somente três não apresentaram sinais de instabilidade após 48 horas do seu preparo, que foram a NANO03, NANO04 e NANO11 que apresentaram coloração alaranjada e se mantiveram homogênea. As nove formulações restantes apresentaram formação de precipitado esbranquiçado, cremação ou mudança de coloração (Tabela 6, Figura 6).

Tabela 6 – Nanoformulações avaliadas visualmente após o preparo.

Formulação	Reações de instabilidades observadas
NANO01	Precipitação
NANO02	Precipitação
NANO03	-
NANO04	-
NANO05	Precipitação
NANO06	Precipitação
NANO07	Precipitação
NANO08	Precipitação
NANO09	Mudança de coloração

NANO10	Cremação
NANO11	-
NANO12	Cremação

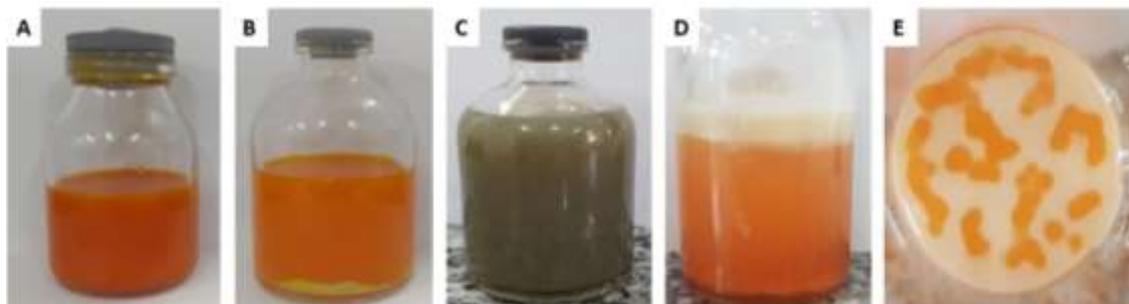


Figura 6 - Aspectos visuais das nanocápsulas. (A) Formulação recém preparada (estável); (B) Precipitação; (C) Mudança de coloração; (D) e (E) Cremação.

Os indicativos de falta de estabilidade e incompatibilidades foram observados após o tempo 48 horas, como a cremação, que é um processo em que ocorre o deslocamento das gotas de óleo para a superfície ou profundidade do sistema (CONTRI et al., 2013) e a mudança de coloração devido a oxidação dos compostos. Com a análise no Zetasizer constatou-se o comportamento bimodal da NANO05, que visualmente aparentava ser estável, mas apresentou índice de polidispersão muito elevado (0,418) e após três dias apresentou a formação de um precipitado abundante, o que é característico do fenômeno conhecido como *Ostwald Ripening*, que está associado as quantidades de polímero e surfactante insuficientes para produzir uma camada de revestimento mais completa (AMADO et al., 2017).

Associado as características visuais, as formulações foram analisadas quanto ao potencial zeta, que reflete a carga de superfície das nanocápsulas. Este parâmetro pode ser influenciado pela composição da partícula, meio dispersante, pH e força iônica presentes na solução, visto que a estabilidade das suspensões coloidais é favorecida pela repulsão eletrostática e pelos efeitos estéricos, que evitam a agregação provocada por colisões ocasionais (TAGLIARI et al., 2015).

As formulações que apresentaram precipitação ao decorrer do tempo de análise apresentaram heterogeneidade no tamanho de partícula com comportamento bimodal, bem como potencial zeta que variaram de -10,6 a -11,4 mV, demonstrando instabilidade. Para uma boa estabilidade coloidal em solução, o potencial zeta deve estar próximo a ± 30 mV (MOHANRAJ; CHEN, 2007).

As nanoformulações contendo o polímero PEG 4000 apresentaram coloração laranja com aspecto transparente, que após 48 horas e tamanho de partícula que variou de 42,44 a 58,00 nm, porém apresentaram um comportamento bimodal e potencial de zeta que variou de -10,6 a -17,4 mV e com altos valores de índice de polidispersão e condutividade, significando uma alta mobilidade de íons livres na solução, o que comumente provoca instabilidade devido a interação das cargas dos íons com a dupla camada elétrica das nanopartículas poliméricas (RODRIGUEZ et al., 2017). Assim, o uso do PEG 4000 não permitiu obter a formação de nanocápsulas estáveis.

A formulação NANO11, que foi preparada usando o Kollicoat MAE 100P, que é um polímero que apresenta uma alta permeabilidade a diferentes substâncias e boa solubilidade em solventes orgânicos (ROA, 2010). Essa formulação apresentou um tamanho de partículas de 173,3 nm, com uma faixa muito estreita de variabilidade, expressada num índice de polidispersão de 0,112, com um valor modular de potencial zeta acima de -34,9 mV e uma baixa condutividade de 0,0468 $\mu\Omega/\text{cm}$. Na literatura sugere que sistemas nanoparticulados com valor modular de potencial zeta acima de -30 mV, costumam ser muito mais estáveis (RODRIGUEZ et al., 2017), pois a repulsão entre as partículas carregadas é grande evitando a coalescência e a ocorrência do fenômeno de *Ostwald Ripening* que reduz a energia superficial causando separação e precipitação em sistemas de nanopartículas (FERREIRA et al., 2017). Conforme esses resultados, a

formulação NANO11 foi selecionada para continuar com os processos de caracterização, estabilidade.

3.2.2. Nanoesferas

A partir de um estudo de pré-formulação, foram avaliados diferentes polímeros, os quais permitiram a obtenção de quatro protótipos de nanoesferas, as quais foram avaliadas macroscopicamente quanto a presença de instabilidades. Nenhuma das formulações preparadas apresentaram sinais de instabilidade após 48 horas do seu preparo (Tabela 7). Todas as formulações apresentaram coloração alaranjada e aspecto homogêneo.

Tabela 7 – Nanoformulações avaliadas visualmente após o preparo.

Formulação	Polímero	Avaliação macroscópica
NAN09-B	Kollicoat MAE 100 P	Estável
NAN10-B	Policaprolactona	Estável
NAN11-B	PEG 400	Estável
NAN12-B	PEG 4000	Estável

As formulações foram avaliadas quanto ao tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade. Os dados estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8 – Caracterização das nanoesferas pelo potencial zeta, mobilidade, condutividade e tamanho de partícula.

Nanoesfera	Potencial Zeta (mV)	Condutividade ($\mu\Omega/cm$)	Índice de polidispersão	Tamanho de partícula (nm)
NAN09-B	$-16,32 \pm 18,55$	$0,05 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$212,97 \pm 5,85$
NAN10-B	$-13,05 \pm 5,65$	$0,02 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,06$	$291,35 \pm 17,28$

NAN11-B	$-13,95 \pm 4,48$	$0,05 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,24$	$372,57 \pm 85,56$
NAN12-B	$-15,02 \pm 3,49$	$0,02 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,13$	$168,27 \pm 34,76$

As nanoformulações contendo o polímero PEG 400, PEG4000 e policaprolactona apresentaram coloração laranja com tom de fundo esbranquiçado, embora macroscopicamente não tenham apresentado nenhum parâmetro de instabilidade, apresentaram valores altos de polidispersão, acima de 0,2 indicam que o sistema apresenta uma heterogeneidade de partículas (MELO et al., 2010), fato este observado do por meio de uma distribuição bimodal (figura 7). Assim, estas formulações foram consideradas instáveis.

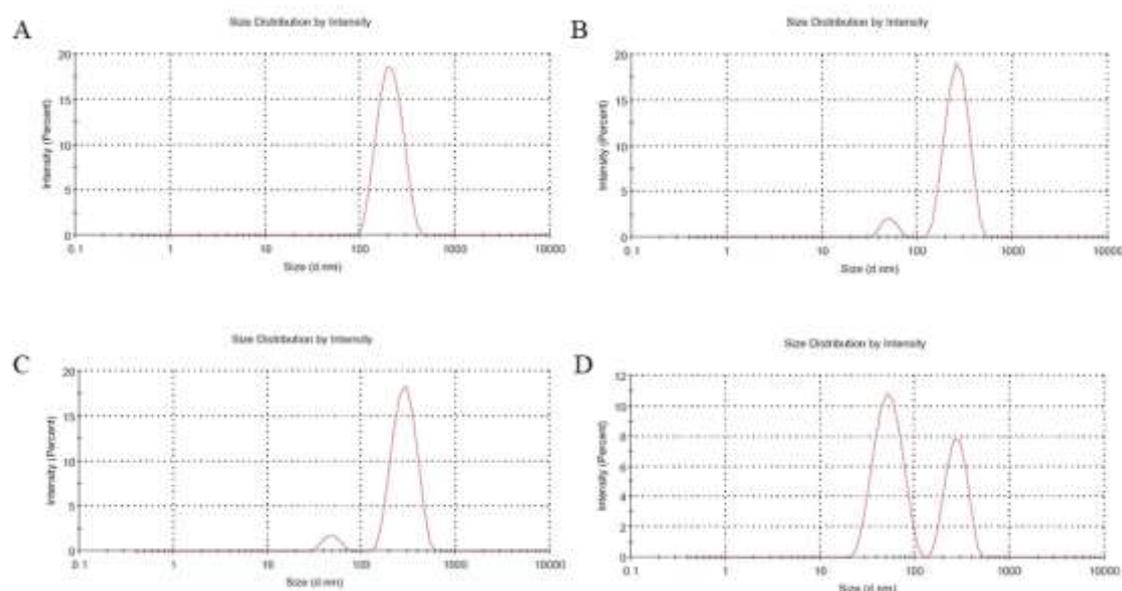


Figura 7 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula. (A) NAN09-B; (B) NAN10-B; (C) NAN11-B; (D) NAN12-B.

A formulação NANO09-B, que foi preparada usando o Kollicoat MAE 100P, apresentou uma coloração alaranjada com fundo esbranquiçado, com um tamanho de partícula de 212 nm com um índice de polidispersão abaixo de 0,3, o que caracteriza um sistema monodisperso, ou seja, homogêneo na distribuição das nanopartículas (DANAIEI

et al., 2018), que pode ser visualizado na figura 7A. Além disso, seu potencial zeta elevado é característico de sistemas representativos de partículas estabilizadas (VOGEL et al. 2017). Sendo assim, a formulação foi selecionada para continuar com os processos de caracterização, estabilidade.

3.3.Caracterização físico química das nanopartículas

3.3.1. Taxa de eficiência de encapsulação

O conteúdo de princípio ativo contido nas nanopartículas tem grande influência sobre a atividade farmacológica do fármaco, sobre as propriedades de liberação e sobre a própria estabilidade do fármaco, onde as substâncias lipofílicas podem chegar a ser encapsuladas em até 70% (STELLA et al., 2007).

A eficiência de encapsulação da formulação NANO11 e NANO09-B apresentaram uma taxa de encapsulação de $64,89 \pm 1,14\%$ e $89,81 \pm 0,74\%$, respectivamente, sendo considerado uma eficiência satisfatória do processo de formulação das nanopartículas (RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

3.3.2. Estabilidade das formulações

Os estudos de estabilidade das propriedades das formulações são conduzidos ao longo do tempo, seja durante o armazenamento em prateleira ou quando submetidas a condições específicas de estresse. Essas análises têm como objetivo avaliar os efeitos tanto de fatores internos, relacionados à composição da formulação, quanto de fatores externos sobre as propriedades dos excipientes e, principalmente, do princípio ativo. Além disso, esses estudos permitem determinar a melhor forma de acondicionamento e armazenamento da forma farmacêutica final (BAJDIK; PINTYE, 2006).

Neste trabalho foi realizado o estudo de estabilidade na formulação NANO11 e NANO09-B ao longo de 150 dias, em condições de prateleira no laboratório, envasadas em frasco âmbar, a temperatura entre $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e condições normais de umidade e iluminação.

As formulações NANO11 e NANO09-B foram monitoradas sob o aspecto físico-químico do potencial hidrogeniônico, onde os resultados dessa avaliação estão registrados na Tabela 9.

Tabela 9. Monitoramento do pH das formulações de nanopartículas.

Amostra	Dias							
	0	7	14	30	60	90	120	150
NANO11	5,50 ±	5,56 ±	5,50 ±	5,27 ±	4,98 ±	4,93 ±	4,84 ±	4,35 ±
	0,11	0,12	0,28	0,09	0,04	0,18	0,08	0,10
NANO09-B	5,66 ±	5,56 ±	5,49 ±	5,47 ±	5,41 ±	5,38 ±	5,36 ±	5,38 ±
	0,25	0,24	0,58	0,16	0,21	0,13	0,09	0,11

Os valores de pH observados no monitoramento da formulação NANO09-B, demonstraram, em sua maioria, discreta redução no período avaliado, porém sem mudança significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao pH da formulação recém-preparada, apresentando-se estável. Enquanto que a NANO11 apresentou um decaimento no pH a partir do segundo mês de avaliação apresentação diferença estatística quando comparado ao pH inicial, sendo um indício de instabilidade da nanocápsula.

Estudos pregressos reportando o efeito do pH sobre propriedades de sistemas nanoparticulados apontaram melhor desempenho do polímero Kollicoat MAE 100P frente a outros, onde tal performance pode ser atribuída ao seu perfil químico, além de conferir um pH levemente ácido a formulação (AMADO et al., 2017), porém mesmo que as duas formulações compartilhassem o mesmo tipo de polímero, a redução significativa no pH da suspensão pode estar relacionada com a degradação do polímero ou outro

insumo utilizado na formulação e, conseqüentemente, comprometimento do equilíbrio do meio. Além disso, as reações de hidrólise e de ionização dos grupos carboxílicos de elementos da formulação são processos que podem estar envolvidos na redução do pH observados ao longo do tempo (KISHORE et al., 2011; FLORENTINO-NETO, 2018).

Além da avaliação de pH, as nanoformulações foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade e os resultados estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10. Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade das formulações NANO11 e NANO09-B durante cinco meses de estudo.

Amostra	Dias	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Condutividade ($\mu\Omega/cm$)
NANO11	0	173,3 \pm 7,85	0,11 \pm 0,12	-34,9 \pm 5,28	0,04 \pm 0,09
	7	179,8 \pm 8,72	0,21 \pm 0,02	-35,9 \pm 0,97	0,05 \pm 0,02
	15	187,97 \pm 3,45	0,31 \pm 0,24	-30,2 \pm 6,12	0,07 \pm 0,02
	30	268,27 \pm 14,76	0,43 \pm 0,11	-29,4 \pm 1,98	0,15 \pm 0,02
	60	272,57 \pm 85,56	0,74 \pm 0,21	-30,6 \pm 1,37	0,14 \pm 0,02
	90	262,13 \pm 17,70	0,54 \pm 0,06	-29,1 \pm 2,74	0,10 \pm 0,02
	120	263,17 \pm 32,68	0,45 \pm 0,06	-25,2 \pm 2,18	0,17 \pm 0,02
	150	252,57 \pm 13,46	0,45 \pm 0,06	-26,9 \pm 1,67	0,12 \pm 0,01
NANO09-B	0	212,97 \pm 5,85	0,12 \pm 0,01	-16,32 \pm 8,55	0,02 \pm 0,02
	7	213,35 \pm 7,28	0,10 \pm 0,00	-17,93 \pm 1,40	0,01 \pm 0,00
	15	212,57 \pm 5,56	0,11 \pm 0,01	-16,70 \pm 0,61	0,03 \pm 0,00
	30	214,53 \pm 1,71	0,10 \pm 0,01	-16,95 \pm 1,48	0,02 \pm 0,00
	60	213,43 \pm 2,10	0,12 \pm 0,01	-17,89 \pm 1,90	0,02 \pm 0,00
	90	215,97 \pm 1,85	0,12 \pm 0,00	-16,54 \pm 0,34	0,03 \pm 0,00
	120	212,27 \pm 2,70	0,11 \pm 0,01	-16,83 \pm 1,14	0,02 \pm 0,00
	150	211,27 \pm 4,76	0,10 \pm 0,01	-16,34 \pm 0,86	0,02 \pm 0,01

A NANO11 a partir dos 30 dias apresentou uma distribuição bimodal (figura 8) com alto índice de polidispersão (tabela 10), bem como foi observado variação ao longo do tempo em relação ao potencial zeta e a condutividade, indicando uma instabilidade na formulação, o que corrobora com os achados em relação ao pH da formulação.

