

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF

Planejamento *in silico* e síntese de derivados da β -lapachona como candidatos
a agentes antimelanoma

Rhanna Victória Amaral da Silva

MANAUS
2022

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF

Rhanna Victória Amaral da Silva

Planejamento *in silico* e síntese de derivados da β -lapachona como candidatos
a agentes antimelanoma

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal do Amazonas para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Guilhaon Simplicio

MANAUS

2022

Ficha Catalográfica

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

S586p Silva, Rhanna Victória Amaral da
Planejamento in silico e síntese de derivados da -lapachona como
candidatos a agentes antimelanoma / Rhanna Victória Amaral da
Silva . 2022
114 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Fernanda Guilhaon Simplicio
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Tabebuia avellaneda. 2. -lapachona. 3. docking. 4. melanoma.
I. Simplicio, Fernanda Guilhaon. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

"Planejamento *in silico* e síntese de derivados da β -lapachona como candidatos a agentes antimelanoma"

DISCENTE: RHANNA VICTÓRIA AMARAL DA SILVA

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 20/09/2022.

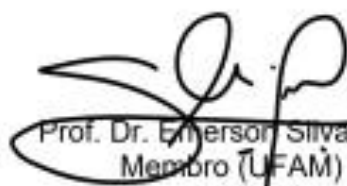
Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

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

Fernanda G. Simplicio
Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio
Orientadora e Presidente da Banca (UFAM)

Documento assinado digitalmente
gouvbr PAULA M. ALVAREZ ABREU
Data: 16/09/2022 11:38:24 -0300
Verifique em <https://verificador.js.br>

Profa. Dra. Paula Alvarez Abreu
Membro (UFRJ)


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro (UFAM)

RESUMO

O melanoma corresponde a 3% dos diagnósticos de neoplasia, entretanto, apresenta alta mortalidade, devido sua rápida evolução. Caracteriza-se pelo crescimento desordenado de melanócitos e, dentre os seus fatores de risco estão a exposições a raios UV ou predisposição genética. O tratamento consiste basicamente na remoção do tumor e quimioterapia. Assim, a busca por novas terapias com menos efeitos adversos e que apresentem maior tempo de sobrevida de pacientes é constante. O lapachol, uma naftoquinona isolada primeiramente da serragem do Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*), juntamente com seus derivados, apresenta atividade contra diversas linhagens de câncer, e tem sido alvo de muitos estudos nesse campo. Métodos computacionais permitem estudar a melhoria de estruturas químicas candidatas a fármacos de forma mais ágil, poupando recursos na seleção de moléculas que serão sintetizadas e testadas, além de aumentar as chances de sucesso do estudo. Nesse contexto, esta pesquisa objetivou avaliar derivados da β -lapachona, obtida a partir do lapachol, como agentes antimelanoma, por meio de análises *in silico* e *in vitro*. Os derivados foram planejados com base na literatura e submetidos a análise de ancoragem molecular (*docking*), previsões farmacocinéticas e toxicológicas *in silico*, síntese, caracterização estrutural e análise de citotoxicidade. Foram avaliados 137 derivados por *docking* frente as enzimas Metaloproteinases de Matriz-2 e -9; BRAF^{V600E}. Destes, oito foram selecionados e sintetizados a partir de 2,52 g de lapachol extraído da serragem do Ipê-roxo. Os derivados foram purificados por cromatografia de coluna e sua estrutura química confirmada por RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz). Então sua citotoxicidade foi avaliada inicialmente pelo teste de *Artemia salina* e, posteriormente, contra fibroblastos humanos MRC-5. Dos derivados sintetizados com rendimentos que variaram de 24% (**11**) a 88% (**7**), sete são inéditos na literatura. Os resultados do *docking* sugerem que essas moléculas podem ser potenciais inibidores de alvos moleculares de tumores malignos, devido a afinidade de ligação pelas proteínas selecionadas. No teste contra *A. salina*, os derivados **3** e **8** apresentaram CL₅₀ de 67,36 e 314,86 μ g/mL, respectivamente, e os demais não apresentaram toxicidade significativa. Por outro lado, no teste contra células MRC-5, todos os derivados reduziram a viabilidade celular abaixo de 20 % após 48 horas na concentração de 100 μ M, e os derivados **5**, **7**, **8** e **11** apresentaram IC₅₀ de 48,54, 46,96, 45,65 e 55,24 μ M, respectivamente, após 72 horas. Os resultados observados indicam as substâncias desenvolvidas neste trabalho como candidatas promissoras a futuras investigações com análises mais específicas sobre seu potencial antimelanoma, em especial a molécula **8**, devido a apresentar menor valor de IC₅₀ para células normais de MRC-5 e maior letalidade para *Artemia salina*. Outra perspectiva futura pode estar associada a escolha de formulações que melhorem suas características de solubilidade, para aumentar sua biodisponibilidade.

Palavras-chave: *Tabebuia avellanedae*, β -lapachona, *docking*, melanoma.

ABSTRACT

Melanoma accounts for 3% of cancer diagnoses, however, it has a high mortality rate due to its rapid evolution. It is characterized by the disordered growth of melanocytes and among its risk factors are exposure to UV rays or genetic predisposition. Treatment basically consists of tumor removal and chemotherapy. Thus, the search for new therapies with fewer adverse effects and with longer patient survival is constant. Lapachol, a naphthoquinone first isolated from sawdust of Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*), together with its derivatives, has activity against several cancer strains, and has been the subject of many studies in this field. Computational methods make it possible to study the improvement of chemical structures that are candidates for drugs in a more agile way, saving resources in the selection of molecules that will be synthesized and tested, in addition to increasing the chances of success of the study. In this context, this research aimed to evaluate β -lapachone derivatives, obtained from lapachol, as antimelanoma agents, through *in silico* and *in vitro* analyses. The derivatives were designed based on the literature and subjected to molecular docking analysis, *in silico* pharmacokinetic and toxicological predictions, synthesis, structural characterization and cytotoxicity analysis. A total of 137 derivatives were evaluated by docking against the enzymes Metalloproteinases of Matrix-2 and -9; BRAFV600E. Of these, eight were selected and synthesized from 2.52 g of lapachol extracted from Ipê-roxo sawdust. The derivatives were purified by column chromatography and their chemical structure confirmed by ¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz). Then its cytotoxicity was evaluated initially by the *Artemia salina* test and, later, against MRC-5 human fibroblasts. Of the derivatives synthesized with yields ranging from 24% (11) to 88% (7), seven are unprecedented in the literature. The docking results suggest that these molecules may be potential inhibitors of molecular targets of malignant tumors, due to the binding affinity for the selected proteins. In the test against *A. salina*, derivatives 3 and 8 presented LC₅₀ of 67.36 and 314.86 μ g/mL, respectively, and the others showed no significant toxicity. On the other hand, in the test against MRC-5 cells, all derivatives reduced cell viability below 20% after 48 hours at a concentration of 100 μ M, and derivatives 5, 7, 8 and 11 had an IC₅₀ of 48.54, 46.96, 45.65 and 55.24 μ M, respectively, after 72 hours. The observed results indicate the substances developed in this work as promising candidates for future investigations with more specific analyzes of their antimelanoma potential, especially molecule 8, due to its lower IC₅₀ value for normal MRC-5 cells and higher lethality for *Artemia salina*. Another future perspective may be associated with the choice of formulations that improve their solubility characteristics, to increase their bioavailability.

Keyword: *Tabebuia avellanedae*, β -lapachone, docking, melanoma.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam de forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”.

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, porque até aqui ele me sustentou, me deu forças mesmo quando imaginei que não conseguiria seguir. Tantas foram as provações que eu não poderia descrever em uma só página. Este trabalho foi desenvolvido não só para gerar dados científicos, mas como uma prova de persistência e resistência. E a isso também sou grata.

Em segundo a minha rede de apoio, chamada FAMÍLIA. Meus pais Francisco de Assis Andrade da Silva e Izabel Freire Amaral por sempre acreditarem em mim e me darem o melhor dessa vida que é amor, educação e proteção. Minha sogra Maria das Graças sempre confiante nos guardando em suas orações. Meus irmãos, cunhados e cunhadas que me deram apoio junto ao meu marido em muitos momentos para que eu pudesse ir à universidade.

Quero deixar aqui registrado um agradecimento especial ao meu marido Rogério Jacinto de Moraes Jr. Obrigada por tanto, por estar comigo em mais essa conquista, e por não soltar a minha mão. Nunca esquecerei desse momento de nossas vidas, que parecia ser tão turbulenta, mas também calma, porque tínhamos um ao outro, e que seja assim para o resto de nossas vidas. Obrigada por ser meu alicerce.

Aos meus filhos Heitor, tão amoroso e gentil e Miguel, tão forte e destemido, meu infinito amor e razão para continuar. Em meio a tudo isso Deus me deu de presente vocês e assim me fez completa, porque quando nasce um filho a mãe renasce. E sou ainda mais grata porque Deus me deu duas chances de ter o Miguel pois deu a ele a cura (Meu Milagre).

O que dizer da minha orientadora, Fernanda Guilhon Simplicio. É o exemplo perfeito para a palavra orientar. Talvez ela não saiba tamanha a sua importância para eu ter continuado, mas eu sou grata por cada palavra de incentivo e por cada vez que ela exigiu de mim o melhor. E se hoje eu sou professora, é lembrando da sua forma de exercer esta linda profissão que eu me espelho.

A Dra Ana Cristina, a dona Ana, por ser a maior razão para que eu conseguisse as sínteses, inteligente e incansável pelo melhor resultado. Eu sofria quando ela falava que tinha que refazer uma coluna, mas refazia com gratidão. A senhora sempre terá um espaço em meu coração.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas INPA, por fazer todas as minhas análises de RMN, em especial ao Magno que mesmo com muitas amostras conseguiu incluir as minhas.

Ao professor Emerson Silva Lima, do laboratório BIOPHAR por aceitar fazer minhas análises em cima da hora, e a Barbara por fazê-las.

Aos meus amigos do laboratório que levarei guardados em um potinho, Dra Tallita, Msc Carlos, Rebeca, Aryane, Alex e a todos dessa super equipe chamada FITOPHAR.

Obrigada a quem direta ou indiretamente contribuiu para esta pesquisa. E a Universidade Federal do Amazonas, a qual me recebeu no curso de graduação, no mestrado e agora como professora. A minha vida se transformou pela educação!

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Características da formação de melanoma cutâneo..... | 20 |
| Figura 2. Etapas de formação do câncer..... | 21 |
| Figura 3. Localização dos melanócitos na camada basal..... | 22 |
| Figura 4. Via de sinalização de MAPK..... | 24 |
| Figura 5. Estrutura dos domínios das MMPs -2 e -9..... | 27 |
| Figura 6. Estrutura química de 1,4-naftoquinona (A) e 1,2-naftoquinona (B)..... | 31 |
| Figura 7. O ciclo redox das quinonas..... | 32 |
| Figura 8. <i>Tabebuia avellanedae</i> | 33 |
| Figura 9. Estrutura química de lapachol (A), α -lapachona (B) e β -lapachona (C)..... | 33 |
| Figura 10. Mecanismo da atividade antitumoral da β -lapachona..... | 34 |
| Figura 11. Delineamento experimental das atividades propostas..... | 39 |
| Figura 12. Enzimas obtidas do PDB. MMP-2 (A); MMP-9 (B); BRAF V600 (C)..... | 40 |
| Figura 13. Ciclização do lapachol para obtenção de β -lapachona..... | 44 |
| Figura 14. Estrutura dos derivados de β -lapachona selecionados para síntese e avaliação in vitro | 45 |
| Figura 15. Obtenção de intermediário contendo azida 4 | 46 |
| Figura 16. Reação para obtenção do derivado 5 | 47 |
| Figura 17. Reação para obtenção do derivado 7 | 47 |
| Figura 18. Reação para obtenção do derivado 8 | 48 |
| Figura 19. Reação para obtenção do derivado 9 | 48 |
| Figura 20. Reação para obtenção do derivado 10 | 49 |
| Figura 21. Reação para obtenção do derivado 11 | 49 |
| Figura 22. Reação para obtenção do derivado 12 | 50 |
| Figura 23. Interação da enzima MMP9 com o ligante original..... | 54 |
| Figura 24. Sobreposição do ligante após redocking..... | 55 |
| Figura 25. Análise das interações dos derivados 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 | 57 |
| Figura 26. Etapas de extração do Lapachol..... | 60 |
| Figura 27. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) derivado 3 | 61 |
| Figura 28. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do nor-lapachol..... | 62 |
| Figura 29. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) de 3-bromo- β -lapachona..... | 64 |
| Figura 30. Cromatografia em camada delgada de 5 | 65 |
| Figura 31. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do 5 | 65 |
| Figura 32. Cromatografia em camada delgada de 7 | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 33. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do 7 | 66 |
| Figura 34. Cromatografia em camada delgada de 8 | 67 |
| Figura 35. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do derivado 9 | 67 |
| Figura 36. Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) do derivado 9 | 68 |
| Figura 37. Cromatografia em camada delgada de 10 | 69 |
| Figura 38. Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) de aminopirimidina β -lapachona..... | 70 |
| Figura 39. Cromatografia em camada delgada de 11 | 71 |
| Figura 40. Espectro de ^1H (500MHz; CDCl_3) de 1,2,4- triazol- β -lapachona..... | 71 |
| Figura 41. Cromatografia em camada delgada de 12 | 72 |
| Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) de tiosemicarbazida β -lapachona... | 72 |
| Figura 43. Viabilidade celular em células normais de MRC5..... | 74 |

LISTA DE QUADROS TABELAS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo no Brasil 2020..... | 19 |
| Quadro 2. Classificação das Metaloproteinases de Matriz. | 26 |
| Tabela 1. Resultados do redocking, funções de pontuação e pontuação de controle..... | 54 |
| Tabela 2. Resultados do <i>docking</i> dos análogos da β -lapachona selecionados para síntese..... | 56 |
| Tabela 3. Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas..... | 58 |
| Tabela 4. Dados de RMN dos derivados sintetizados..... | 60 |
| Tabela 5. Dados de atividade de citotoxicidade em <i>Ar. salina</i> | 73 |
| Tabela 6. Média de viabilidade da curva de diluição dos derivados e valor de IC ₅₀ | 75 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 Objetivo Geral | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 19 |
| 3.1. Câncer..... | 19 |
| 3.2. Melanoma..... | 22 |
| 3.3. Gene BRAF | 24 |
| 3.4. Metaloproteinases | 25 |
| 3.4.1. MMPs -2 e -9: estrutura e atuação no melanoma | 28 |
| 3.5. Tratamento do melanoma e inibidores enzimáticos | 29 |
| 3.6. Naftoquinonas | 31 |
| 3.7. Lapachol..... | 33 |
| 3.8. Planejamento racional de fármacos por ferramentas in silico ... | 36 |
| 4. METODOLOGIA | 40 |
| 4.1. Delineamento experimental..... | 40 |
| 4.2. Seleção e preparo dos receptores | 41 |
| 4.3. Validação do método e modelagem molecular..... | 41 |
| 4.3.1. Seleção das estruturas. | 41 |
| 4.3.2. Preparação das moléculas para docking | 42 |
| 4.3.3. Desenvolvimento e validação do método de docking | 42 |
| 4.4. Predição de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos | 44 |
| 4.5. Obtenção dos derivados de β -Lapachona..... | 44 |
| 4.5.1. Obtenção do lapachol (1)..... | 44 |
| 4.5.2. Síntese da β -Lapachona (2)..... | 45 |
| 4.6. Síntese e purificação dos derivados..... | 45 |
| 4.6.1. Derivado 3-bromo- β -lapachona (3). | 47 |
| 4.6.2. Obtenção de 3-azido-2,2-dimetil-2,3-dihidronaftoo-1,2,furano-4,5-diona (4) | 47 |
| 4.6.3. Síntese de β -lapachona-anilina (5) | 47 |
| 4.6.4. Síntese de β -lapachona-4-aminobenzofenona (7) | 48 |
| 4.6.5. Síntese de lapachona contendo triazol (8)..... | 49 |
| 4.6.6. Síntese de β -lapachona-aminopirimidina (C ₁₉ H ₁₆ O ₃ N ₃) (9)..... | 49 |
| 4.6.7. Reação da β -lapachona com aminopirimidina (ANEL B) (10) 50 | |
| 4.6.8. Reação da β -lapachona com triazol (ANEL B) (11) | 50 |
| 4.6.9. Síntese β -lapachona- com Tiosemicarbazida (ANEL B)(12).. | 51 |
| 4.6.10. Síntese de nor- β -lapachol (13)..... | 51 |
| 4.6.11. Síntese de 3-aminopirimidina-nor- β -lapachona (15) | 52 |
| 4.7. Caracterização estrutural | 52 |
| 4.8. Teste de citotoxicidade em <i>Artemia salina</i> | 52 |
| 4.9. Viabilidade celular | 53 |