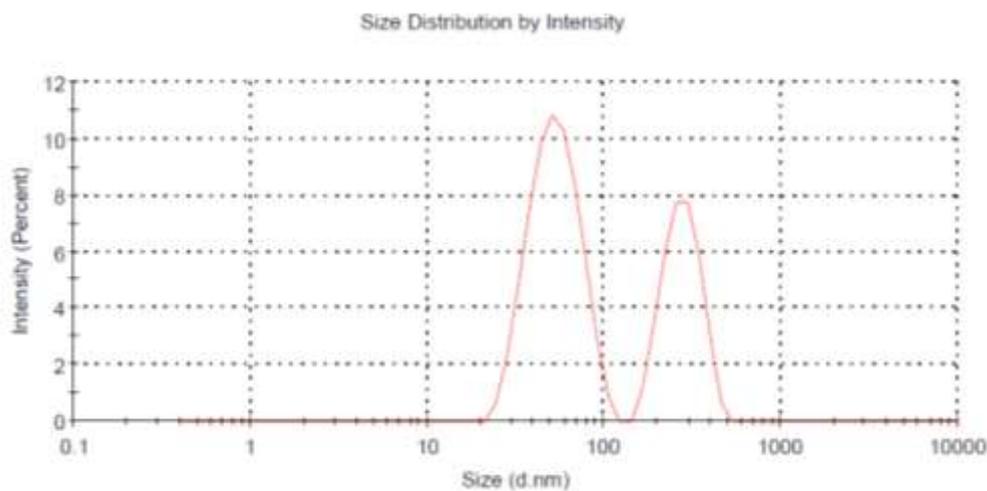


Figura 8- Comportamento da distribuição do tamanho de partícula da NANO11 após 30 dias de análise.

A NANO09-B se manteve uma distribuição monomodal (figura 9) ao longo dos 150 dias, apresentando um baixo índice de polidispersão que corrobora com este modelo (tabela 10). Segundo SCHAFFAZICK et al., (2003) nanopartículas tendem a apresentar diâmetros médios entre 100 e 300 nm, onde as nanopartículas desenvolvidas neste estudo apresentaram tamanho médio abaixo de 220 nm, com baixa variabilidade durante o tempo de armazenamento. Além de apresentarem potencial zeta característica a nanoesferas, visto que na literatura, trabalhos com nanopartículas que apresentaram potenciais zeta próximos a -16 Mv são característicos da formação de nanoesferas (CALVO et.al., 1996).

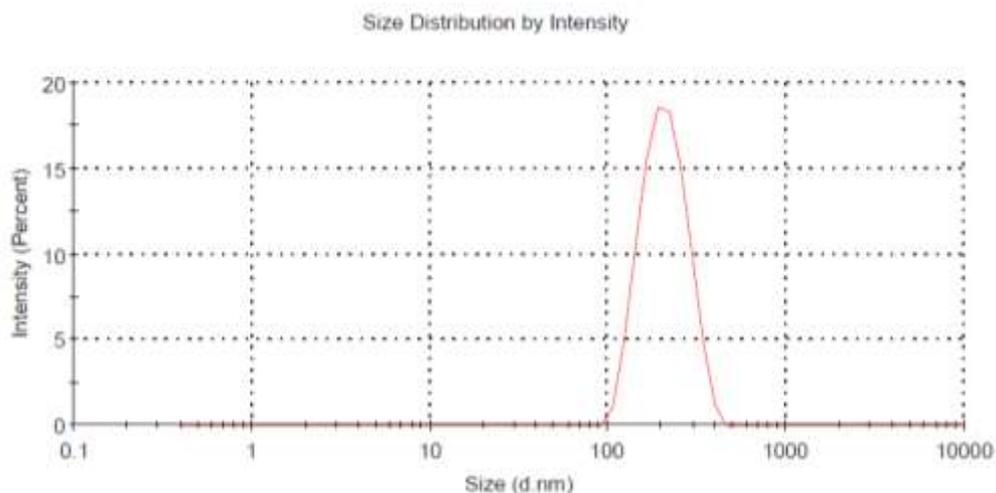


Figura 9- Comportamento da distribuição do tamanho de partícula da NANO09-B após 150 dias de análise

A condutividade ao longo dos 150 dias teve ligeiras variações, as quais são características dos sistemas nanoparticulados em equilíbrio, devido a interações leves entre a dupla camada elétrica e os íons presentes na solução (COETZEE et al., 2020). Como a interação desses íons com a camada elétrica protetora de nanopartículas é o que pode provocar instabilidade da solução valores próximos de zero são desejáveis (FLORENTINO-NETO, 2018), sendo uma característica observada na formulação NANO09-B.

Sendo assim, a nanoformulação NANO09-B pode-se ser considerada estável por 150 dias, sendo Kollicoat® MAE 100 P o polímero mais adequado para o estudo e preparo de nanoesferas contendo CNFD.

4. CONCLUSÃO

Sistemas nanoestruturados poliméricos contendo a CNFD foram desenvolvidos e caracterizados físico-quimicamente, onde os sistemas contendo o polímero Kollicoat® MAE 100 P apresentaram maior estabilidade. As nanocápsulas obtidas apresentaram-se instáveis após 30 dias de preparo, enquanto que as nanoferas obtidas mostraram-se monodispersas e estáveis em prateleira ao longo de 150 dias, além de apresentar uma taxa de encapsulação superior a 89%.

5. REFERÊNCIAS

- ABDUSSALAM-MOHAMMED, Wanisa. Review of therapeutic applications of nanotechnology in medicine field and its side effects. **Journal of Chemical Reviews**, v. 1, n. 3, p. 243-251, 2019.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
- ALBERTI, Thaís Barbosa et al. Desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada do agonista CB2 β -cariofileno: estratégia terapêutica a doenças degenerativas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p 90. 2019.
- ALMEIDA, P. D. O et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chem.-Biol Interact**, v. 30, n. 343, 2021.
- AMADO, Jesus Rafael Rodriguez et al. Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 25, n. 8, p. 1158-1168, 2017.
- BOLTNAROVA, Barbora et al. PLGA based nanospheres as a potent macrophage-specific drug delivery system. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 749, 2021.
- DE MELO, N. F. S. et al. Development and characterization of poli (L-lactide) nanocapsules containing benzocaine. **Quim Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.
- DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 2020.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J Pharm**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1 out. 1989.
- FLORENTINO-NETO, S. Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo α - β amirina. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus. p 90. 2018.
- FREIRE, C. P. V. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, v. 1, n. 3, p. 229, 2010.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120 p.

KOPECKOVA, K. et al. Nanodrugs used in cancer therapy. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 163, n. 2, 2019.

NETO, Serafim Florentino et al. α -amyryn-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111656, 2021.

PAIVA, Ana M. et al. Development of noncytotoxic PLGA nanoparticles to improve the effect of a new inhibitor of p53–MDM2 interaction. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 394-402, 2013.

PINTO, Náyra de Oliveira Frederico. Desenvolvimento de nanoformulações do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. p 121. 2014.

PRIMO, Fabian Teixeira. Farmacovigilância de Nanomedicamentos: Desafios na inexistência de marco regulatório em nanosseguurança. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. p 137. 2021.

SEYFODDIN, Ali; SHAW, John; AL-KASSAS, Raida. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. **Drug delivery**, v. 17, n. 7, p. 467-489, 2010.

SILVA, Mariana dos Santos et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, v. 33, p. 1868-1873, 2010.

SILVA, Débora Santos. Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante in vitro de nanoformulações contendo óleo do fruto orbignya phalerata martius. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanotecnologia) - Universidade de Brasília. Brasília. p 114. 2015.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **Int J Pharm**, v. 512, n. 1, p. 234–241, 15 out. 2016.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quim Nova**, v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.

TAGLIARI, M. P. et al. Development of oral nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterisation, photostability studies, in vitro and in vivo evaluation. **Quim Nova**, v. 38, n. 6, p. 781–786, 2015.

YURGEL, V.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. Developments in the use of nanocapsules in oncology. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 6, p. 486–501, jun. 2013.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA FARMACOCINÉTICA DA 7- DIHIDRO-5H-CICLOPENTA[B]NAFTO[2,1-D]FURANO-5,6(9AH)- DIONA

CAPÍTULO 4

1. INTRODUÇÃO

A segurança e eficácia de um fármaco depende de três fases: fase farmacêutica ou biofarmacêutica, onde ocorre a liberação da substância ativa da forma farmacêutica e a dissolução da mesma em fluidos biológicos; fase farmacocinética, que abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção; e a fase farmacodinâmica, que está relacionada com a interação do fármaco com seu alvo biológico (BRITO, 2011; LIPTON, 2016.).

Avaliar e prever a farmacocinética, bem como a toxicidade de um dado produto, são determinantes para seu sucesso em estudos clínicos, visto que é um processo complexo que envolve transportadores e enzimas metabolizadoras com consequências fisiológicas nos efeitos farmacológicos e toxicológicos dos fármacos (LI et al., 2019b; VARMA et al., 2012; ZHANG; TANG, 2018). Além de permitir, reduzir o tempo e os gastos com o desenvolvimento de novos medicamentos, fornecem informações importantes sobre a estrutura de uma molécula e possíveis modificações que podem ser feitas para otimizar sua atividade (ANDRADE et al., 2016; GALLO, 2010).

Diversas propriedades físico-químicas, como lipofilicidade, taxa de dissolução, solubilidade e peso molecular, podem interferir diretamente na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de uma substância. Moléculas com alta lipofilicidade, embora apresentem alta permeabilidade de membrana, também apresentam baixa solubilidade em diferentes condições fisiológicas, o que dificulta sua absorção (COLTESCU; BUTNARIU; SARAC, 2020; LOBO, 2020; WARING, 2010). A taxa de absorção de uma substância após administração oral depende principalmente de sua capacidade de

atravessar o epitélio intestinal (DAHLGREN; LENNERNÄS, 2019; SHEKHAWAT; POKHARKAR, 2017).

Devido questões de conveniência, segurança e de custo-benefício, grande parte dos fármacos são administrados por via oral. Após a sua introdução no organismo, o mesmo precisa atingir a corrente sanguínea para que possa ser encaminhado ao sítio de sua ação (CHILLISTONE; HARDMAN, 2017; TAMBOSI et al., 2018). Assim, a absorção oral dos fármacos, que inclui a sua dissolução no fluido gastrointestinal e sua permeação pela parede intestinal e na corrente sanguínea, pode sofrer influências de outras propriedades fisiológicas, como o pH e a presença das enzimas metabólicas no trato gastrointestinal (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019; LIN; WONG, 2017).

Além das propriedades físico-químicas, fatores fisiológicos associados à afinidade de ligação às proteínas plasmáticas e à estabilidade metabólica de uma substância também são importantes para determinar suas propriedades farmacocinéticas (ANDRADE et al., 2016; BOHNERT; GAN, 2013).

Uma vez absorvidos, os fármacos sofrem uma série de biotransformações, ao qual é chamada de metabolismo. Esse também é um processo que deve ser avaliado no desenvolvimento de um fármaco, visto que possibilita a identificação de sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, estabelecimento da identidade química dos principais metabólitos e sua toxicidade, além de identificar protótipos que apresentam maior atividade (KEBAMO; TESEMA, 2015; NUNES, 2015).

Além disso, o metabolismo de fármacos representa um problema de otimização único no desenvolvimento pré-clínico (WU et al., 2020), dado que é um processo fisiológico que compreende um conjunto de reações enzimáticas que converte fármacos apolares e lipofílicos em metabólitos polares e hidrofílicos, com a finalidade de facilitar sua eliminação do organismo (PEREIRA, 2007). Esses metabólitos podem apresentar

maior potencial farmacológico ou toxicológico que o fármaco de origem, ou até mesmo possuir menor toxicidade ou efeito terapêutico (ISSA et al., 2017).

O fígado desempenha um papel crítico no metabolismo de fármacos, na homeostase corporal, na digestão e eliminação de substâncias tóxicas (RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2020), sendo um dos principais locais de metabolização, juntamente com o intestino, devido aos altos níveis de enzimas metabólicas nesses tecidos (XIE; DING; ZHANG, 2016).

As reações metabólicas podem ocorrer em duas fases: a fase I, que envolve reações de oxidação, redução e hidrólise; e a fase II, caracterizada por reações de conjugação (ISSA et al., 2017). As reações de fase I são realizadas, principalmente, pelo citocromo P450 (CYP), que é uma superfamília de monooxigenases contendo o grupo heme, sendo capazes de catalisar a biotransformação oxidativa da maioria dos fármacos e outros xenobióticos lipofílicos (WÓJCIKOWSKI et al., 2020; ZANGER; SCHWAB, 2013).

A fase II é caracterizada pela presença das enzimas transferases, que são responsáveis pela conjugação de grupos polares diretamente na molécula do fármaco ou em produtos provenientes da fase I, a fim de facilitar a eliminação dos fármacos e inativar metabólitos tóxicos (LI et al., 2019). As principais enzimas envolvidas tanto com a fase I como com a fase II estão listadas no quadro 1.

Quadro 1 - Principais enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos.

Etapa	Reações	Principais enzimas
Fase I	Oxidação Redução Hidrólise	Citocromo P450 e monooxigenases contendo flavina; Redutases; Esterases, epóxido-hidrolases
Fase II	Glicuronidação Sulfatação	UDP-glicuronosiltransferases; Sulfotransferases;

	Acetilação Metilação Glucationização	N-acetiltransferases; Metiltransferases; Glutaciona-S-transferase
--	--	---

Fonte: adaptado de LI e colaboradores (2019).

As enzimas CYPs são encontradas na superfície do retículo endoplasmático liso de células do trato gastrointestinal, principalmente no fígado e na parede do intestino, porém, também podem ser encontradas nos pulmões, rins e sistema nervoso central (ISSA et al., 2017; SPROUSE; VAN BREEMEN, 2016). Estas enzimas apresentam diversas isoformas com base na estrutura, especificidade de substrato ou sensibilidade a agentes inibidores e indutores (REDLICH et al., 2008; ZANGER; SCHWAB, 2013).

As principais isoformas da CYP são a CYP1A2, 3A4, 2C9, 2C19 e 2D6, que são responsáveis pelas reações de fase I de cerca de 80% dos fármacos existentes (BANERJEE et al., 2020; MISHRA; AGARWAL; RAGHAVA, 2010). A CYP3A4 é a isoforma mais abundante no fígado e intestino, sendo considerada a enzima metabolizadora de fármacos mais importante no organismo, visto que é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 50% dos fármacos (WANG et al., 2019; WRIGHT; CHENGE; CHEN, 2019).