| | |
|---|----|
| 4.10. Análise estatística | 53 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 5.1. Análises <i>in silico</i> | 54 |
| 5.2. Extração de Lapachol e caracterização estrutural..... | 61 |
| 5.2.1. β -lapachona (2) | 62 |
| 5.2.4. Síntese de β -lapachona-anilina (5) | 65 |
| 5.2.5. β -lapachona-4-aminobenzofenona (7) | 66 |
| 5.2.6. Síntese de lapachona contendo triazol (8) | 67 |
| 5.2.7. Síntese de β -lapachona-aminopirimidina (C ₁₉ H ₁₆ O ₃ N ₃) (9) .. | 69 |
| 5.2.8. Reação da β -lapachona com aminopirimidina (ANEL B) (10) | 70 |
| 5.2.9. Reação da β -lapachona com triazol (ANEL B) (11) | 71 |
| 5.2.10. Síntese β -lapachona- com Tiosemicarbazida (ANEL B)(12).. | 73 |
| 5.3. Citotoxicidade em <i>Artemia salina</i> | 73 |
| 5.4. Viabilidade Celular | 74 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 76 |
| 7. CONCLUSÃO | 82 |
| 8. REFERÊNCIAS | 83 |

1. INTRODUÇÃO

No corpo humano, o ciclo celular é responsável pela manutenção do equilíbrio entre órgãos e tecidos. O câncer, por sua vez, envolve uma série de alterações que culminam no crescimento disseminado e descontrole no processo de divisão celular (COX, 2021; BLUNCK et al., 2021; MAURO et al., 2011).

Estimativas sinalizam um aumento progressivo da incidência de mortalidade por doenças crônicas, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Em um levantamento realizado por Siegel et al. (2019), 1.762.450 novos casos e 606.880 mortes por câncer foram projetadas para ocorrer nos Estados Unidos para o mesmo ano da pesquisa. No Brasil, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte (BRAY et al., 2018; WHO, 2020). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (WHO, 2020; TORBRAND et al., 2017; SINGH et al., 2017).

O câncer de pele corresponde a cerca de 30% das neoplasias registradas no Brasil, sendo o melanoma a forma mais agressiva destes tumores, apesar de representar apenas 3% das neoplasias malignas. Surgem a partir dos melanócitos, podendo acometer várias partes do corpo, principalmente em populações de pele branca, além de alta capacidade em desenvolver metástase e resistência a várias terapias (INCA, 2020; DALLOULF et al., 2020; KO:FISHER, 2010).

A busca por novos métodos de diagnósticos e terapia são cada vez mais discutidos, na busca de alternativas e ferramentas que auxiliem na prevenção e diagnóstico precoce destas neoplasias (TORRES et al., 2019; CAVASOTTO:AUCAR, 2020) Em pacientes com melanoma em fases de metástase, o tratamento se limita a drogas cada vez menos eficazes devido a capacidade de resistência das células em estágios avançados da doença. (KASPER et al., 2017).

Diante destas evidências, o uso de produtos naturais tem tido impacto significativo no desenvolvimento de fármacos contra o câncer em todo o mundo (NEPOMUCENO, 2011). Uma das espécies que tem demonstrado grande potencial é a *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb., popularmente conhecida

como Ipê-roxo. Essa espécie arbórea da família Bignoniaceae, é encontrada em várias regiões do Brasil, sendo utilizada como árvore madeireira e de paisagismo, por possuir floração abundante que toma toda a copa (GEMAQUE et al., 2002; TUROLLA:NACISMENTO, 2006). Destaca-se ainda por suas diversas propriedades anticancerígenas, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma e antiulcerogênica (OLIVEIRA et al., 1990; FERREIRA et al., 2010, DA SILVA et al, 2012).

O lapachol, uma naftoquinona, foi isolado pela primeira vez de *T. avellanedae* em 1882, e desde então diversos estudos têm investigado suas atividades biológicas, principalmente contra diversas linhagens de câncer (NEPOMUCENO, 2011; Da SILVA JUNIOR, 2019; EYONG et a., 2020). Um estudo realizado por Badu et al. (2018) descreveu que o lapachol pode interromper o ciclo de reprodução de células tumorais.

Dentre seus derivados, a β -lapachona, facilmente obtida a partir da sua oxidação, tem ganhado destaque por atuar na topoisomerase I promovendo a recuperação da capacidade de apoptose celular (FERREIRA, 2010). Dias et al. (2018) relataram que a β -lapachona e seus derivados foram capazes de suprimir o crescimento de tumor *in vivo*, demonstrando seu potencial como novos candidatos a fármacos antitumorais.

A modelagem molecular de novos fármacos, atribuição da química medicinal, envolve a identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (SANTOS et al., 2019; GUIDO, 2010). Dentro deste contexto, foram desenvolvidos programas capazes de calcular a afinidade de ligações com velocidade e precisão, fornecendo recursos de construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos.

A docagem, ancoramento ou *docking* molecular é um dos principais métodos de planejamento baseado na estrutura do receptor. Esta técnica baseia-se na predição da conformação entre um ligante e uma macromolécula (enzima, receptor, DNA ou RNA), seguida da avaliação e classificação do modo de ligação (SMITH:MEILER, 2020; GUIDO, 2008).

As enzimas são alvos moleculares de suma importância no planejamento de fármacos, em função do seu papel em diversas patologias, podendo ainda serem facilmente obtidas e adequadas a ensaios biológicos (GARCIA 2015,

BILOTTA et al., 2018). Com os avanços na pesquisa do melanoma, foi possível entender melhor o papel das enzimas e das mutações que ocorrem principalmente nos genes BRAF e a presença das metaloproteinases (MMPs) em relação ao avanço da doença. Dada a presença destas enzimas em células de melanoma, é interessante buscar novos inibidores específicos para estes genes (BAETA, 2019).

Diante das evidências do potencial biológico do lapachol e das informações conhecidas sobre a bioquímica dos melanomas, o objetivo deste estudo foi obter novas moléculas planejadas por meio de técnicas de ancoragem molecular e avaliação de perfil farmacocinético e toxicológico *in silico*, sendo as mais promissoras sintetizadas e avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico contra células de melanoma, gerando, portanto, *hits* antimelanoma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter derivados de lapachol/ β -lapachona com atividade antimelanoma.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar pesquisa bibliográfica derivados de lapachol/ β -lapachona com atividade biológica contra linhagens de câncer humano;
- Realizar do *docking* molecular entre os derivados e os alvos terapêuticos selecionados;
- Predizer os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos das moléculas selecionadas;
- Sintetizar e caracterizar as estruturas dos derivados de β -lapachona com potencial antimelanoma indicados pela análise *in silico*;
- Avaliar seu potencial citotóxico e genotóxico sobre células humanas normais e neoplásicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Câncer

A manutenção da vida se dá por meio do crescimento celular, através do processo de mitose, gerando duas células-filhas idênticas, dando sequência ao ciclo celular. Uma série de eventos extracelulares devem acontecer para que a divisão ocorra, tais como fatores de crescimento, entre eles o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Este sistema sofre regulação e pode ser interrompido quando as condições não são favoráveis, gerando assim células defeituosas (MARTÍNEZ-REYES:CHANDEL, 2021; ABBAS et al., 2015).

Dessa forma, há grande probabilidade do surgimento de uma neoplasia quando ocorre uma alteração do ciclo celular. A partir disso, o câncer se dá pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. O câncer corresponde a um conjunto de mais de 100 doenças, e os diferentes tipos se dão de acordo com a célula do corpo acometida, podendo atingir tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ou tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem. Podem ainda diferenciar-se em relação a velocidade de multiplicação e invasão dos tecidos e órgãos, estabelecendo a metástase (INCA, 2019).

Sabe-se que o câncer é um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, e esses índices só vem aumentando. Para o triênio 2020 – 2022, estima-se um aumento do número de casos no Brasil. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (WHO, 2020). Os tipos de câncer mais frequentes em homens são de próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figuram entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (DALLOULF et al., 2020).

As taxas de incidências de morbidade e mortalidade são importantes aliados para medidas de controle para a vigilância epidemiológica, possibilitando analisar a ocorrência, a distribuição e a evolução das doenças. Assim, permitem

adotar medidas de controle, prevenção e tratamento e as bases para ações de vigilância do câncer, componente estratégico para o planejamento eficiente e efetivo dos programas de prevenção e controle de câncer no Brasil. O quadro 1 mostra as taxas de mortalidade pelo instituto nacional de câncer no ano de 2020.

Quadro 1. Mortalidade conforme a localização primária do tumor e sexo no Brasil 2020.

| EM HOMENS, BRASIL, 2020 | | | EM MULHERES, BRASIL, 2020 | | |
|---------------------------------------|--------------------|--------------|---------------------------------------|--------------------|--------------|
| Localização Primária | Casos Novos | % | Localização Primária | Casos Novos | % |
| Traqueia, Brônquios e Pulmões | 16.009 | 13,6 | Mama | 17.825 | 16,5 |
| Próstata | 15.841 | 13,5 | Traqueia, Brônquios e Pulmões | 12.609 | 11,6 |
| Cólon e Reto | 9.889 | 8,4 | Cólon e Reto | 10.356 | 9,6 |
| Estômago | 8.772 | 7,5 | Colo do útero | 6.627 | 6,1 |
| Esôfago | 6.465 | 5,5 | Pâncreas | 6.011 | 5,5 |
| Fígado e Vias biliares intrahepáticas | 6.093 | 5,2 | Estômago | 5.078 | 4,7 |
| Pâncreas | 5.882 | 5,0 | Fígado e Vias biliares intrahepáticas | 4.670 | 4,3 |
| Sistema Nervoso Central | 4.787 | 4,1 | Sistema Nervoso Central | 4.567 | 4,2 |
| Cavidade oral | 4.767 | 4,1 | Ovário | 3.921 | 3,6 |
| Laringe | 3.896 | 3,3 | Leucemias | 3.035 | 2,8 |
| Todas as neoplasias | 117.512 | 100,0 | Todas as neoplasias | 108.318 | 100,0 |

Fonte: Adaptado INCA, 2020.

As alterações ocorrentes no câncer estão relacionadas a proliferação, diferenciação e morte celular, a partir de mutações gênicas, instabilidade cromossômica e alterações epigenéticas. Diversos fatores de riscos podem estar associados, principalmente fatores ambientais (80%) e agentes xenobióticos, ou induzidos por fatores endógenos, como danos oxidativos, erros na replicação do DNA ou fatores hereditários (DALLOULF et al., 2020; ALMEIDA et al., 2015).

As neoplasias são resultantes de mutações, ampliações ou ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e genes envolvidos em mecanismos de reparo do DNA. Esses genes são responsáveis pela divisão, apoptose e diferenciação celular, e podem determinar a malignidade e poder

metastático do tumor. (RANG et al., 2001; TYSNES & BJERKVIG, 2007; TANAKA et al., 2013).

A instabilidade genômica e o estado inflamatório determinam as características em que as células malignas se desenvolvem no decorrer do processo de formação do tumor, sendo elas: autossuficiência em sinais de crescimento, redução dos fatores supressores de crescimento, resistência à morte celular por apoptose, potencial replicativo (imortalidade), indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

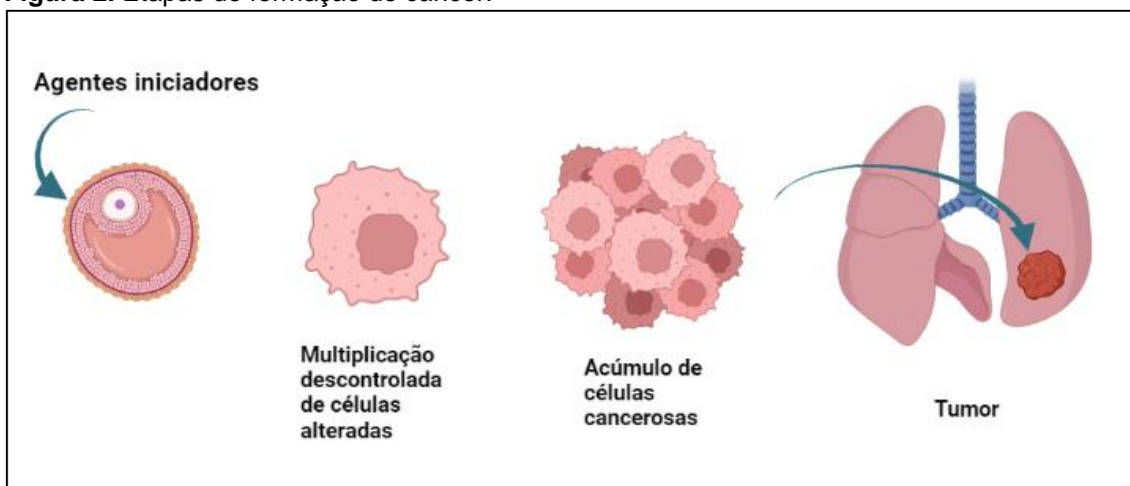
Figura 1. Características da formação de melanoma cutâneo.



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

A formação do câncer é um processo lento, podendo levar anos até a identificação de um tumor. Esse processo é denominado carcinogênese ou oncogênese, e seus efeitos ocorrem em três estágios: estágio de iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células sofrem alterações genéticas, porém ainda não detectáveis clinicamente, transformando-as em células mutadas. No estágio de promoção, as células iniciadas são então transformadas em malignas gradualmente, ocorrendo uma lesão local e aumento do número de células. Já no estágio final o câncer se instala de forma descontrolada podendo surgir as primeiras manifestações clínicas (Figura 1) (MAURO et al., 2011; ZIECH et al., 2012; TANAKA et al., 2013).

Figura 2. Etapas de formação do câncer.



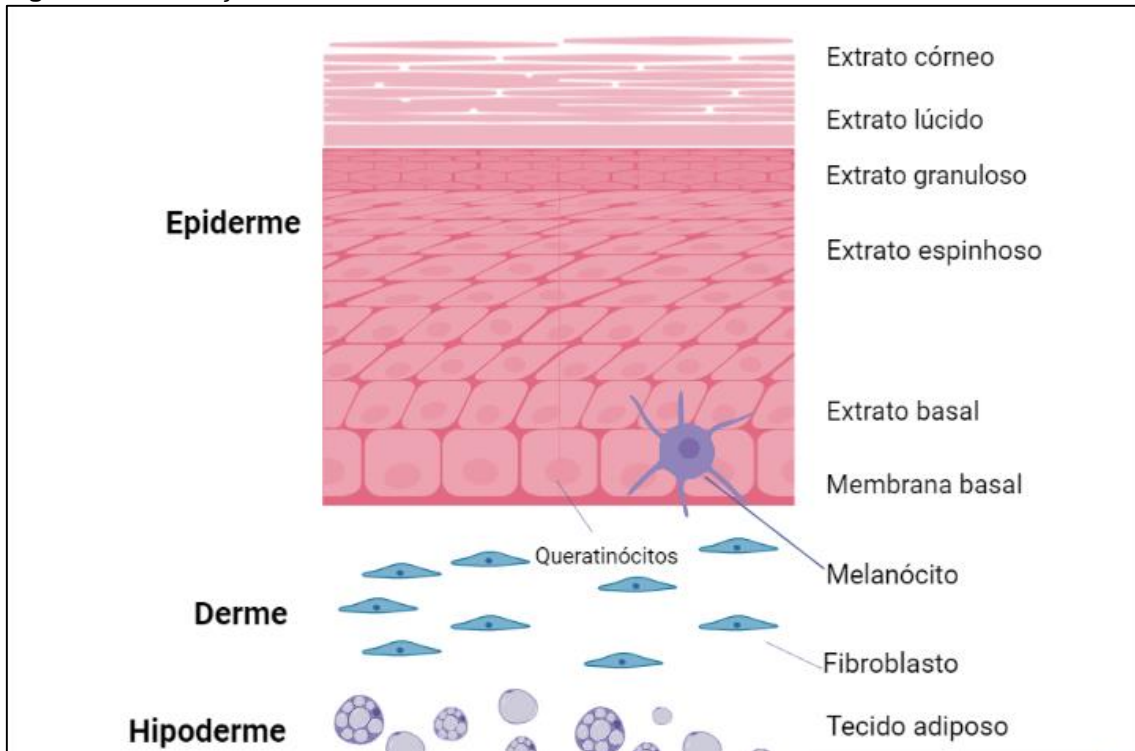
Fonte: adaptado INCA, 2020.