No metabolismo de fase II, as reações incluem glucuronidação, fosforilação, metilação, sulfonação, acetilação e reação com glutaciona. A maioria das reações de conjugação de fase II são catalisadas pelas famílias UDP-glucuronosiltransferase e sulfotransferase (SPROUSE; VAN BREEMEN, 2016).

O metabolismo também desempenha um importante papel na eliminação dos fármacos, pois impede que os mesmos permaneçam por tempo indefinido no nosso organismo, permitindo assim, que sejam excretados (LAKSHMANAN, 2019; ZHANG; TANG, 2018). Os principais órgãos responsáveis pela eliminação são os rins e fígado,

sendo que a maioria dos produtos do metabolismo são eliminados pela urina (KOK-YONG; LAWRENCE, 2015).

Sabendo que os parâmetros farmacocinéticos são importantes para avaliação de candidatos a fármacos, visando avaliar tanto a permeabilidade intestinal como também resolver a estabilidade metabólica, identificar rotas metabólicas, bem como avaliar a inibição e indução de enzimas envolvidas no metabolismo (ISSA et al., 2017; TYZACK; KIRCHMAIR, 2019; VOLPE, 2020).

Existem várias ferramentas *in silico* para prever o metabolismo de fármacos. Dentre as abordagens *in silico*, destaca-se a ancoragem molecular, que é um dos métodos mais utilizados devido sua capacidade de prever, por meio da conformação, tipo e energia da interação intermolecular envolvida, a afinidade de uma molécula por um receptor biológico com um grau substancial de precisão (MENG et al, 2011). Em estudos de metabolismo, é capaz de prever a conformação e orientação do substrato, revelando grupos chaves ou átomos para a ligação no complexo CYP (PINZI; RASTELLI, 2019).

Nesse sentido, estas ferramentas tornam-se uma poderosa abordagem para o estudo do metabolismo de novos candidatos a fármaco, como é o caso da CNFD, que apesar de ser uma molécula promissora, somente um estudo foi realizado quanto suas características farmacocinéticas, onde foi observado que esta molécula apresenta o metabolismo hepático como principal via de eliminação por meio de avaliação com microsomas hepáticos (COSTA et al., 2022).

Por todo o exposto, este estudo visou aplicar modelos de ancoragem molecular bem como diversas ferramentas *in silico* para avaliação do metabolismo de fase 1, contribuindo assim com o estudo de suas propriedades farmacocinéticas, tendo em vista sua aplicação farmacêutica.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da substância teste

A estrutura química 2D e 3D da CNFD foi obtida a partir da confirmação estrutural descrita no capítulo 2, onde se utilizou o programa ChemBioDraw Ultra® 11.0 para sua obtenção.

2.2. Análise dos parâmetros farmacocinéticos in silico

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando os softwares: SwissADME®, preADMET® e admetSAR® (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) para predição da especificidade de CYP e parâmetros farmacocinéticos; SMARTCyp® e Way2Drug® (RUDIJK et al., 2015; RIDDER; WAGENER, 2008) para predição de locais de metabolismo e possíveis metabólitos.

2.3. Triagem virtual por ancoragem molecular

2.3.1. Seleção e preparo dos alvos biológicos

Foram selecionadas as enzimas do Citocromo P450 disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB), em boa resolução (abaixo de 2,5 Å) e, preferencialmente, cocrystalizadas com moléculas inibidoras. As moléculas de água e artefatos de cristalização não necessários à atividade catalítica foram retiradas da estrutura utilizando o programa PyMOL®, e o ligante cocrystalizado foi separado da estrutura da proteína e utilizado para localização do sítio ativo.

2.3.2. Preparo do ligante

A CNFD teve sua estrutura desenhada no formato bidimensional e tridimensional no programa Chemdraw®, onde teve sua estrutura otimizada e a energia conformacional minimizada pelo método *Merck Molecular Force Field* (campo de força MMFF94).

2.3.3. Ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando o *software* Autodock Vina® (TROTT; OLSON, 2010). O receptor foi mantido rígido, enquanto os ligantes foram flexíveis para girar e explorar as poses mais prováveis. Todas as ligações torcionais dos ligantes foram liberadas pelo módulo ligante no *software* AutoDock Tools®. O Grid, grade que delimita o sítio ativo, foi posicionado na região ativa do receptor, englobando todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas de modo a proporcionar uma região de busca conformacional adequada para a realização da ancoragem molecular. Os parâmetros foram salvos e o intervalo de busca entre os pontos do grid fixados em 1 Å, aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano para a análise das interações.

A validação da metodologia foi realizada por redocking, onde o desvio de deslocamento entre o ligante cocristalizado e o mesmo ligante após a ancoragem molecular foi avaliado.

Os resultados foram visualizados no AutoDock Tools® e as interações foram avaliadas em termos de energia de afinidade de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e o ligante. As imagens 2D e 3D dos resultados moleculares de acoplamento foram obtidas usando o *software* Discovery Studio Visualizer 4.0®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Predição dos parâmetros farmacocinéticos *in silico*

A análise dos parâmetros farmacocinéticos da CNFD que foram realizados utilizando plataformas *in silico* estão dispostos no Quadro 2 e 3.

Quadro 1 - Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos da CNFD.

Software	Parâmetros farmacocinéticos				
	BBB (Ccérebro/ Csangue)	Permeabilidade Caco-2 (nm/sec)	Absorção intestinal humana	Inibidor da glicoproteína-P	Ligação a proteínas plasmáticas
SwissADME®	Positivo	50,0538	Alta	Negativo	-
preADMET®	Positivo	24,9604	98,11%	Negativo	93,95
AdmetSAR®	Positivo	-	97,71%	Negativo	-

Quadro 2 - Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de metabolismo da CNFD.

Software	Parâmetros farmacocinéticos - Metabolismo				
	Inibidor de CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor de CYP3A4
SwissADME®	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
preADMET®	-	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
AdmetSAR®	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

A partir dos resultados obtidos, em todos os programas analisados, observou-se que a CNFD apresenta absorção pela barreira hematoencefálica (BHE), o que dependendo dessa intensidade pode gerar alguns efeitos colaterais como menor biodisponibilidade do fármaco e toxicidade a nível de sistema nervoso central. No que se refere à classificação da passagem de moléculas pela BHE, tem-se os seguintes valores: $>2,0$, entre $0,1$ e $2,0$ e $<0,1$, sendo estes respectivamente denominados como: atravessa livremente, atravessa de forma moderada e atravessa de forma reduzida ou não atravessa (DOLABELA et al., 2018). Somente na plataforma preADMET®, pode-se observar um valor de 1,74

compatível com esta classificação, indicando que a CNFD pode apresentar passagem moderada pela BHE.

Ao investigar os parâmetros de absorção foi analisada a permeabilidade cutânea e em células epiteliais Caco-2. As células Caco-2 são originadas de adenocarcinoma do intestino grosso humano e ao longo dos anos estas células estão sendo extensivamente utilizadas em ensaios para avaliação de absorção e permeabilidade de substâncias, podendo mensurar a capacidade de absorção *in vivo* (OHTA et al., 2020). Estudos farmacocinéticos preconizam a seguinte classificação quanto à permeabilidade em células Caco2: > 70 nm/sec: alta permeabilidade, 4-70 nm/sec: média permeabilidade, > 4nm/sec: baixa permeabilidade (DOLABELA et al., 2018), assim conforme observado no quadro 1, a CNFD apresentou uma predição de média permeabilidade nas células Caco-2, tanto no programa preADMET® como no SwissADME®.

Para identificar possíveis candidatos a fármacos é importante prever sua absorção intestinal. Os valores obtidos e relação a absorção intestinal são a soma da biodisponibilidade e absorção avaliadas a partir da razão de excreção ou excreção cumulativa na urina, bile e fezes (ZHAO et al, 2001). Na análise de predição da absorção intestinal, utilizou o pH 7,4, para mimetizar as condições *in vivo*. A partir dos resultados obtidos, observou-se que a CNFD apresenta alta absorção segundo a escala de Yee (1997).

Ainda conforme os parâmetros analisados no quadro 1, observou-se que a CNFD apresenta uma ligação forte em relação às proteínas plasmáticas, apresentando valor superior a 90%, o que infere que esta molécula por ser mais lipofílica, necessita se ligar as proteínas plasmáticas para que possa ser transportada. Além disso, quando a ligação à proteína ocorre fortemente, ela pode diminuir a intensidade máxima de ação de uma dose única de um fármaco, por diminuir a concentração máxima atingida no receptor,

alterando, assim sua resposta clínica. Visto que o grau de ligação às proteínas plasmáticas de um fármaco influencia na sua distribuição, ação e eficácia, pois somente o fármaco livre é o que está disponível para se difundir para os locais extravasculares ou teciduais onde ocorrerá o efeito farmacológico (TESSEROMATIS; ALEVIZOU, 2008).

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos quanto ao metabolismo de fase 1, que estão dispostos no quadro 2, observou-se que a CNFD apresenta uma predição quanto a inibição da CYP1A2, 2C9 e 2C19.

Na análise de metabolismo, pode-se observar algumas divergências nas respostas obtidas, o que pode estar relacionada ao fato de que tais programas utilizam algoritmos de busca diferentes, além de serem plataformas de banco de dados que comparam a estrutura analisada versus estruturas de fármacos que possuam sua farmacocinética totalmente conhecida.

O SwissADME® é um dos programas utilizados em triagem virtual, o qual apresenta modelos químicos de forma simplista, com propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e apresenta possíveis semelhanças com outros fármacos, além de uma interpretação fácil e eficiente (DAINA; MICHIELIN, 2017). Já o programa AdmetSAR® é um website com mais de 210.000 dados experimentais de compostos químicos e 27 modelos computacionais, o programa tem como objetivo de proporcionar informações químicas e biológicas de uma determinada estrutura ou fármaco em questão e prever as propriedades farmacocinéticas da molécula investigada (HONGBIN, 2019).

Os dados oferecidos pelo AdmetSAR® são reunidos em propriedades, aos quais são classificadas como “pontuação ADMET”, que prevê a pontuação de cada categoria e as classifica como “positivo/ benéficos” são para propriedades que dispuseram de pontuações iguais a 1, e as categorias que foram catalogadas como “negativas/ maléficas”, são as que obtiveram pontuações iguais a zero (GUAN, 2018).

O preADMET® é um programa que tem a funcionalidade de determinar as atividades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de um determinado fármaco, como a absorção do intestino, ligação da proteína plasmática e coeficiente de partição do mesmo, avaliar o metabolismo e toxicidade (CHAGAS, 2020).

3.2. Predição dos locais de metabolismo da CNFD in silico

A predição dos possíveis sítios de metabolismo (SOMs, *site of metabolism*) é uma das principais etapas durante o processo de investigação molecular. Ela possibilita a detecção de possíveis “*hot spots*” (pontos quentes) onde o metabolismo tem grandes chances de ocorrer, os quais também variam para cada enzima do complexo CYP450. Da mesma forma, estes “*hot spots*” da molécula podem ser modificados para obter uma molécula mais estável metabolicamente (RUDIK et al., 2015).

O Way2Drug® é um programa que prevê o local em que ocorre o metabolismo na estrutura em que se está sendo estudada, essa previsão é baseada na relação estrutura-local do metabolismo, visto que são analisados os possíveis das isoformas 1A2, 2C9, 2D6 e 3A4 do citocromo P450 (FILIMONOV, 2014). A partir da análise da CNFD (figura 1), foi observado os possíveis locais de metabolização que estão descritos no quadro 4.

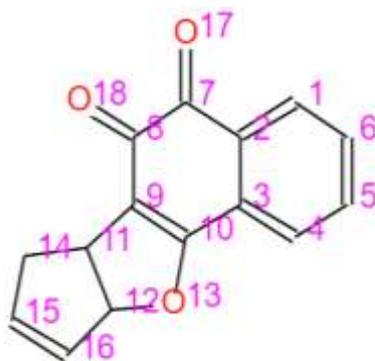


Figura 1 - Estrutura química da 2D da CNFD destacando a sua contagem carbônica.

Quadro 4 – SOMs da CNFD obtidos no programa Way2Drug®.

Isoformas do citocromo P450	Número do átomo que ocorre o metabolismo	Probabilidade (%)
CYP3A4	Átomo 14	70,9
	Átomo 6	36,6
CYP2D6	Átomo 1	32,8
	Átomo 2	20,5
CYP2C19	Átomo 5	22,9
	Átomo 14	17,7
CYP2C9	Átomo 5	19,1
	Átomo 6	4,3
CYP1A2	Átomo 14	56,9
	Átomo 6	1,72

Os resultados obtidos a partir do uso da plataforma Way2Drug® revelaram que os átomos a molécula CNFD com maior probabilidade de sofrerem o metabolismo são os átomos localizados na posição 14.

Existem muitos métodos para a realização de previsão do local do metabolismo que são baseados em cálculos semi-empíricos dos substratos (HENNEMANN et al., 2009), os resultados mais precisos devem ser alcançados incluindo explicitamente a reatividade de cada local em um substrato. Os modelos de reatividade para CYPs foram restritos a cálculos semi-empíricos da estabilidade de intermediários (JONES et al., 2002).

Estudos posteriores mostraram que energia de ativação mais precisa para CYPs podem ser calculadas realizando cálculos de estado de transição de teoria funcional de densidade. O SMARTCyp® é um programa baseado na teoria funcional da densidade que determina as energias de ativação das moléculas em que estão sendo analisadas e identifica na estrutura o local de metabolismo mais provável (OLSEN, 2019). Assim, neste método, as energias de ativação das CYPs que reagem com fragmentos de um

ligante são usadas como referência da reatividade de um dado fragmento (RYDBERG et al., 2010; PIECHOTA et al., 2013).

Os resultados obtidos na análise com o SMARTCyp® estão dispostos no quadro 5 e figura 2.

Quadro 5 – SOMs da CNFD obtidos no programa SMARTCyp®.

Isoformas do citocromo P450	Átomo	Pontuação	Energia
CYP3A4	Átomo 13	39,8	46,2
	Átomo 12	55,7	62,2
CYP2D6	Átomo 13	59,2	46,2
	Átomo 15	64,2	65,2
CYP2C9	Átomo 15	81,9	65,6
	Átomo 13	87,1	46,2

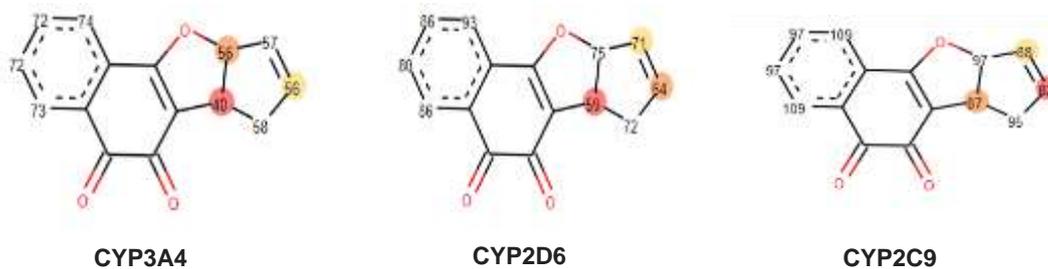


Figura 2 - Principais sítios de metabolismo da CNFD obtidos a partir do SMARTCyp®. Em vermelho o átomo com maior probabilidade, em laranja o segundo e em amarelo o terceiro.

Os resultados obtidos a partir do uso da plataforma SMARTCyp® e Way2Drug® indicam que o átomo da molécula CNFD com maior probabilidade de sofrer o metabolismo para CYP3A4 e 2D6 é o C13, já os locais de média e baixíssima chance de metabolização foram divergentes conforme o tipo de enzima do complexo enzimático do citocromo P450.