3.2. Melanoma

O câncer de pele é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada no mundo em ambos os sexos (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018). Com maior prevalência em pessoas de pele clara, está dividido primariamente em dois tipos: não melanoma – subdividido em carcinoma de células escamosas; carcinoma basocelular – que são a maioria dos casos; e o câncer de pele melanoma. Embora o melanoma represente apenas 3% dos diagnósticos de cânceres de pele, é responsável pelo maior número de mortes, devido a sua alta capacidade metastática (DZWIERZYNSK, 2014; PAVRI et al., 2016). No Brasil, a estimativa de novos casos de melanoma para cada ano do triênio 2020/2022 é de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (INCA, 2021).

O melanoma surge a partir de alterações nos melanócitos, que são responsáveis pela pigmentação da pele. Os melanócitos habitam a junção dermoepidérmica ou camada basal, e estão dispostos entre cada 5-10 queratinócitos basais, podendo ainda conferir função de proteção contra radiações UV (Figura 4). Durante o processo de pigmentação, há a formação de peróxido de hidrogênio e de dopaquinona, os quais podem causar alterações no DNA e originar a carcinogênese (FRANK et al., 2001; CALIFANO; NANCE, 2009). (BROHEM et al., 2010).

Figura 3. Localização dos melanócitos na camada basal.



Fonte: adaptado de Brohem et al., 2010

Os fatores de risco para o surgimento de melanoma podem estar ligados a fatores extrínsecos tais como exposição excessiva a radiação UV, ou fatores intrínsecos como predisposição genética, coloração da pele (maior em peles claras), presença de nevos displásicos (atípicos), aumento no número de nevos típicos ou lesões pré-existentes na pele ou imunossupressão (GANDINI et al., 2005; GORANTLA: KIRKWOOD, 2014; PALUNCIC et al., 2016).

Uma alternativa para controle desta neoplasia é a prevenção e o diagnóstico precoce, o qual podem ocorrer através do uso regular de protetor solar, evitando a exposição solar excessiva e em horários inadequados e o bronzeamento artificial. Além disso, o autoexame é uma alternativa para prevenir e rastrear o surgimento de lesões características, fazendo-se necessário o conhecimento das formas clínicas apresentadas pelo melanoma (KASPER et al., 2017).

Pode-se suspeitar de melanoma a partir de lesões com as características ABCDE (Assimetria, Bordas irregulares, Cores variadas, Diâmetro maior que 6 mm e Evolução), podendo ocorrer em uma lesão pré-existente ou na pele saudável, em forma de tumores, nódulos, placas ou manchas escuras,

geralmente apresentando variação na coloração, assimetria e bordas, acompanhadas de coceira ou descamação (COCKERREL, 2012).

Inicialmente, as lesões têm características benignas e são pequenas, já na fase tardia são aderidas a derme e de caráter maligno. Segundo Eggermont et al. (2012), o melanoma está classificado em cinco tipos de acordo com seu perfil clínico e histológico, sendo eles: melanoma expansivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (LM), melanoma lentiginoso acral (MLA) e melanoma mucosa lentiginosa (MML).

Com a evolução da biologia molecular, o conhecimento e a importância dos marcadores moleculares no processo de formação do melanoma, auxiliam no diagnóstico e na busca por novas entidades que atuem na inibição destes genes de forma seletiva e eficaz. Foi a partir destas afirmativas, que dentre os diversos marcadores tumorais, foram escolhidos o gene BRAF e as metaloproteinases como alvos terapêuticos dos derivados de lapachol/ β -lapachona selecionados.

3.3. Gene BRAF

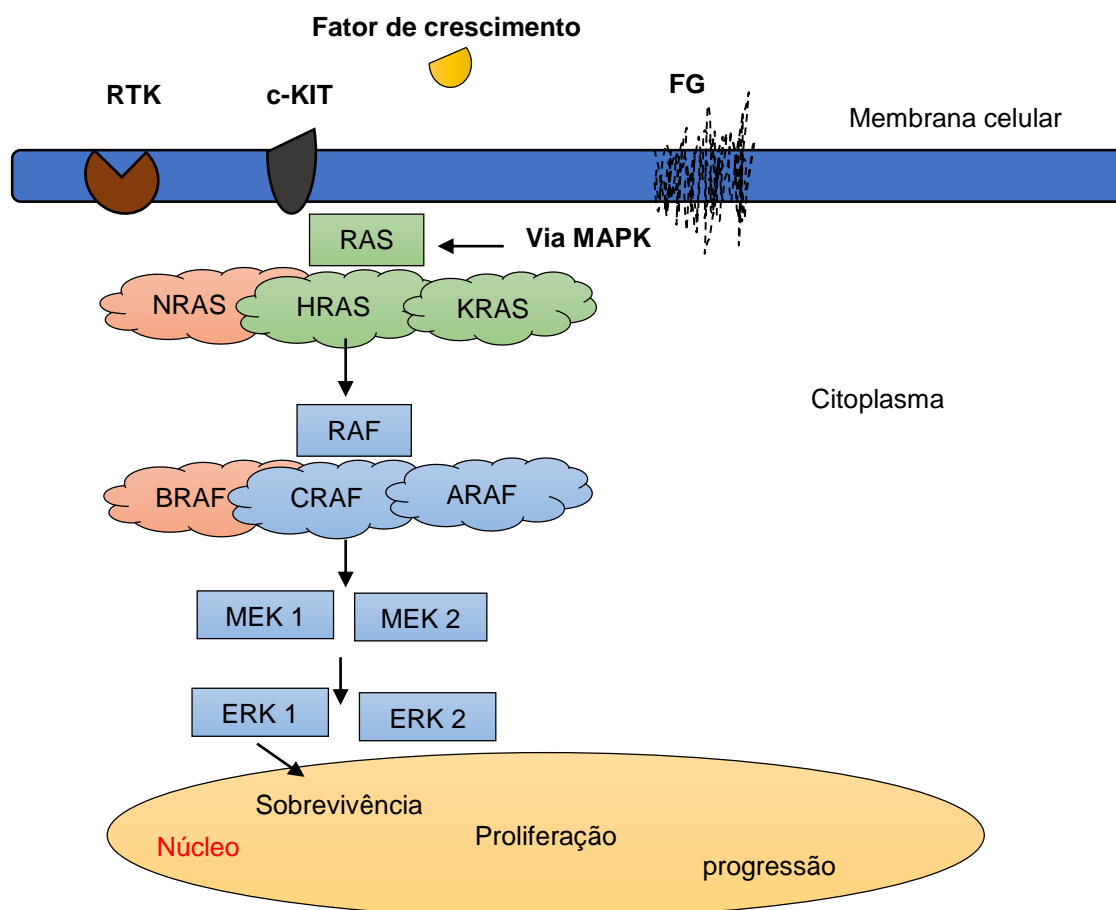
A transformação maligna dos melanócitos está relacionada a genes que regulam o metabolismo do ciclo celular que, por consequência, geram células capazes de manter a progressão do tumor (PALMIERI et al., 2009; PALUNCIC et al., 2016). Diversos genes já foram descritos na formação do melanoma cutâneo (MC), e dentre eles o mais frequentemente encontrado é o gene BRAF (40-70%), que é um proto-oncogene localizado no cromossomo 7q34, responsável pela proliferação celular (CURTIN et al., 2005). Entre as principais mutações encontradas, 40-50% são do tipo *missense*, que envolve a troca do aminoácido valina por um glutamato na proteína (V600E), dando origem ao BRAF^{V600E} (DAVIES et al., 2002). Outras mutações que ocorrem em menor frequência são BRAF^{V600K} e BRAF^{V600R}.