Dentre os metabólitos previstos, o metabólito M1 obtido pela reação de hidrogenação foi o que apresentou maior probabilidade de ocorrência (Quadro 6). Os resultados estão disponíveis na Figura 3, corroborando com os achados relacionados os carbonos mais passíveis de sofrerem metabolização via citocromo P450.

Quadro 6 - Metabólitos prováveis de CNFD, reações químicas e valor provável da ocorrência da reação.

Metabólito	Reação química	Probabilidade (%)
M1	Hidrogenação	93,93
M2		88,42
M3	Epoxidação	84,82
M4		71,09
M5	C-Oxidação	67,39

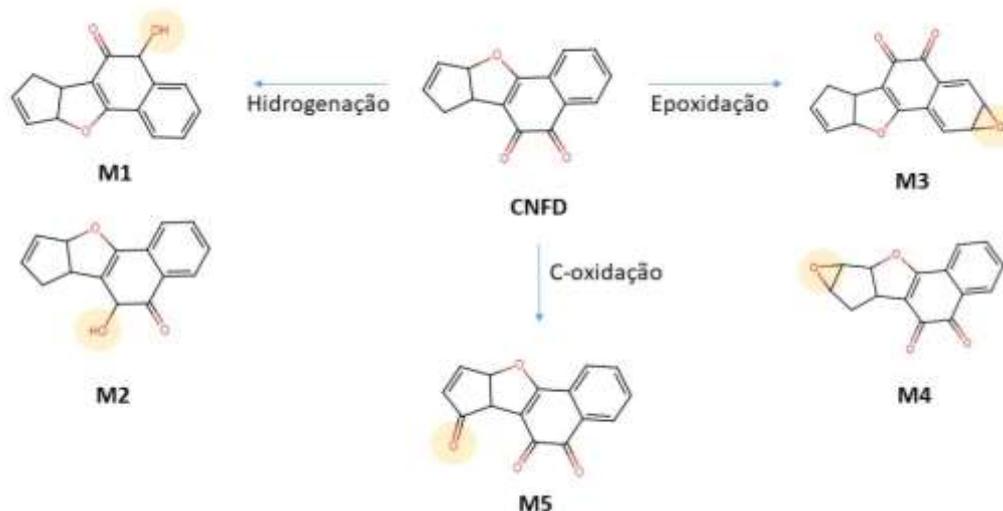


Figura 3 - Previsão de metabólitos CNFD e suas respectivas reações químicas

Os programas SMARTCyp® e Way2Drug® são duas metodologias, gratuitas e de livre acesso, para a predição de sítios de metabolismo. As divergências observadas podem ser justificadas devido o SMARTCyp®, em contraste com Way2Drug®, não depende de dados já existentes na literatura e, por isso, tem uma menor tendenciosidade nos

resultados. Outra vantagem é que esse *software* prevê o local de metabolismo diretamente da estrutura 2D de uma molécula, sem exigir cálculo de propriedades eletrônicas ou geração de estruturas 3D (RYDBERG et al., 2010).

3.3.Ancoragem molecular

Para a realização da ancoragem molecular, o grid box foi construído para cada uma das enzimas de acordo com as dimensões dispostas no Quadro 7, e posteriormente validada por meio da análise do redocking utilizando o grid box elaborado.

Quadro 7 - Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do redocking.

Enzima	Ligante	PDB	Dimensão do <i>grid box</i>	Energia do Ligante (Kcal/ mol)	RMSD (Å)
CYP1A2	BHF	2HI4	8 x 8 x 8	-14,3	0,38
CYP2C9	XI1	5A5I	8 x 14 x 6	-8,0	1,29
CYP2C19	OX1	4GQS	8 x 10 x 6	-8,8	0,32
CYP3A4	PK9	4D75	6 x 8 x 8	-6,8	0,49
CYP2D6	QI9	4WNV	8 x 10 x 8	-7,9	1,10

O acoplamento molecular é um instrumento importante na biologia molecular e no *design* de novos fármacos analisados pelo computador, o alvo do acoplamento da proteína e do ligante é prever o modo de ligação predominante de um ligante com uma proteína de estrutura tridimensional conhecida. Os métodos de acoplamento pesquisam espaços de alta dimensão e usam uma função de pontuação que classifica corretamente os acoplamentos dos candidatos (MORRIS, 2008).

A partir da análise do redocking, pode-se observar que em todos os métodos desenvolvidos, o valor do desvio entre a posição da molécula cocrystalizada e a após o processo de ancoragem foi inferior a 2 Å, o que confere um alto grau de superposição e orientação relativa da conformação na estrutura cristalográfica, o que valida as condições utilizadas para as análises de ancoragem molecular (GRANCHI et al., 2015).

Foi realizado o *docking* com as 5 enzimas e os valores de energia de afinidade de ligação com a CNFD estão dispostos no quadro 8.

Quadro 8 - Energia de interação (Kcal/mol) da CNFD com as enzimas avaliadas.

Molécula	Enzimas				
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4	CYP2D6
CNFD	-11,1	-8,4	-8,8	-7,4	-9,1

A formação e estabilidade de um complexo ligante-receptor são determinadas pelas interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio, contatos iônicos) e interações hidrofóbicas contabilizadas por variações de entalpia, bem como fenômenos de solvatação/dessolvatação e mudanças de liberdade conformacional (BRAVO, 2009). Essas contribuições levam a uma variação da energia livre que caracteriza a afinidade de ligação entre o ligante e o alvo, sendo que quanto menor for a energia de ligação, maior será a afinidade com o receptor (PANTSAR; POSO, 2018). As interações intermoleculares ligante-receptor entre a CNFD e as CYPs estão dispostas na figura 4.

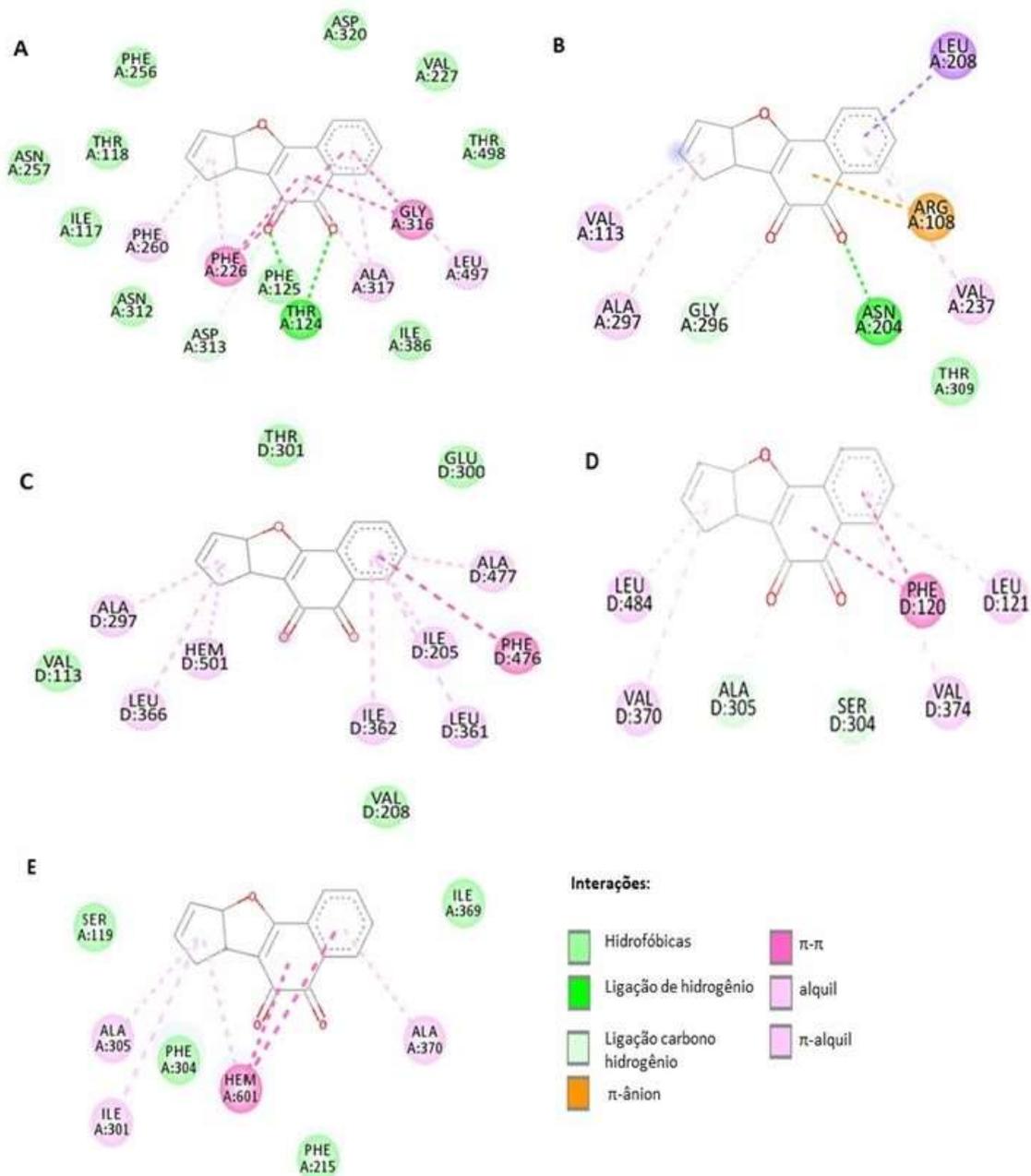


Figura 4 - Análise das interações da CNFD com CYPs avaliadas: CYP1A2 (A), CYP2C9 (B), CYP2C19 (C), CYP2D6 (D) e CYP3A4 (E).

De acordo com Sansen (2007), a CYP1A2 possui duas principais interações de hidrogênio, ambas interações aconteceram com aminoácido THR118 e 124, porém, a interação mais provável de acontecer no aminoácido THR124, no qual, podemos constatar esta informação com a ligação de hidrogênio realizada entre a CNFD e a

CYP1A2 neste aminoácido, caracterizando uma especificidade e afinidade com o sítio ativo (figura 3A). O mesmo nível de complementariedade foi observado com a CYP2C9, onde a CNFD apresentou interação de hidrogênio com o aminoácido ASN204, importante resíduo na interação de inibição desta enzima (REYNALD et al., 2012).

Nas CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 não se observou a presença de ligações específicas como nas outras CYPs analisadas, apresentando somente interações de van der Waals que permitiram o processo de reconhecimento molecular do fármaco pelo sítio receptor, uma vez que, normalmente, se caracterizam por interações múltiplas que, somadas, acarretam contribuições energéticas significativas.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a CNFD apresenta uma alta absorção intestinal, bem como apresenta passagem via membrana hematoencefálica e que se liga fortemente as proteínas plasmáticas conforme os modelos *in silico* de utilizados. Além de apresentar uma predição quanto a inibição da CYP1A2, 2C9 e 2C19, bem como apresentou uma complementariedade e especificidade de interação para a CYP1A2 e 2C9 por meio da análise de ancoragem molecular, bem como apresenta maior probabilidade de sofrer o metabolismo pela CYP1A2, 3A4 e 2D6 segundo os métodos *in silico*.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. D. O et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chem.-Biol Interact**, v. 30, n. 343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109444>

BANERJEE, P. et al. SuperCYPsPred-a web server for the prediction of cytochrome activity. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W580–W585, 2020.

BRAVO, J. Development and validation of target-based drug design tools: virtual screening of monoamine oxidase inhibitors. Tese de Doutorado. University of Geneva, 2009.

BROCCATELLI, F. et al. A novel approach to prevent P-glycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields. **J Med Chem** v. 6, n. 54, p. 1740-1754, 2011.

COSTA, E. M. A. et al. CYP450 Metabolism of a Semisynthetic Naphthoquinone, an Anticancer Drug Candidate, by Human Liver Microsomes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 33, 2022.

CHENG, F. et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and non-inhibitors using combined classifiers. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 5, n. 51, p. 996-1011, 2011.

CHEN, J. et al. Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 12, p. 4302–4312, 2018.

DAS CHAGAS, F. P. DE A. Computational analysis of the inhibitory activity of eugenol on the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. **Sci Rep**, v. 10, n. 16204, 2020.

DAINA, A; MICHELIN, O; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemical likeability of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, n. 42717, 2017.

FILIMONOV DA, POROIKOV VV In: Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening; Varnek, A. e Tropsha, A. Ed.; RSC Publishing: Cambridge (Reino Unido), 2008, 182-216.

GUAN, L. et al. ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm**, v. 1, n. 10, p. 148-157, 2018.

HENNEMANN, M. et al. CypScore: Quantitative prediction of reactivity for cytochromes P450 based on semi-empirical molecular orbital theory. **Chem Med Chem**, v. 4, p. 657-669, 2009.

HONGBIN, Y. et al. AdmetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, 2019.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 162, p. 1239-1249, 2011.

JONES, J. P. et al. Computational models for cytochrome P450: a predictive electronic model for aromatic oxidation and hydrogen atom abstraction. **Drug Metab Dispos**, v. 1, n. 30, 2002.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and clinical implications. **Clin Pharmacokinet**, v. 5, n. 35, 1998.

- LUIGI, Q. et al. In Vivo Antitumor Activity and Host Toxicity of Methoxymorpholinyl Doxorubicin: Role of Cytochrome P450 3A. **Cancer Res**, v. 12, n. 60, 2000.
- LI, Y. et al. Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 9, p. 1113-1144, 2019.
- MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Métodos Mol Biol**, v. 443, p. 365-382, 2008.
- MA, X. et al. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, 2005.
- OLSEN, L. et al. SMARTCyp 3.0: Enhanced Cytochrome P450 Metabolism Site Prediction Server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 35, p. 3174-3175, 2019.
- RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **V. B. Rev. Virtual Quim.**, v. 6, n. 4, p. 739-776, 2012.
- REDLICH, G. et al. Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 11, p. 4678–4688, 2008.
- PANTSAR, T.; POSO, A. Binding affinity via docking: fact and fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, 2018.
- SEGALL, M. D.; BARBER, C. Addressing the risk of toxicity when designing and selecting compounds in early drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 5, n. 19, p. 688-693, 2014.
- TAN, B. H. et al. In vitro and insilico approaches to study cytochrome P450 mediated interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p 319-328, 2017.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 30 jan. 2010
- WANG, L. et al. Effects of CYP3A4 Polymorphisms on Drug Addiction Risk Among the Chinese Han Population. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 315, 2019.
- ZHAO, Y. H. et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. **J. Pharm. Sci.**, v. 6, n. 90, p.749-784, 2001.

CAPÍTULO 5

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN SILICO* E *IN VITRO* DA 7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-
diona**

CAPÍTULO 5

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos é um processo complexo, que se inicia com a identificação de uma molécula com alta afinidade por um alvo terapêutico, seguida por análises para avaliar suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e toxicológicas, tanto *in silico*, *in vitro* como *in vivo*, sendo esta etapa determinante para a continuidade do processo (ANDRADE et al., 2016; HUGHES et al., 2011).

Uma vez os candidatos a fármacos sejam avaliados nos estudos não-clínicos, os mesmos seguem para os estudos clínicos, que correspondem à pesquisa conduzida em seres humanos, para avaliação da eficácia e segurança terapêutica (CHEN et al., 2018).

Neste contexto, caracterizar o potencial farmacológico de novas substâncias utilizando diferentes abordagens auxilia no processo de otimização e triagem de substâncias que possam vir a atuar como possíveis candidatos a fármacos (MOHS; GREIG, 2017; NUNES, 2015).

Nas últimas décadas, numerosos avanços foram alcançados no uso de abordagens *in vitro* e *in silico* para investigar o potencial de substâncias candidatas a fármacos (TAN et al., 2017), onde se destaca a ancoragem molecular e a aplicação de modelos de cultura tridimensionais de células como modelos que otimizam esse processo (STAMPAR et, al.2019).

1.1. Ancoragem molecular

A ancoragem molecular, *docking* molecular ou acoplamento molecular é uma técnica de modelagem molecular que objetiva analisar as condições estruturais e

energéticas para uma interação favorável levando a formação de um complexo estável entre um determinado alvo biológico e uma molécula, permitindo assim uma estimativa da atividade do ligante (FERREIRA, 2013; RABELLO, 2016).

O reconhecimento molecular de um ligante no sítio receptor de um alvo ocorre por complementaridade química entre as estruturas sendo um processo que envolve fatores entálpicos e entrópicos considerando a flexibilidade do ligante e da proteína, além do efeito do ambiente proteico na distribuição de cargas do ligante. Assim, a formação deste complexo proteína-ligante, fornece informações importantes a respeito dos tipos de interações que ocorrem no sítio, tais como interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e outras interações (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006; ERICKSON et al., 2004).

O sucesso na predição da estrutura tridimensional do complexo receptor-ligante por ancoragem molecular possui duas grandes aplicações práticas. A primeira é a identificação de possíveis sítios preferenciais de ligação e a posterior indicação de modificações específicas no ligante, de tal modo a se obter um maior grau de afinidade e/ou especificidade com relação ao receptor. A segunda é a utilização da geometria obtida como ponto de partida para a aplicação de métodos computacionais mais sofisticados, visando quantificar a energia livre de ligação do complexo receptor-ligante. Os programas de ancoragem molecular executam estas tarefas através de um processo cíclico, no qual a conformação do ligante é avaliada por funções de pontuação específicas. Este processo é realizado recursivamente até convergir para uma solução de energia mínima (FERREIRA et al., 2015; TERAMOTO; FUKUNISHI, 2007).

Para que isso ocorra, os programas de ancoragem molecular são formados essencialmente por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e de uma função de pontuação. O algoritmo de busca é empregado na pesquisa de possíveis

modos de ligação entre o ligante e a proteína, permitindo explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante no sítio receptor da proteína (KITCHEN et al., 2004).

Os algoritmos de ancoragem molecular executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo classificações de substâncias acopladas com base na afinidade de ligação de complexos ligante-alvo. Assim, vários algoritmos foram desenvolvidos e são amplamente utilizados em *softwares* de ancoragem molecular (quadro 1) (HUANG; ZOU, 2010; LÓPEZ-VALLEJO et al., 2011).

Quadro 1. Exemplos de algoritmos de busca e programas de ancoragem molecular (Fonte: MENG et al., 2011).

Algoritmo	Característica	Programas
Algoritmo de correspondência	Baseado em geometria, adequado para <i>screening</i> virtual e aumento de bancos de dados devido a alta velocidade de análise	DOCK, FLOG, LibDock e SANDOCK
Construção incremental	Fragmento baseado e encaixe incremental	DOCK 4.0, FlexX, Hammerhead, SLIDE e eHITS
MCSS	Métodos baseados em fragmentos para novo design	HOOK
LUDI	Métodos baseados em fragmentos para novo design	LUDI
Monte Carlo	Pesquisa estocástica	ICM, QXP e MCDOCK
Algoritmo genético	Pesquisa estocástica	AutoDock, GOLD, DIVALI e DARWIN

A função de pontuação é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação. As funções de pontuação podem ser divididas em funções de pontuação baseadas em campo de força, empíricas e baseadas no conhecimento, que permitem classificar os melhores modos de

ligação (orientação e conformacional) do ligante no sítio receptor (MENG et al., 2011; VERDONK et al., 2003), permitindo uma maior probabilidade de certeza dos resultados obtidos.

Assim, a utilização de ferramentas computacionais acopladas aos estudos de planejamento e triagem de moléculas tem se mostrado uma ferramenta barata e simples, que permite avaliar prováveis moléculas bioativas e aumentar a probabilidade da obtenção de moléculas promissoras.

1.2. Modelos de cultura tridimensional de células

Os modelos de cultura tridimensional (3D) de células surgiram como um dos métodos alternativos *in vitro* mais estudados e têm obtido destaque em estudos não-clínicos de agentes terapêuticos para o câncer. Isso se deve à capacidade de mimetizar as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, permitindo a recriação da organização e função do tecido (ADISSU; ASEM; LELIÈVRE, 2007; FITZGERALD et al., 2015).

Modelos tridimensionais são formados cultivando-se células em ambientes que reproduzam a matriz-extracelular encontradas no tecido nativo, buscando-se reproduzir o ambiente *in vivo* encontrado pelas células, tanto em situações normais, como patológicas, sendo possível obter respostas bioquímicas e fisiológicas mais confiáveis. Além disso, quando cultivadas em modelos tridimensionais, as células respondem a estímulos internos e externos, como mudanças na temperatura, absorção de nutrientes, pH e temperatura, de forma parecida àquelas encontradas *in vivo* (WANG et al., 2014).

Nesse sentido, tem se buscado desenvolver diferentes abordagens *in vitro* que possibilitam mimetizar o ambiente 3D encontrado *in vivo* dentre elas, os esferoides são

uma das mais estudadas (AMELIAN et al., 2017; DIEKJÜRGEN; GRAINGER, 2017; FITZGERALD et al., 2015).

Os esferoides são agregados celulares que não possuem um substrato artificial que auxilie nas interações das células, ou seja, eles produzem e organizam sua própria matriz. Esse modelo de cultura 3D é formado em cultura de sobreposição e geralmente mantido em cultura suspensa, estática ou agitada. Os esferoides são muito utilizados para estudos relacionados ao crescimento tumoral, tendo em vista que algumas células tumorais derivadas de tumores apresentam a capacidade de formar esferoides (EILENBERGER et al. 2019; MIZOI et al, 2020).

Nesse sentido, estas ferramentas tornam-se uma poderosa abordagem para o estudo do potencial farmacológico de novos candidatos a fármaco, como é o caso da CNFD (6b,7-dihidro-5H-ciclopenta[b]nafto[2,1-d]furano-5,6(9aH)-diona), que é uma piranaftoquinona semissintética derivada da lausona, naftoquinona de origem natural (FREIRE et al., 2010), que apresentou ação citotóxica em diferentes linhagens tumorais, além de uma potente atividade antitumoral em estudos *in vivo* utilizando o modelo murino de melanoma (ALMEIDA et al., 2021). Apesar da CNFD ser uma molécula promissora, ainda há poucos estudos relacionados ao seu potencial farmacológico, tanto de forma isolada como incorporada em uma formulação.

A partir do exposto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar *in silico* o potencial da CNFD frente diferentes alvos farmacológicos, bem como avaliar *in vitro* suas atividades frente ao metabolismo tumoral e citotoxicidade.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da substância teste

A estrutura química 2D e 3D da CNFD foi obtida a partir da confirmação estrutural descrita no capítulo 2, onde se utilizou o programa ChemBioDraw Ultra® 11.0 para sua obtenção.

A nanoesfera contendo a CNFD (NAN09-B) foi obtida e caracterizada de acordo com a descrição do capítulo 3.

2.2 Triagem virtual por ancoragem molecular

2.2.1 Seleção e preparo dos alvos biológicos

Os alvos biológicos selecionados para o estudo de ancoragem molecular in silico estão dispostos no quadro 2 juntamente com sua codificação referente a sua estrutura cristalográfica disponível no *Protein Data Bank* (PDB) e resolução. A seleção dos alvos biológicos ocorreu a partir de resultados prévios da ação da CNFD.

As moléculas de água e artefatos de cristalização não necessários à atividade catalítica foram retiradas da estrutura utilizando o programa PyMOL®, e o ligante cocrystalizado foi separado da estrutura da proteína e utilizado para localização do sítio ativo.

Quadro 2 - Alvos biológicos selecionados no PDB.

Alvos	Código PDB	Resolução (Å)
AKT1	3OCB	2,70
ASK1	6E2M	2,25
ERK1	4QTB	1,40
ERK2	5NGU	2,74
MAPK14	6SFO	1,75
Topoisomerase I	1K4T	2,10
Topoisomerase II alfa	5GWK	3,51
Topoisomerase II beta	3QX3	2,16
ErbB4 quinase	3BBT	2,80
mTOR quinase	4JT5	3,45
PI3K/mTOR	5OQ4	2,70
Bcl-2	6GL8	1,40
SHP2 fosfatase	6CMS	2,68
B-Raf quinase V600E	4XV2	2,50
KRAS	6OIM	1,65
Bcl-2 G101V	6O0O	2,00
c-Kit quinase	6GQJ	2,33
Bcl-XL	3ZK6	2,48
MCL1	6O4U	1,70

2.2.2. Preparo do ligante

A CNFD teve sua estrutura desenhada no formato bidimensional e tridimensional no programa Chemdraw®, onde teve sua estrutura otimizada e a energia conformacional minimizada pelo método *Merck Molecular Force Field* (campo de força MMFF94).

2.2.3. Ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando o software Autodock Vina® (TROTT; OLSON, 2010). O receptor foi mantido rígido, enquanto que os ligantes foram flexíveis para girar e explorar as poses mais prováveis. Todas as ligações torcionais

dos ligantes foram liberadas pelo módulo ligante no software AutoDock Tools®. O Grid, grade que delimita o sítio ativo, foi posicionado na região ativa do receptor, englobando todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas de modo a proporcionar uma região de busca conformacional adequada para a realização da ancoragem molecular. Os parâmetros foram salvos e o intervalo de busca entre os pontos do grid fixados em 1 Å, aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano para a análise das interações.

A validação da metodologia foi realizada por redocking, onde o desvio de deslocamento entre o ligante cocristalizado e o mesmo ligante após a ancoragem molecular foi avaliado.

Os resultados foram visualizados no AutoDock Tools® e as interações foram avaliadas em termos de energia de afinidade de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e o ligante. As imagens 2D e 3D dos resultados moleculares de acoplamento serão obtidas usando o software Discovery Studio Visualizer 4.0®.

2.3. Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas cultivadas em garrafas de cultura com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, e mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C.

O cultivo celular e as análises *in vitro* foram realizados no laboratório BIOPHAR (UFAM), onde se seguiu as orientações estabelecidas naquele laboratório para o cultivo das linhagens celulares, que indica a observação diária do crescimento celular em

microscópio invertido, além de realização de repiques sempre que necessário para meio de cultura novo em uma concentração de $0,5 - 1,0 \times 10^4/\text{mL}$.

2.4. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O ensaio do Alamar Blue® foi realizado utilizando células de linhagens neoplásicas de melanoma humano (SK-MEL 19), carcinoma coloretal (HCT 116), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), hepatocarcinoma (HepG2) e fibroblastos, e não-neoplásicas (MRC5, fibroblastos humanos) disponíveis no Banco de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido e como controle positivo a Doxorrubicina. Tanto a CNFD isolada como incorporada a nanoformulação foram avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas em concentrações seriadas a partir de $20 \mu\text{M}$ para obtenção da CI_{50} (ANSAR AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

2.5. Modelo 3D de esferoides de HepG2

2.5.1. Fabricação de hidrogéis e Formação dos esferoides tridimensionais

A preparação dos microchips de agarase foi realizada utilizando agarose tipo I, diluída em PBS em uma concentração de 2,0%, sendo em seguida autoclavada. Foi calculado o volume necessário para preencher os moldes de modo a se obter todos os chips desejados para cada etapa dos experimentos. A agarose foi adicionada a cerca de 90% do volume final de tampão PBS em um erlenmeyer e a solução foi aquecida em microondas até que a agarose se dissolvesse completamente. Após isso, a solução foi avolumada com tampão PBS e esterilizada em autoclave.

Para produzir os microchips, 550 μ L da solução de agarose foi transferida para o molde de polidimetilsiloxano (PDMS) (MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids - Sigma-Aldrich) com um padrão de microesferas. Cada chip contém 256 micropoços com diâmetro de 400 μ L e profundidade de 800 μ L. Uma vez que a agarose foi despejada no molde, deixou-se gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação da agarose, o microchip sólido foi separado do micromolde, transferido para um único poço de uma placa transparente de 12 poços e armazenado em 1000 μ L de PBS estéril a 37°C e mantidas em estufa a 5% de CO₂ até seu uso.

2.5.2. Produção dos esferoides de HepG2

O protocolo utilizado para a produção de esferoides de HepG2 foi adaptado a partir do método proposto por Durand-Herrera e colaboradores (2018) e Calabretta colaboradores (2022).

Para a geração dos esferoides 3D de células de hepatocarcinoma (HepG2), o frasco de cultivo com as células em monocamadas foi colocado no microscópio para observar a morfologia das células e descartar a presença de bactérias ou fungos que levam a eventuais contaminações, o meio das garrafas foi removido e adicionado tripsina para que as células perdessem a aderência e fosse realizada a sua contagem em câmara de Neubauer. Foram calculados os volumes que fossem suficientes para o número de placas/poços desejados em cada etapa da dos experimentos. O PBS foi removido da placa contendo o micromolde sólido e as células cultivadas nas garrafas de cultura, que foram tripsinizados e semeados no microchip (50x10⁴, 100x10⁴ e 150x10⁴ células/microchip).

Para o plaqueamento, a quantidade de células suficiente após a contagem foi suspensa em 190 μ L de meio de cultura e transferida para o micromolde sólido em placa de 24 poços. As células foram aderidas ao molde para que sofressem agregação

espontânea para formar massas microtumoriais chamadas esferoides nos poços dos microchips e, após 30 minutos, foi adicionado 500 µL de meio DMEM.

Os esferoides foram mantidos a 37°C com 5% de CO₂ durante 18 dias e o meio foi trocado a cada dois dias.

2.5.3 Monitoramento dos esferoides por fotomicroscopia

O crescimento dos microtecidos esféricos foram monitorados para avaliação por meio do estudo da imagem da formação dos esferoides fotografados nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo usando o microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED). As imagens foram processadas usando o software de imagens ImageJ para registrar os dados em fotomicroscopia (SCHINDELIN et al., 2012) e analisadas para definição da concentração de células ideal para a formação de esferoides de HepG2.

2.6. Ensaio de viabilidade celular, absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em meio com diferentes concentrações de glicose

A fim de avaliar a viabilidade celular, a absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em diferentes concentrações de glicose, as células HepG2 e MRC5 foram cultivadas em monocamada em uma placa de 12 poços (6×10^4 células/poço) em meio DMEM HG, após 24 h o meio foi substituído por meio HG, LG e FG. Após 24 horas, 50 µL do sobrenadante das células cultivadas em diferentes meios de cultura (HG, LG, FG) foi removido e a concentração de glicose (mg/dL) foi determinada por meio de ensaio enzimático-colorimétrico (Labtest®, Brasil), seguindo o manual do fabricante, utilizando leitor de microplacas Beckman Coulter DTX 880 a uma absorbância de 450 nm (YAMAMOTO et al., 2015; YONAMINE et al., 2016).