Encontrado no citoplasma celular, o gene BRAF possui 3 isoformas (ARAF, BRAF e CRAF), estando relacionado a superativação da via MARK (via de proteínas quinase ativadas por mitógeno), sendo os componentes principais da via a proteína RAS (Figura 5). No melanoma, a presença da mutação V600E desestabiliza a conformação da proteína quinase serina/treonina (BRAF) inativa para a forma ativa, levando a atividade da proteína sem a necessidade de

ativação pelo RAS, o que resulta no aumento do poder de proliferação celular do melanoma (AVILÉS:LÁZARO, 2006; LONG et al., 2012).

A proteína BRAF se tornou um alvo para terapias devido à grande incidência de mutação destes genes. Baseado nisso, evidencia-se a necessidade de busca por novos fármacos que atuem exclusivamente em células portadoras destas mutações. Através do planejamento adequado por meio da química medicinal, pode-se ter a diminuição de custos no desenvolvimento de novas terapias a partir da otimização de moléculas.

Figura 4. Via de sinalização MAPK.



Fonte: Adaptado de DHOMEN; MARAIS, 2009.

3.4. Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte do grupo das entopeptidases zinco-dependentes, responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais. As MPs foram relatadas pela

primeira vez por Gross e Lapierre em 1962 e, desde então, inúmeros estudos vêm sendo realizados sobre a atividade destas enzimas (FREDERICK, 2002; ARRANZ et al., 2004; NAVARRO et al., 2006).

Atualmente, quase 30 tipos de MMPs já foram identificadas (Quadro 2) (CARPENA et al., 2008, MANNELLO:MEDDA, 2012). As MMPs são encontradas na membrana e na superfície celular, sendo capazes de degradar macromoléculas como o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e a proteoglicana (MURPHY, 1997). São secretadas na forma de proenzimas inativas, podendo ser ativadas por proteinases como tripsina plasmina, furina ou outras MMPs, no ambiente pericelular. Podem também ser ativadas por agentes químicos por meio de reações *in vitro* (GEURTS et al., 2011).

Na presença de citocinas, as MMPs são liberadas no meio extracelular, sendo produzidas principalmente por leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais. Apresentam estrutura complexa que, apesar de similares entre si, atuam de forma específica ao substrato, e na presença de diferentes tipos de células, formam diferentes complementos de MMPs (GEURTS et al., 2011).

Todas as MMPs são metal-dependentes por conterem íons Zn^{+2} no sítio de ação catalítica e requererem íons Ca^{+2} para sua estabilidade e atividade. Apenas o Zn^{+2} permanece ligado ao sítio ativo da enzima, que por sua vez é coordenado por uma molécula de água que também é importante para a atividade catalítica (GEURTS et al., 2011; MANNELLO:MEDDA, 2012). Sua atividade é regulada por quatro vias: 1) por regulação na transcrição nos genes das MMPs; 2) por ativação de precursores; 3) por diferenças de especificidade de substrato; e 4) por inibidores de MMPs.

Dentre os inibidores endógenos, os principais são os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Os TIMPs possuem outras atividades biológicas independentes da inibição de MMPs, como, por exemplo, promoção da proliferação celular, atividade antiangiogênica, pró e antiapoptótica (NAGASE et al., 2006; BREW:NAGASE, 2010).

Quadro 2. Classificação das Metaloproteinases de Matriz

| MMP | NOME DESCRITIVO | PRINCIPAIS SUBSTRATOS |
|---------------|------------------------------|--|
| MMP-1 | Colagenase intersticial | Colágenos I, II, III |
| MMP-2 | Gelatinase A | Colágenos IV e V, elastina, fibronectina, gelatina |
| MMP-3 | Estromelisina-1 | Colágeno IV, pró-colágeno I, laminina |
| MMP-7 | Matrilisina | Caseína, colágeno IV, elastina, fibronectina, |
| MMP-8 | Colagenase-2 | Colágeno I, fibrinogênio, neutrófilo C, gelatina |
| MMP-9 | Gelatinase B | Colágenos IV e V, elastina, gelatina I |
| MMP-10 | Estromelisina-2 | Caseína, gelatina |
| MMP-11 | Estromelisina-3 | Ainda não conhecido |
| MMP-12 | Metaloelastase de macrófago | Fibrinogênio, fator XII |
| MMP-13 | Colagenase-3 | Colágenos I, II e III, fibrinogênio, gelatina, fator XII |
| MMP-14 | Transmembrana-1 | Colágenos I, II e III, caseína, fibronectina, fibrinogênio, gelatina |
| MMP-15 | Transmembrana-2 | Fibronectina, laminina |
| MMP-16 | Transmembrana-3 | Pro-MMP-2 |
| MMP-17 | Transmembrana-4 | Fibrina, fibrinogênio, gelatina |
| MMP-18 | ----- | Ainda não conhecido |
| MMP-19 | ----- | Caseína, colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatina, laminina |
| MMP-20 | Enamelisina | Amelogenina |
| MMP-21 | ----- | Ainda não conhecido |
| MMP-23 | ----- | Ainda não conhecido |
| MMP-24 | Transmembrana-5 | Gelatina |
| MMP-25 | Transmembrana-6, Leucolisina | Colágeno IV, fibrina, fibronectina, gelatina |
| MMP-26 | Endometase, Matrilisina-2 | Colágeno IV, fibrinogênio, fibronectina, gelatina I |
| MMP-28 | Epilisina | Caseína |

Fonte: Adaptado de Rydlova et al., 2008.

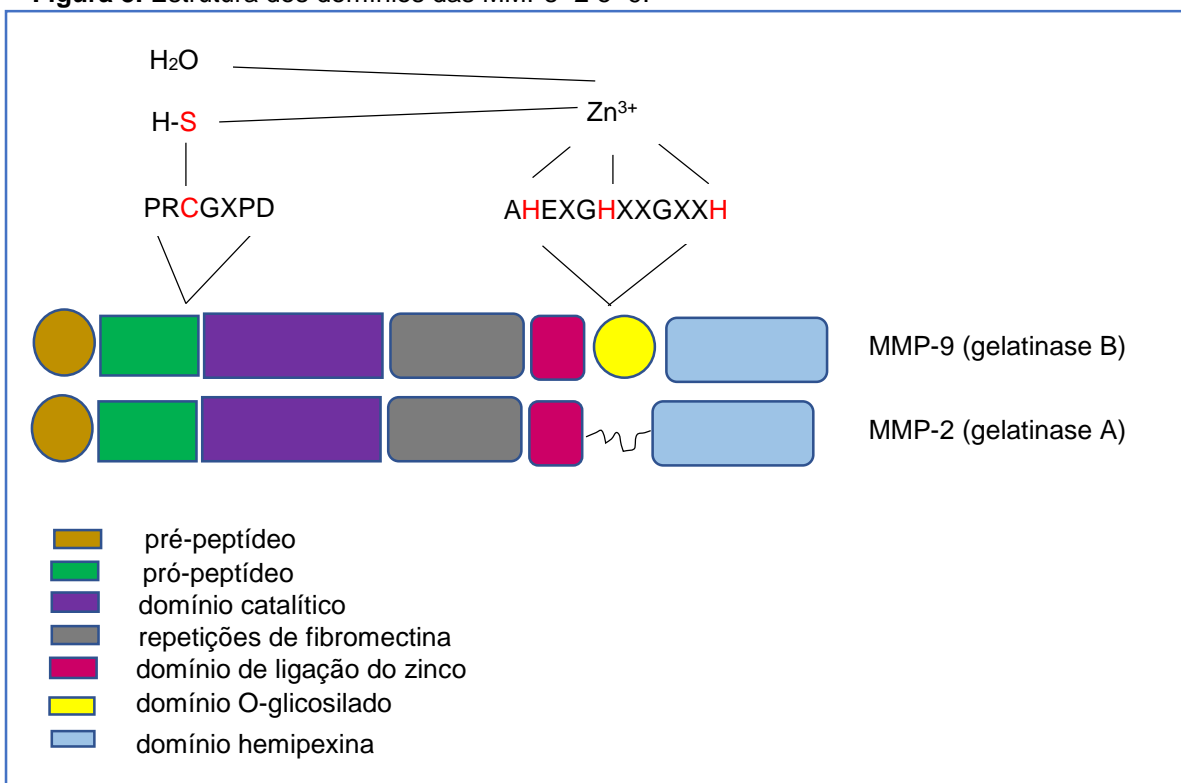
Em geral, Os TIMPs estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos do corpo, entretanto, variam muito na forma da distribuição, sendo que os TIMPs 1 e 3 são regulados por vários fatores de crescimento, citocinas, retinóides e glicocorticóides, e o TIMP-2 é constitucional nos tecidos (CARPENA et al., 2008). Os TIMPs se ligam às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-enzima. Essa interação é relativamente específica, sendo que TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 se ligam à MMP-2, e TIMP-1 e TIMP-3 a MMP-9. Uma vez que essa interação não envolve a porção N-terminal do TIMP, o complexo TIMP-MMP ainda é capaz de interagir com uma segunda proteína, como, por exemplo, as metaloproteinases transmembrana (MANNELLO:MEDDA, 2012).