Para a avaliação da viabilidade celular, as células cultivadas em monocamada foram tripsinadas com Tripsina-EDTA (0,5%) e centrifugadas. O *pellet* foi ressuspenso e adicionado 0,4% de azul de tripano (STROBER, 2001). As células em monocamadas foram contadas em uma câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi estimada. Com o objetivo de avaliar a atividade da lactato desidrogenase (LDH), as células cultivadas em diferentes meios de cultura (HG, LG e FG) foram ressuspenso em 100 µL de Triton X-100 (1×) por 30 min a 37°C para romper a membrana e liberar a enzima. Em seguida, a atividade da LDH foi medida por um teste bioquímico comercial (Labtest®, Brasil) seguindo o manual do fabricante. Para estimar a atividade enzimática (U/L), a absorbância foi medida usando Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880 (340 nm) (LANDI-LIBRANDI et al., 2012).

2.7. Análise estatística

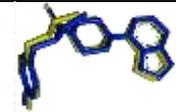
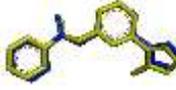
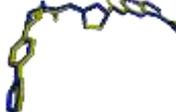
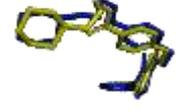
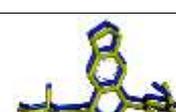
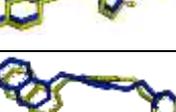
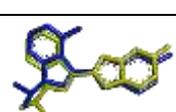
Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e/ou CI50 e seus intervalos de confiança de 95% (CI 95%) obtidos por regressão não linear, todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas através da análise de variância (ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 6®.

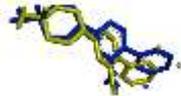
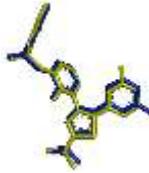
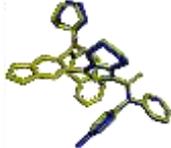
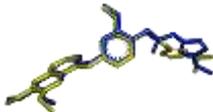
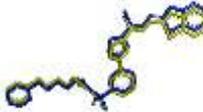
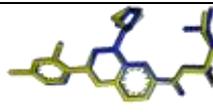
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem Virtual

Para a realização da ancoragem molecular, o *grid box* foi construído para cada uma das enzimas de acordo com as dimensões dispostas no quadro 3, e posteriormente validada por meio da análise do *redocking* utilizando o *grid box* elaborado.

Quadro 3 - Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do *redocking*.

Enzimas	Código PDB	Dimensão do <i>grid box</i>	RMSD (Å)	<i>Redocking</i>
AKT1	3OCB	32 x 22 x 24	0,7	
ASK1	6E2M	12 x 18 x 30	0,5	
ERK1	4QTB	44 x 28 x 40	0,8	
ERK2	5NGU	28 x 34 x 20	0,7	
MAPK14	6SFO	30 x 18 x 44	0,8	
Topoisomerase I	1K4T	39 x 36 x 29	0,9	
Topoisomerase II alfa	5GWK	20 x 17 x 18	0,5	
Topoisomerase II beta	3QX3	30 x 34 x 34	0,5	
ErbB4 quinase	3BBT	16 x 8 x 8	1,0	
mTOR kinase	4JT5	12 x 6 x 8	0,8	
PI3K/mTOR	5OQ4	12 x 10 x 8	0,8	
Bcl-2	6GL8	14 x 12 x 14	0,3	

SHP2 fosfatase	6CMS	20 x 14 x 12	1,5	
B-Raf quinase V600E	4XV2	12 x 10 x 14	1,2	
KRAS	6OIM	16 x 14 x 10	0,4	
Bcl-2 G101V	6O0O	14 x 14 x 16	0,1	
c-Kit quinase	6GQJ	18 x 11 x 12	1,1	
Bcl-XL	3ZK6	7 x 23 x 12	0,5	
MCL1	6O4U	12 x 11 x 12	0,4	

A partir da análise do *redocking*, pode-se observar que em todos os métodos desenvolvidos, o valor de RMSD, desvio entre a posição da molécula cocrystalizada e a posição do ligante, considerando a pose mais estável do *cluster* mais populoso e com menor energia de ligação foi inferior a 2 Å, o que confere um alto grau de superposição e orientação relativa da conformação na estrutura cristalográfica, validando as condições utilizadas para as análises de ancoragem molecular (GAO et al., 2017; WESTERMAIER; BARRIL; SCAPOZZA, 2015).

Como forma de avaliar os resultados da ancoragem molecular, vários aspectos das conformações obtidas foram usados para selecionar as melhores moléculas, tais como presença de interações chaves dos ligantes com os resíduos de aminoácidos críticos do

sítio ativo, similaridade de conformações com ligantes conhecidos, presença de doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio no complexo ligante/receptor e menores energias de ligação (COSCONATI et al., 2010), visto que as interações entre uma molécula ativa e um receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares que desempenham um papel crucial na prevenção ou obstrução do sítio ativo (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010; SALEH et al., 2016). Além disso, a dissociação do complexo ligante/receptor é rápida para interações mais fracas, enquanto que interações fortes entre os resíduos implicam em uma ligação mais estável entre o ligante e o receptor, levando a uma reação inibitória (YOUSUF et al., 2017).

Na análise da ancoragem molecular, os valores de energia de afinidade de ligação obtidos, tanto dos ligantes cocristalizados quanto da CNFD, estão dispostos na tabela 1 e as interações ligante-receptor na figura 1.

Tabela 1 - Energia de interação (Kcal/mol) da CNFD em comparação aos ligantes cocristalizados nas em diferentes enzimas.

Enzima	Energia de afinidade (Kcal/mol)	
	Ligante cocristalizado	CNFD
Topoisomerase I	-12,5	-9,5
Topoisomerase II alfa	-13,0	-9,0
Topoisomerase II beta	-13,5	-9,1
ErbB4 quinase	-10,0	-8,1
mTOR kinase	-8,9	-8,6
PI3K/mTOR	-9,1	-8,6
Bcl-2	-11,9	-7,8
SHP2 fosfatase	-10,8	-9,7
B-Raf quinase V600E	-12,4	-9,0
KRAS	-10,6	-7,8
AKT1	-8,9	-7,9
ASK1	-8,6	-8,7
ERK1	-12,3	-14,1
ERK2	-8,7	-9,1
MAPK14	-12,1	-8,6

Bcl-2 G101V	-10,3	-7,5
c-Kit quinase	-11,5	-8,5
Bcl-XL	-13,5	-10,0
MCL1	-13,6	-9,9

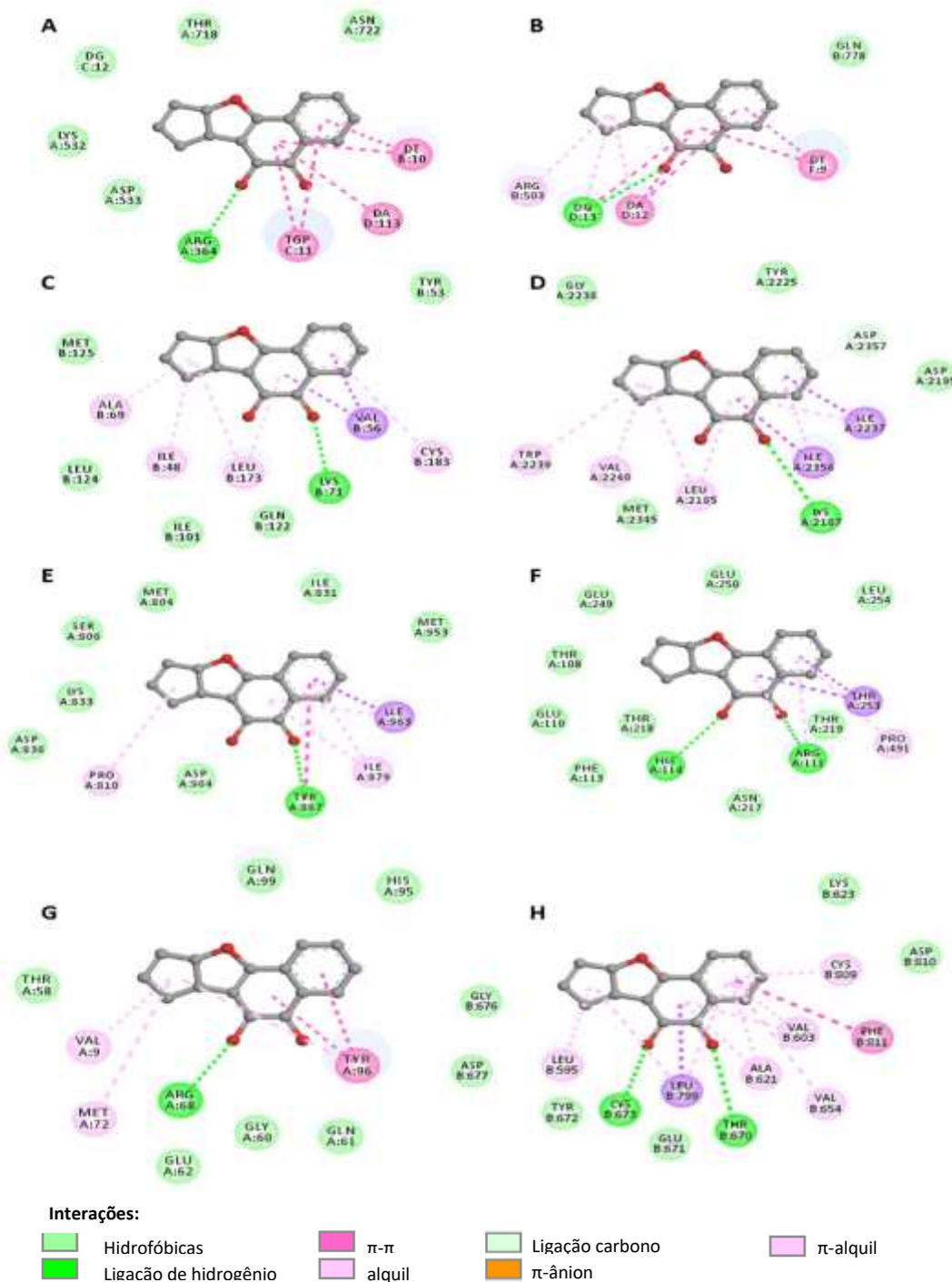


Figura 1 - Análise de ancoragem molecular da CNFD com diferentes alvos biológicos. (A) Topoisomerase I; (B) Topoisomerase II beta; (C) ERK1; (D) mTOR quinase; (E) PI3K/mTOR (F) SHP2 fosfatase; (G) KRAS; (H) c-Kit quinase.

Dentre todos os alvos testados, a CNFD apresentou um perfil de complementariedade, baixa energia de ligação e formação de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo, dos seguintes alvos: topoisomerase I, topoisomerase II beta, ERK1, mTOR quinase, PI3K/Mtor, SHP2, KRAS e c-KIT quinase. Na análise da ancoragem molecular com a topoisomerase I, observou-se que a CNFD apresentou interações com os resíduos catalíticos, arginina-364, asparagina-722 e aspartato-533, que são cruciais na mediação entre a interação da topoisomerase-DNA, bem como (XIN et al., 2017), bem como interações π - π com os pares de bases adjacentes do DNA. Também apresentou ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas presente no sítio catalítico (Figura 1A e 1B).

A CNFD apresentou perfil de interação similar ao observado por Dalezis e colaboradores (2020), que avaliaram ésteres alquilantes esteroidais de lactama com atividade inibitório frente a ERK1 e ERK2, apresentando ligações de hidrogênio com os resíduos de lisina-71. Tal dado é interessante para a investigação do mecanismo de ação desta substância (Figura 1C), visto que inibidores de ERK são considerados agentes promissores para a terapia do câncer, pois a ERK exerce um papel crucial em diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (HALDER; GIRI; CORDEIRO, 2019).

A partir da análise de ancoragem molecular, observou-se que a CNFD tem um potencial para atuar na via MAPK, que é uma via envolvida na transdução de sinais extracelulares para o núcleo da célula. Sabe-se que a BRAF mutada provocada uma hiperativação da ERK, além levar o crescimento tumoral, a inibição da apoptose e a uma metástase aumentada (BRANDT et al., 2019). Embora a CNFD não tenha apresentado um potencial inibitório frente a BRAF, ela apresenta um perfil de complementariedade,

ou seja, uma predição de uma atividade inibitória frente aos alvos KRAS e SHP2, que são ativados pela BRAF (KANO et al., 2019).

Além disso, observou-se que a CNFD também apresentou complementariedade para o mTOR quinase e o PI3K/mTOR, apresentando ligação de hidrogênio com os resíduos de lisina-2187 e tirosina-867 (Figura 1). A via PI3K/AKT/mTOR também atua regulando a KRAS, e está implicada no controle metabólico, angiogênese e homeostase cardiovascular, assim os inibidores de mTOR são promissores alvos, pois sua inibição pode parar a progressão maligna de cânceres (PASSIGLIA et al., 2020).

3.2. Análise de citotoxicidade por Alamar Blue em modelo monocamada

O efeito da CNFD e da NANO09-B sob a viabilidade celular foi realizado nas linhagens de células MCF-7, HCT 116, SK-Mel 19, HepG2 e MRC-5 no tempo de 72 horas, utilizando o ensaio do Alamar blue, estão representados na tabela 2.

Tabela 2.- Efeito da CNFD e da NANO09-B na viabilidade celular de linhagens tumorais e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 72h. Os valores estão representados como CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

Amostra	CI_{50} (μ M)				
	MCF-7	HCT116	SK-Mel 19	HepG2	MRC-5
CNFD	1,17 (0,81 - 1,69)	1,68 (1,07- 2,65)	2,91 (2,68 - 3,17)	2,88 (2,57- 3,11)	3,12 (2,57- 3,80)
NANO09-B	2,91 (2,68 - 3,17)	2,41 (2,27- 2,55)	3,32 (1,83- 6,02)	3,71 (3,48- 3,95)	4,33 (3,72- 5,03)
Doxorrubicina	0,84 (0,50 - 1,43)	0,52 (0,27 - 0,97)	0,22 (0,05 - 0,88)	0,90 (0,29 - 1,80)	0,14 (0,10 - 0,17)

Ao analisar a atividade citotóxica da CNFD e a NANO09-B sobre as células não neoplásicas de fibroblasto humano (MRC5), observou-se que a CNFD e a NANO09-B apresentaram um efeito citotóxico menor quando comparado a doxorrubicina, porém ao

comparar a CNFD isolada e incorporada a uma formulação (NANO09-B), pode-se observar uma diferença significativa ($p < 0,005$), sendo a CNFD isolada mais citotóxica que a nanoformulação. Tal fato pode ser justificado quando analisado em relação a concentração, visto que a CNFD se encontrava diluída na formulação, na concentração de 0,75 mg/mL, porém mesmo diluída apresentou ação citotóxica frente as células avaliadas.

A atividade citotóxica apresentada corrobora com outros estudos com naftoquinonas frente linhagens tumorais, como no estudo de Kishore e colaboradores (2014), onde um derivado da 5-hidroxi-7-metil-1,4-naftoquinona apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano (HeLa), tanto isolado como associado em uma formulação, apresentando CI_{50} de 5,3 μ M e 6,8 μ M, respectivamente.

3.3. Modelo tridimensional de esferoides de HepG2

A cultura de esferoides celulares tem sido amplamente adotada como uma abordagem *in vitro* para investigar o comportamento celular em um ambiente fisiologicamente relevante (SURYAPRAKASH et al., 2020; LEE et al., 2017). Estes modelos têm demonstrado ser valiosos para a compreensão aprofundada da biologia celular e para a pesquisa de novas terapias anticâncer (DONGLAI et al., 2017). Vários estudos têm explorado os benefícios e as aplicações dos esferoides celulares, fornecendo informações significativas para o campo da farmacologia.

Para produção dos esferoides foram avaliadas três concentrações diferentes de células com o intuito de verificar qual permitiria a formação de um esferoide compacto e apropriado para a realização de ensaios de viabilidade celular e de metabolismo. Dentre as concentrações testadas, que foram de 50, 100 e 150 $\times 10^4$ de células de HepG2, somente

na concentração de 100×10^4 observou-se a formação de um esferoide mais esférico e bem definido (figura 2).

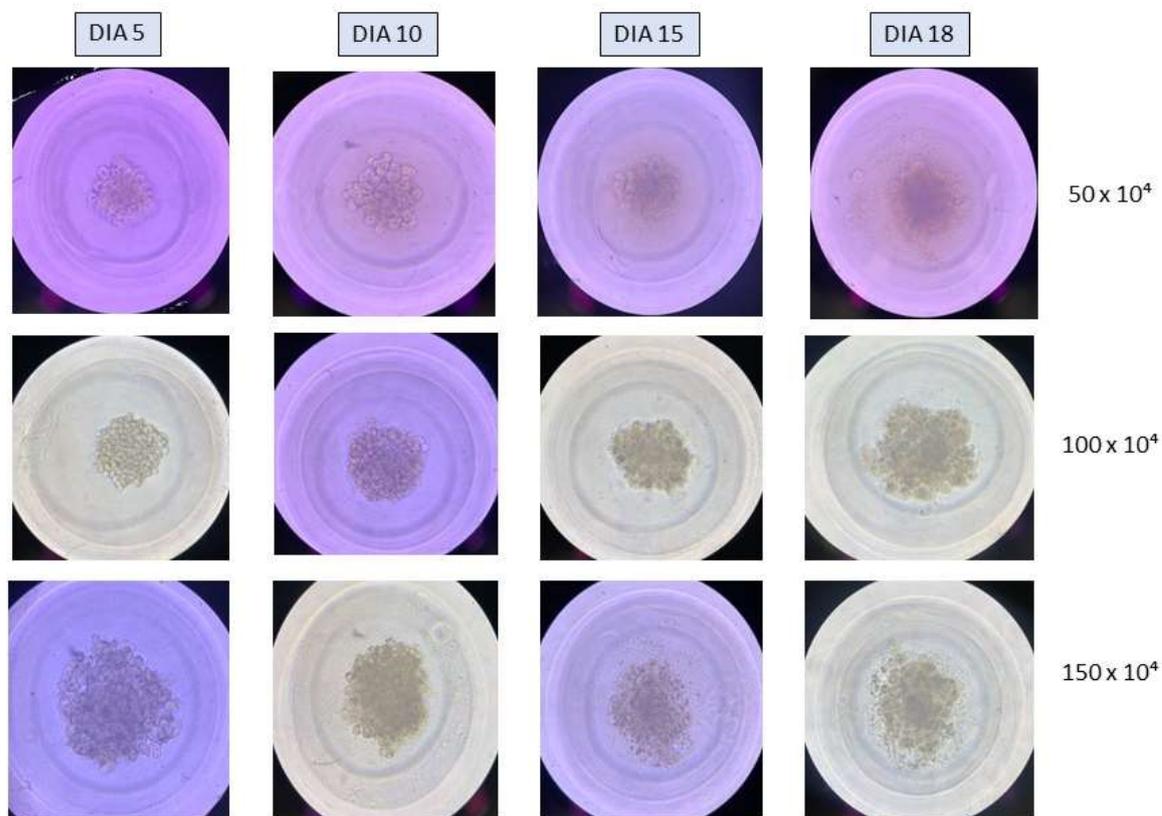


Figura 2. Fotografia representativa da proliferação dos esferoides de HepG2 nas concentrações de 50, 100 e 150×10^4 células, visualizados por microscopia óptica com a objetiva de 40x.

Enquanto as células em cultura bidimensional apresentam uma curvatura de crescimento exponencial e podem ter sua taxa de crescimento facilmente determinada pelo tempo de duplicação, os esferoides possuem crescimento do tipo nodular, composto por camadas proliferativas que apresentam um maior contato com os nutrientes do meio de cultura, apresentando uma taxa de crescimento que se enquadra no modelo logarítmico (AMARAL et al., 2017).

Além disso, a caracterização morfológica do cultivo dessa linhagem mostrou o que pode ser percebido visualmente, isto é, que, de forma geral, seu crescimento foi regular e

o formato de esfera se manteve mais homogêneo e prolongado no dia 5, na concentração 100×10^4 células por chip.

Após a obtenção dos esferoides, os mesmos foram avaliados quanto a morfologia pelo método do Diâmetro de Faret, pela solidez, esfericidade e circularidade (figura 3).

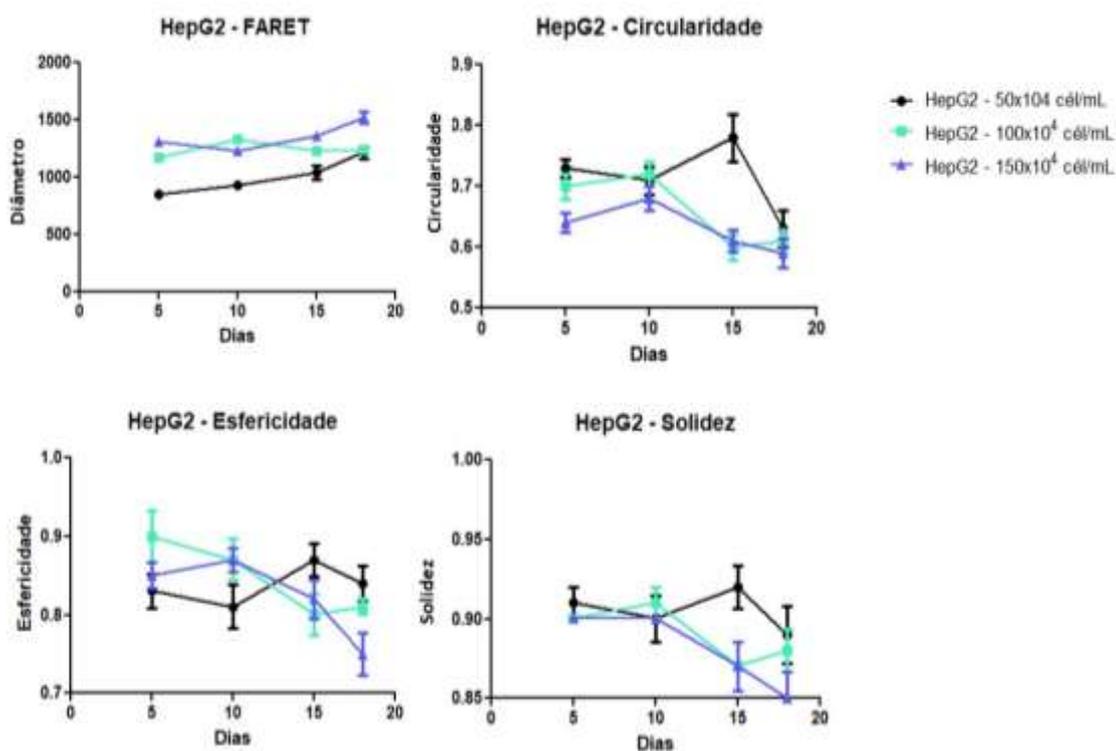


Figura 3. Análise morfológica dos esferoides obtidos nas concentrações de 50, 100 e 150×10^4 células de HepG2 nos tempos de 5, 10, 15 e 18 dias.

Esferoides com diâmetros entre $1205,05 \pm 110,67 \mu\text{m}$ e $1167 \pm 44,78 \mu\text{m}$ e circularidade entre $0,9 \pm 0,1$ e $0,8 \pm 0,1$ foram obtidos nos dias 5 e 18, respectivamente, na concentração de 100×10^4 células de HepG2. Além disso, pode-se inferir que quanto maior a concentração de células utilizadas, maior foi o diâmetro do esferoide formado, uma vez que a quantidade de células influencia diretamente o diâmetro obtido. A determinação do diâmetro e a circularidade dos esferoides durante o processo de

padronização das condições de cultivo é importante, visto que o tamanho do esferoide pode influenciar em sua viabilidade e resposta a diferentes estímulos, como sua exposição frente ao tratamento com fármacos (SAMBALE et al., 2015).

Outro parâmetro avaliado foi o de solidez, que é um indicador da regularidade e rugosidade da superfície dos esferoides. Segundo Santos e colaboradores (2016), os esferoides obtidos a partir de linhagens tumorais são considerados regulares se não apresentarem vincos ou arestas na superfície, além de apresentarem valores de solidez superiores a 0,9. Em todas as condições de cultivo dos nos tempos de 5 e 10 apresentaram uma solidez igual a 0,9, somente a partir do dia 15 foi observado valores inferiores a 0,8 de solidez.

Assim, conforme todos os parâmetros analisados e condições de cultivo, foi escolhido como modelo ideal para aplicação em estudos de viabilidade celular ou farmacocinéticos o cultivo dos esferoides na concentração de 100×10^4 podendo ser tratados no 5 após o cultivo do esferoide, tendo em vista que à partir do dia 10, as bordas dos esferoides já começam a se desagregar do centro do microtecido, e nos dias 15 e 18 os microtecidos já crescem de forma exacerbada fazendo com que haja a perda da esfericidade nas bordas, sendo caracterizada pela irregularidade no formato e aumento de tamanho.

3.4. Avaliação de viabilidade celular em modelo 3D

O efeito da CNFD e da NANO09-B sob a viabilidade celular no modelo 3D foi realizado com os esferoides de HepG2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas, utilizando o ensaio do Alamar blue, estão representados na tabela 3.

Tabela 3.- Efeito da CNFD e da NANO09-B na viabilidade celular do modelo de esferoides com HepG2 utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 24, 48 e 72h. Os valores estão representados como CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

Amostra	CI_{50} (μM)		
	24 horas	48 horas	72 horas
CNFD	3,71 (3,48-3,95)	3,32 (1,83-4,02)	2,91 (2,68 - 3,17)
NANO09-B	4,75 (4,25-5,08)	4,32 (4,13-4,67)	3,62 (3,46-3,98)
Doxorrubicina	3,90 (3,15-4,83)	2,90 (2,62 - 3,23)	1,88 (1,23-2,76)

Em todos os tempos houve morte celular, havendo a diminuição da viabilidade celular conforme o tempo de exposição. Ao comparar os resultados obtidos de viabilidade no modelo 3D e no modelo 2D, demonstrado no item 3.2, pode-se observar diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as viabilidades das linhagens celulares de HepG2 nos diferentes modelos. Essas diferenças se apresentaram como um aparente aumento nos níveis de viabilidade celular no modelo 3D devido a um aumento na taxa de conversão da resazurina em resorufina no ensaio do Alamar Blue (BONNIER et al., 2015).

Em estudos comparando a viabilidade de células cultivadas em culturas 2D com células cultivadas em matrizes de gel de colágeno, o aparente aumento da viabilidade observada utilizando o ensaio de citotoxicidade de Alamar Blue foi atribuído a diferenças nas taxas de difusão e conversão do corante devido a alteração da geometria e morfologia do modelo (GARGOTTI et al., 2018).

3.5. Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 3D

A compreensão das alterações metabólicas nas células tumorais e a identificação de alvos metabólicos específicos têm aberto novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias anticancerígenas mais eficazes. O direcionamento do metabolismo tumoral é uma abordagem promissora e em constante evolução, que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menor toxicidade. Essa estratégia busca explorar as

características metabólicas distintas das células tumorais, visando inibir vias metabólicas essenciais para seu crescimento e sobrevivência. Essa abordagem tem o potencial de direcionar terapêuticamente as células cancerígenas, oferecendo novas alternativas terapêuticas (LUENGO et al., 2017).

As células cancerígenas apresentam uma notável capacidade de sobrevivência, o que resulta em uma demanda energética intensa. Isso leva a um aumento no consumo de glicose e glutamina, bem como a alterações metabólicas em vias de biossíntese de lipídios, aminoácidos e outras macromoléculas em diferentes locais tumorais. Essas alterações metabólicas desempenham um papel crucial no desenvolvimento do câncer (CHOI; PARK, 2018; JIN; ZHOU, 2019; POPE et al., 2019).

Compreender a interrupção da reprogramação metabólica é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos direcionados ao metabolismo tumoral. Ao identificar e visar esses alvos específicos, é possível interferir nas vias metabólicas das células cancerígenas, desequilibrando seu metabolismo e inibindo seu crescimento descontrolado, permitindo assim melhorar a eficácia dos tratamentos anticancerígenos e reduzir os efeitos colaterais associados às terapias convencionais (NAVARRO et al., 2022).

Assim, para avaliação do metabolismo em modelo 3D, após a padronização do número de células e do tempo de cultivo, realizou-se a análise de viabilidade celular a fim de se utilizar uma concentração de CNFD e a NANO09-B que não fosse citotóxica para avaliação da captação de glicose e LDH. Dessa forma, foram avaliadas as concentrações de 1 μ M nos esferoides de HepG2. Na concentração avaliada só houve redução significativa na viabilidade celular com tratamento com a CNFD ($p < 0,05$) quanto comparada ao controle negativo e a NANO09-B, porém não foi suficiente para ocasionar mais de 20% da morte celular (figura 4).

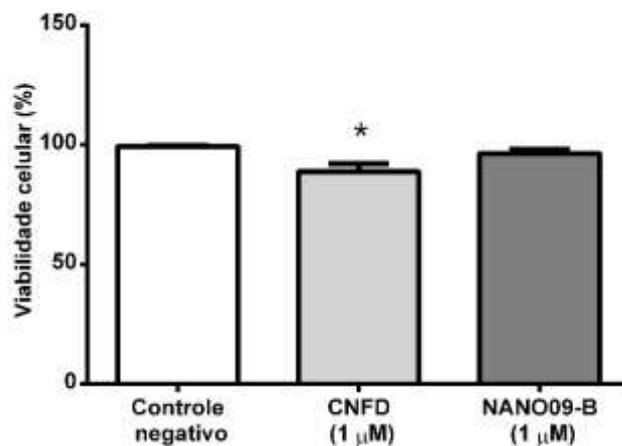


Figura 4 – Viabilidade celular após tratamento com a CNFD e a NANO09-B na concentração de 1 μM em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

A partir dos dados de viabilidade celular, utilizou-se a concentração de 1 μM de CNFD e NANO09-B para avaliação da influência no metabolismo em relação a atividade de LDH, onde foi observado que não houve diminuição na atividade da enzima no modelo 3D de HepG2 (Figura 5).

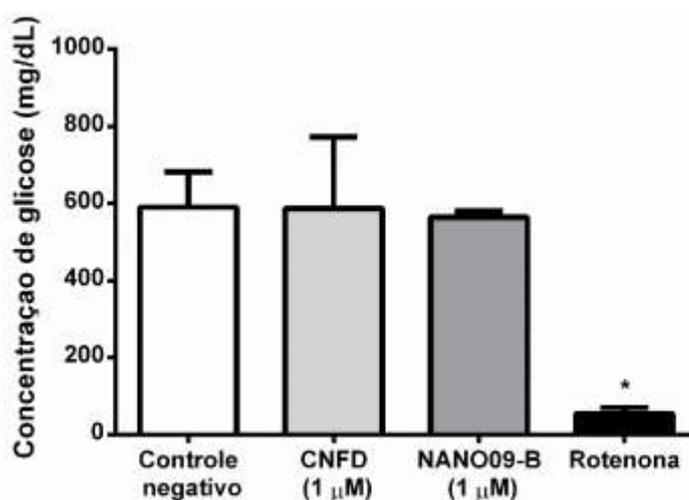


Figura 5 – Avaliação da influência da CNFD e NANO09-B na concentração de 1 μM na atividade enzimática de LDH em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

Em células tumorais, a atividade da LDH é frequentemente aumentada, promovendo a produção de lactato devido à necessidade das células tumorais de produzir energia rapidamente para suportar sua alta taxa de proliferação (ALTINOZ; OZPINAR, 2022). Assim, pode-se observar que a CNFD, tanto isolada como incorporada em uma nanoformulação, não modula a atividade da LDH.