3.4.1. MMPs -2 e -9: estrutura e atuação no melanoma

Por apresentarem estrutura semelhante, as MMPs -2 e -9 serão descritas em conjunto. Pertencentes ao grupo das gelatinases, se diferenciam dos outros grupos por possuir um domínio adicional semelhante à fibronectina, que é responsável pela ligação dessas enzimas ao colágeno desnaturado e à gelatina. Além disso, a MMP-9 possui ainda um domínio O-glicosilado que confere flexibilidade à sua estrutura, permitindo movimentos independentes que facilitam a interação dos substratos com o sítio ativo (MANNELLO:MEDDA, 2012).

Essa família de proteínas compartilha a mesma topologia estrutural, com pré e pós-domínios, seguidos de um domínio catalítico. O pré-domínio NH₂-terminal é uma pequena porção hidrofóbica que direciona a síntese dessas proteínas para o retículo endoplasmático e a secreção para o espaço extracelular. O pró-domínio, localizado após o pré-domínio e com aproximadamente 80 aminoácidos, mantém a enzima em sua forma inativa. O domínio catalítico, por sua vez, possui um íon zinco (Zn²⁺) ligado ao sítio ativo e essa ligação é feita por três resíduos conservados de histidina na sequência AH₆EXGHXXGXXH (Figura 6) (Geurts et al., 2011).

Figura 5. Estrutura dos domínios das MMPs -2 e -9.



Fonte: adaptado de Gusmão, 2013.

Apesar de apresentarem importantes papéis em processos biológicos, quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs, o processo fisiológico passa a ser patológico, desencadeando diversas doenças como câncer, artrites, inflamação, diabetes, e doenças cardiovasculares (KUPAI et al., 2010).

Vários estudos têm relacionado o papel da MMPs, incluindo -2 e -9, no processo fisiopatológicos de neoplasias. As MMPs estão presentes de várias formas na evolução de tumores, tanto na fase precoce da tumorigênese quanto em estágios tardios do câncer (DERYUGINA, 2006). Vaisanem et al. (1998), demonstram a expressão de MMP-2 em lesões de melanoma de 55 pacientes. Hofmann et al. em 1999 comprovaram o aumento da expressão de MMP-2 na progressão do melanoma.

Inicialmente, a MMP-2 é secretada na forma inativa, sendo posteriormente ativada pelo complexo TIMP-2/MT1-MMP para então ser posicionada na superfície da célula melanoma, degradando a MEC e invadindo o sistema vascular. Para que estas células atinjam os vasos sanguíneos são necessários fatores de polarização tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o Fator estimulante de colônias de macrófagos (CSF-1) (HOFMANN et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram a expressão das MMP-9 em fases primárias do melanoma. São ativadas por CD44 ou por heterodímeros $\alpha_v \beta_5$ ou $\alpha_5 \beta_1$ das integrinas. Sua atividade na angiogênese tumoral se dá pela ação de inibidores endógenos como a angiostatina, tumstatina e endostatina e por recrutamento de pericídios, além de apresentar atividade anti-apoptótica *in vitro* (MEYER et al., 2005).

Os estudos sobre as metaloproteinases pode auxiliar no desenvolvimento e evolução de novas estratégias no tratamento e prevenção de melanoma, uma vez que podem proporcionar a produção de novos inibidores que atuem de forma mais efetiva e específica. Dessa forma, todos os aspectos descritos aqui, reforçam a necessidade de maiores informações sobre a interação MMPs/Melanoma/inibidor.

3.5. Tratamento do melanoma e inibidores enzimáticos

A conduta para o tratamento do melanoma baseia-se na excisão do tumor primário e todo o tecido circundante para evitar a recorrência local, até a fáscia

e uma margem de pele normal entre 0,5 e 2 cm de diâmetro em torno da lesão. Este procedimento deve ser preferencial quando em lesões pequenas (DIMATOS. 2009).

O MC acaba se disseminando de forma rápida pelas vias linfáticas, sendo os linfonodos locais os principais sítios de metástase. Nesse caso, a única maneira de controle é a retirada destes linfonodos (WAGNER et al., 2000). Em lesões maiores, o recomendado é a realização de biopsia para decisão da melhor conduta de tratamento. Geralmente, estas práticas estão associadas a quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal (STUCKY et al., 2010; DAVEY et al., 2015).

A quimioterapia consiste no uso de substâncias que afetam o funcionamento celular, e é indicada em estágios avançados de melanomas. Com o surgimento de novas terapias, seu uso deixou de ser indicado prioritariamente, uma vez que seus efeitos colaterais causam danos não somente às células doentes, mas também às células saudáveis. Exemplos de quimioterápico é a Dacarbazina, a Carboplatina e o Paclitaxel, que atuam como complemento à remoção cirúrgica (FLAHERTY et al 2013; XU et al 2020).

O desenvolvimento de novos modelos terapêuticos proporcionou a aplicação de terapias que atuem de forma mais específica, como exemplo, “mutações motoristas” oncogênicas e imunoterapias. A imunoterapia envolve a utilização de citocinas, vacinas e anticorpos direcionados com potenciais promissores (DAVEY et al., 2015).

Até hoje, as terapias usadas no tratamento do melanoma não aumentam a expectativa de vida do paciente metastático. Contudo, a constante descoberta das vias de sinalização vem proporcionando novos alvos terapêuticos. Os componentes responsáveis pela ativação das vias RAS/RAF/MEK/ERK são os principais alvos na busca de tratamentos promissores para MC (TREISMAN:GARLIE, 2010).

O primeiro fármaco seletivo desenvolvido para melanoma é o Vemurafenibe, que atua exclusivamente em células portadoras da mutação BRAF V600E, ocasionando a apoptose, parada do ciclo celular e da proliferação. Pode ser citado também o *Trametinibe*, que é um inibidor MEK e melhora a inibição da sinalização MAPK (CURTIEGGERMONT; ROBERT, 2012; WANG, 2013; ASHWORTH:DAUD, 2014; KAINTHLA et al., 2014).

Neste contexto, as MMPs também têm sido alvo na terapia de controle do melanoma metastático. Hofmann et al. (2005) destacaram o efeito de Batimastate e Marimastate como inibidores de MMPs.

Apesar das inúmeras terapias como alternativa do tratamento do melanoma, pode-se afirmar que em nenhuma delas é totalmente eficaz no processo de cura ou prolongamento do prognóstico em pacientes metastáticos, isso se dá devido ao alto poder invasor desta neoplasia, o que reafirma a necessidade da busca por novas terapias promissoras.

Os produtos naturais têm sido cada vez mais objeto de pesquisa no desenvolvimento de novas entidades terapêuticas. Com o auxílio e avanço da química computacional, a identificação e otimização de substâncias de origem vegetal tornou-se uma alternativa na pesquisa de compostos com potencial atividade antitumoral.

3.6. Naftoquinonas

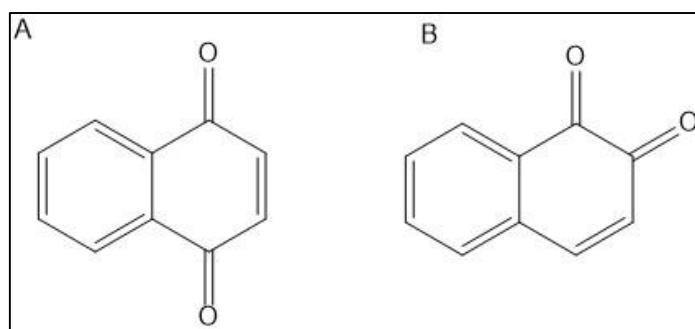
O uso de plantas medicinais na descoberta de novos tratamentos anticâncer só vem aumentando com o passar do tempo, (MANZANO et al., 2020). Em espécies bioativas, a variedade dos constituintes e sua complexidade estrutural formam um leque de possibilidades na investigação de novas entidades farmacológicas (FERREIRA:PIRES, 2022; MONTANARI:BOLZANI, 2001).