Quanto a avaliação da captação de glicose, após o tratamento de 24 horas, não houve redução na captação da glicose após o tratamento com a CNFD e a NANO09-B, visto que os níveis de glicose nos esferoides de HepG2 se mantiveram constante mesmo após o tratamento (figura 6).

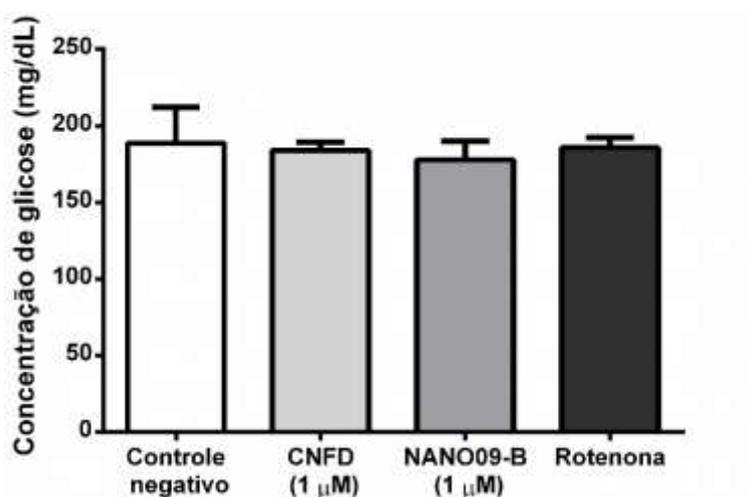


Figura 6 – Avaliação da influência da CNFD e NANO09-B na concentração de 1 µM captação de glicose em modelo 3D de HepG2 no tempo de 24 horas. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

Assim, pode-se inferir que a CNFD é uma molécula que apresenta potencial farmacológico para o tratamento do câncer, porém, isolada ou incorporada em uma formulação, não afeta o metabolismo de células hepáticas neoplásicas quanto a atividade enzimática de LDH e a captação de glicose, apresentando mecanismos distintos de atividade.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos *in silico*, pode-se inferir que a atividade anticâncer da CNFD possa estar relacionada as vias MAPK e PI3K/AKT/Mtor.

O modelo de esferoides com células da linhagem HepG2 na concentração de 100×10^4 células apresentou características morfológicas de solidez, circularidade, esfericidade e diâmetro estáveis no tempo de 5 e 10 dias, sendo um modelo aplicável para avaliação de viabilidade celular pelo método do Alamar.

A exposição a CNFD, isolada ou incorporada a uma nanoesfera, ocasiona morte celular em modelos 2D e 3D, porém não ocasiona redução na atividade enzimática da enzima LDH e na captação de glicose no modelo 3D de HepG2.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. D. O. et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ros-mediated apoptosis with activation of the jnk and p38 signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 343, 201.

BANERJEE, P. et al. SuperCYPsPred-a web server for the prediction of cytochrome activity. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W580–W585, 2020.

BRAVO, J. Development and validation of target-based drug design tools: virtual screening of monoamine oxidase inhibitors. Tese de Doutorado. University of Geneva, 2009.

BROCCATELLI, F. et al. A novel approach to predict P-glycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields. **J Med Chem**, v. 6, n. 54, 2011.

CHENG, F. et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and non-inhibitors using combined classifiers. **J Med Chem**, v. 5, n. 51, 2011.

CHEN, J. et al. Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 12, p. 4302–4312, 2018

DAS CHAGAS, F. P. DE A. Computational analysis of the inhibitory activity of eugenol on the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways. **Sci Rep**, v.1, n. 10, 2020.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: uma ferramenta web gratuita para avaliar farmacocinética, semelhança com drogas e simpatia química medicinal de pequenas moléculas. **Representante de Ficção Científica**. 2017;7:42717. Publicado em 2017 Mar 3. doi:10.1038/srep42717

FILIMONOV DA, POROIKOV VV In: Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening; Varnek, A. e Tropsha, A. Ed.; RSC Publishing: Cambridge (Reino Unido), 2008, 182-216.

Guan L, Yang H, Cai Y, et al. ADMET-score - uma função de pontuação abrangente para avaliação da semelhança de drogas químicas. *Medchemcomm*. 2018;10(1):148-157. Publicado em 2018 Nov 30. doi:10.1039/c8md00472b

Hennemann, M. et ai. (2009) CypScore: Previsão quantitativa de reatividade para citocromos P450 com base na teoria orbital molecular semiempírica. *Chem Med Chem*, 4, 657-669.

HONGBIN YANG, CHAOFENG LOU, LIXIA SUN, JIE LI, YINGCHUN CAI, ZHUANG WANG, WEIHUA LI, GUIXIA LIU, YUN TANG, admetSAR 2.0: web-service para previsão e otimização de propriedades químicas ADMET, **Bioinformática**, Volume 35, Edição 6, 15 de Março de 2019, Páginas 1067-1069, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 162, p. 1239-1249, 2011.

JONES, JP et ai. (2002) Modelos computacionais para citocromo P450: Um modelo eletrônico preditivo para oxidação aromática e abstração de átomos de hidrogênio. *Aba Droga-me. Dispos.*, 30, 7-12.

LEE, S. K. Topomol v.1.5, **Research Institute of Bioinformatics & Molecular Design(BMD)**, Seoul, Korea

LIN JH, LU AY. Inibição e indução do citocromo P450 e as implicações clínicas. **Clin Pharmacokinet**. 1998 Nov;35(5):361-90. doi: 10.2165/00003088-199835050-00003. 9839089.

LUIGI, Q. et al. In Vivo Antitumor Activity and Host Toxicity of Methoxymorpholinyl Doxorubicin: Role of Cytochrome P450 3A. *Cancer Res* June 15 2000

LI, Y. et al. Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 9, p. 1113-1144, 2019.

MORRIS GM, LIM-WILBY M. Molecular docking. **Métodos Mol Biol**. 2008;443:365-82. doi: 10.1007/978-1-59745-177-2_19. 18446297.

MA X. et al. **Acta Pharmacologica Sinica**. 2005, 26.500.

OLSEN L, MONTEFIORI M, TRAN KP, JØRGENSEN FS. SMARTCyp 3.0: servidor de previsão de local de metabolismo do citocromo aprimorado P450. **Bioinformática**. 2019 1.35/07/2019 3174-3175. doi: 10.1093/bioinformática/btz037. 30657882.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B. **Rev. Virtual Quim.**,2012,4 (6), 739-776. Data de publicação na Web: 24 de dezembro de 2012.

REDLICH, G. et al. Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 11, p. 4678–4688, nov. 2008.

PANTSAR, T.; POSO, A. Binding affinity via docking: fact and fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, 2018.

SEGALL MD, BARBER C. Abordando o risco de toxicidade ao projetar e selecionar compostos na descoberta precoce de drogas. **Discov de drogas hoje**. 2014 Maio;19(5):688-93. doi: 10.1016/j.drudis.2014.01.006. Epub 2014 Jan 19. 24451294.

TAN, B. H. et al. In vitro and insilico approaches to study cytochrome P450 mediated interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p 319-328, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 30 jan. 2010

WANG, L. et al. Effects of CYP3A4 Polymorphisms on Drug Addiction Risk Among the Chinese Han Population. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 315, 2019.

ZHAO, Y.H. *et al.* **J. Pharm. Sci.** 2001, 90, 749.

CONCLUSÃO FINAL

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Houve a otimização do processo de síntese da CNFD, demonstrada pelo aumento do rendimento do produto em comparação com o descrito na literatura. Além disso, pode-se inferir que o tempo reacional é superior a 30 minutos e que concentrações acima de 2 equivalentes do catalisador não apresentam diferença estatística no rendimento da reação;
- A CNFD apresenta uma predição de alta taxa de absorção intestinal (97%) e forte ligação às proteínas plasmáticas (93%) sem inibir a glicoproteína-P. Além disso, exibiu especificidade e complementaridade na inibição de CYP1A2, 2C19 e 2C9, e é provável que sofra reações de metabolismo de fase 1, particularmente no carbono 13;
- As nanoferas contendo a CNFD utilizando o polímero Kollicoat® MAE 100 P formam sistemas monodispersos estáveis em prateleira ao longo de 150 dias, além de apresentar uma taxa de encapsulação superior a 89%.
- A atividade anticâncer da CNFD pode estar relacionada com as vias MAPK e PI3K/AKT/Mtor conforme observado no estudo *in silico*, sendo necessário a realização de ensaios confirmatórios *in vitro*;
- A exposição a CNFD, isolada ou incorporada a uma nanoesfera, ocasiona morte celular em modelos 2D e 3D, porém não ocasiona redução na atividade enzimática da enzima LDH e na captação de glicose no modelo 3D de HepG2;
- Este trabalho é o primeiro a descrever o emprego da CNFD em uma nanoformulação e servirá como ponto de partida para continuidade de estudos quanto ao seu potencial tecnológico e farmacológico.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, U. M. et al. **Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntnericom β -ciclodextrina.** Quím Nova, v. 37, p. 50- 55, 2014.

AHMED, S. A. et al. **A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay.** Journal of Immunological Methods, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AMADO, J. R. R. et al. **Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles.** Saudi Pharmaceutical Journal, v. 25, 2017.

BORDES, C. et al. **Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process.** International Journal of Pharmaceutics, v. 383, p. 236–243, 2010.

BRANDT, R. et al. **Cell type-dependent differential activation of ERK by oncogenic KRAS in colon cancer and intestinal epithelium.** Nature Communications, v. 10, 2019.

CONTRI, R. V. et al. **Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties.** Journal of Experimental Nanoscience, v. 8, n.7-8, 2013.

DABROWSKA, M. B. et al. **The Impact of Treatment on Quality of Life in Patients with Head and Neck Cancer.** Iranian journal of public health, v. 48, n. 1, p. 181-183, 2019.

DALEZIS P. et al. **Azasteroid alkylators as dual inhibitors of AKT and ERK signaling for the treatment of Ovarian Carcinoma.** Cancers, v. 12, n. 5, 2020.

FERREIRA, V. F.; FERREIRA, S. B.; DA SILVA, F. DE C. **Strategies for the synthesis of bioactive pyran naphthoquinones.** Organic & Biomolecular Chemistry, v. 8, n. 21, p. 4793, 2010.

FESSI, H. et al. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** International Journal of Pharmaceutics, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FREIRE, C. P. V. et al. **Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents.** MedChemComm, v. 1, n. 3, p. 229, 2010.

GAO, J. et al. **Computational methods for designing potential inhibitors for activin type IIb (ActRIIB) receptor for treatment of anaemia.** Biomedical Research, v. 28, n. 8, 2017.

HALDER, A. K. et al. **Multi-Target chemometric modelling, fragment analysis and virtual screening with ERK inhibitors as potential anticancer agents.** Molecules, v. 24, n. 21, 2019.

HUANG, Y.; SHEN, F. **Effects of cultural tailoring on persuasion in cancer communication: a meta-analysis.** Journal of Communication, v. 66, n. 4, p. 694-715, 2016.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?** Ministério da Saúde, Governo Federal; 2019.

KANO, Y. et al. **Tyrosyl phosphorylation of KRAS stalls GTPase cycle via alteration of switch I and II conformation.** Nature Communications, v. 10, 2019.

LEITE, M. L.; DA CUNHA, N. B.; COSTA, F. F. **Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment.** Pharmacology & therapeutics, v. 183, p. 160-176, 2018.

LOBATO, K. B. S. et al. **Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules.** Food Chemistry, v. 141, n. 4, 2013.

MBAVENG, A. T. et al. **A naturally occurring triterpene saponin ardisiacrispin B displayed cytotoxic effects in multi-factorial drug resistant cancer cells via ferroptotic and apoptotic cell death.** Phytomedicine, v. 43, p. 78-85, 2018.

MELO, N. F. S. D. et al. **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína.** Revista Química Nova, Vol. 33, No. 1, p. 65-69, 2010.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. **Nanoparticles – a review.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v.5 , n. 1, 2006.

NAIR, V. et al. **CAN Mediated oxidative addition of 2-hydroxynaphthoquinone to dienes: a facile synthesis of naphthofurandiones.** Tetrahedron, v. 57, n. 36, p. 7705-7710, 2001.

NASCIUTTI, P. R. **Desenvolvimento de novos fármacos.** Programa de Pós Graduação (mestrado) da Universidade Federal de Goiás. 2012.

OMS- Organização Mundial Da Saúde; OPAS- Organização Pan-Americana Da Saúde. **Câncer.** Setor de Embaixadas Norte, Lote 19, 70800-400 Brasília, DF, Brasil, 2018.

PASSIGLIA, F. et al. **KRAS inhibition in non-small cell lung cancer: Past failures, new findings and upcoming challenges.** European Journal of Cancer, v. 137, p. 57-68, 2020.

PEREIRA, D. G. **Importância do metabolismo no planejamento de fármacos.** Química Nova, v. 30, n. 1, p. 171–177, 2007.

REIS, A. P. A.; PANOBIANCO M. S.; GRADIM C. V. C.; **Enfrentamento de mulheres que vivenciaram o câncer de mama.** Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro, v. 9, p. 1-10, 2019.

RIBEIRO, J. B. et al. **Estimativas da incidência de câncer no estado de Sergipe em 2018.** Congresso Nacional de Enfermagem – CONENF, Maio de 2018.

ROA, J. P. B. et al. **Síntese e caracterização do copolímero Poli (3-hidroxi-butirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de Poli (3-hidroxi-butirato) e Poli (ϵ -caprolactona).** *Polímeros*, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

ROCHA, L. N. D. **Uso da fitoterapia por pacientes submetidos a tratamento antineoplásico.** Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Enfermagem da Universidade de Brasília, 2016.

SILVA, L. M. et al. **Polymorphs studies and co-crystals in drug development: a literature review.** *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 13, n. 4, p. 67-73, 2017.

TAGLIARI, M. P. Et al. **Development of oral nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: physicochemical characterisation, photostability studies, in vitro and in vivo evaluation.** *Química Nova*, v. 38, n. 6, 2015.

TAMASHIRO, Fernanda Leika; BOU-CHACRA, Nádía Araci. **Nanoemulsão contendo óleos vegetais: preparação e caracterização físico-química.** *Resumos*, 2018.

TROTT O.; OLSON A. J. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading.** *J Comput Chem*, v.31, p. 455–461, 2010.

WESTERMAIER, Y. et al. **Virtual screening: An in silico tool for interlacing the chemical universe with the proteome.** *Methods*, v. 71, p. 44-57, 2015.

XIN, L.T. et al. **Discovery of DNA Topoisomerase I Inhibitors with Low-Cytotoxicity Based on Virtual Screening from Natural Products.** *Marine drugs*, v. 15, n. 7, 2017.

ZAKIRYANOVA, G. K.; WHEELER, S.; SHURIN, M. R. **Oncogenes in immune cells as potential therapeutic targets.** *ImmunoTargets and therapy*. v. 7, p. 21, 2018.