Dentre as plantas de grande interesse, a família Bignoniaceae apresenta cerca de 110 gêneros e aproximadamente 800 espécies distribuídas predominantemente em regiões tropicais (SOUZA:LORENZI, 2012). Diversos estudos demonstram sua relevância por apresentar diversas substâncias bioativas e atividades farmacológicas importantes (VENÂNCIO:SILVA, 2020).

Sua bioatividade se dá pela presença de naftoquinonas, xantonas e vários flavonoides que atuam como agentes antimaláricos, antitumorais, antivirais, contra infecções e cicatrizantes de feridas. As naftoquinonas destacam-se como objetos de interesse em muitas pesquisas, por possuir potente atividade antitumoral, antiparasitária, leishmanicida, tripanocida, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (JORDÃO et al., 2013; ELAVARASAN; GOPALAKRISHNAN, 2014).

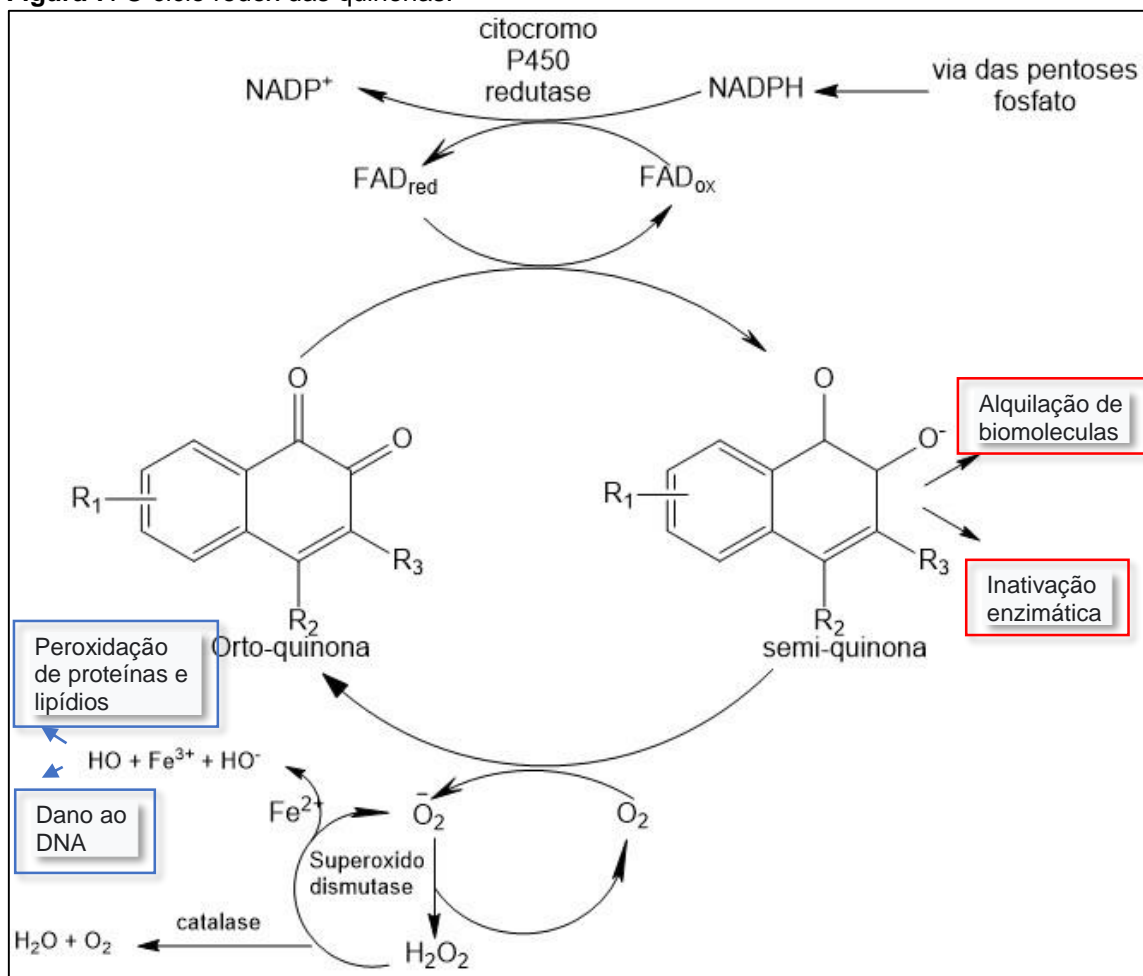
Em relação a estrutura, compõem um grupo de compostos dicetônicos com um esqueleto básico aromático derivado do naftaleno, que se destaca por apresentar dois grupos carbonila na posição 1 e 4, por isso a denominação de 1,4-naftoquinonas. Os grupos carbonila também podem estar presente na posição 1 e 2, porém, com menor incidência (Figura 7) (LÓPEZ, 2014). Podem ainda ser classificadas de acordo com sua estrutura em prenaftoquinonas, furanaftoquinonas, difuronaftoquinonas e piranaftoquinonas (DA SILVA et al., 2012).

Figura 6. Estrutura química de 1,4-naftoquinona (A) e 1,2-naftoquinona (B).



Parte do seu mecanismo envolve a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (HO^\bullet) induzidas pela biorredução do complexo quinônico, resultando no estresse oxidativo das células ou induzindo a apoptose por inibição do complexo das topoisomerasas, em que as células perdem a habilidade de reparo, determinando o potencial desses compostos em causar danos ao DNA (Figura 8) (SILVA, 2021; CAMPOS et al., 2012; SUNASSEE et al., 2013). Doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona e mitomicina são exemplos de fármacos anticâncer que contém a porção quinona (CAMPOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; MALLAVADHANI et al., 2014).

Figura 7. O ciclo redox das quinonas.



Fonte: adaptado de Da Silva Junior et al, 2019.

3.7. Lapachol

Entre as naftoquinonas destaca-se o lapachol (LP), por suas diversas atividades farmacológicas comprovadas. Foi primeiramente isolado por E. Parterno em 1882, a partir da casca da árvore de *T. avellanae* (Figura 9), uma Bignoniaceae conhecida no Brasil como Ipê-roxo. Posteriormente, também pôde ser isolada de espécies de Verbenaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae (EPIFANO et al., 2014; FIGUEREDO et al., 2020).

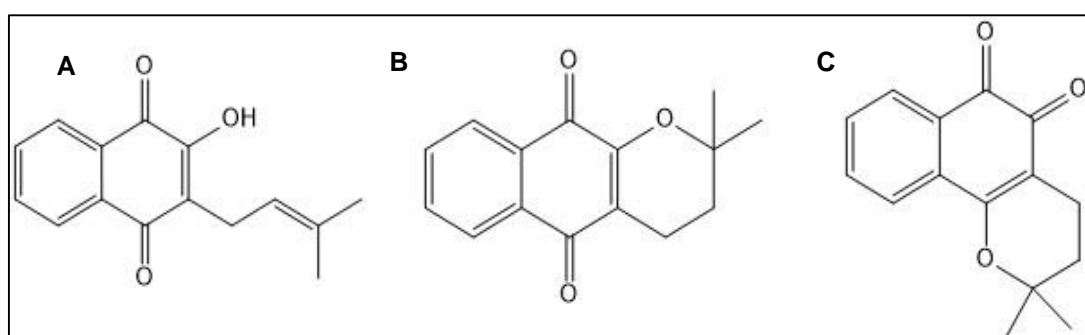
Apresenta coloração amarela com baixa solubilidade em água, sendo solúvel em solventes orgânicos. A estrutura molecular é 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil) -1,4-natoquinona, onde na presença de um sal confere coloração vermelha (LOPES, 2020).

Figura 8. *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb.



As principais atividade farmacológicas associadas com o Lapachol, α -lapachona e β -lapachona são: antiúlcera, leishmanicida, anti-inflamatória, antimalárica, antisséptica, antitumoral, antiviral, bactericida, fungicida, pesticida e outras (HUSSAIN et al., 2007; MAEDA et al., 2008; PINTO e CASTRO, 2009; SILVA et al., 2012).

Figura 9. Estrutura química de lapachol (A), α -lapachona (B) e β -lapachona (C).

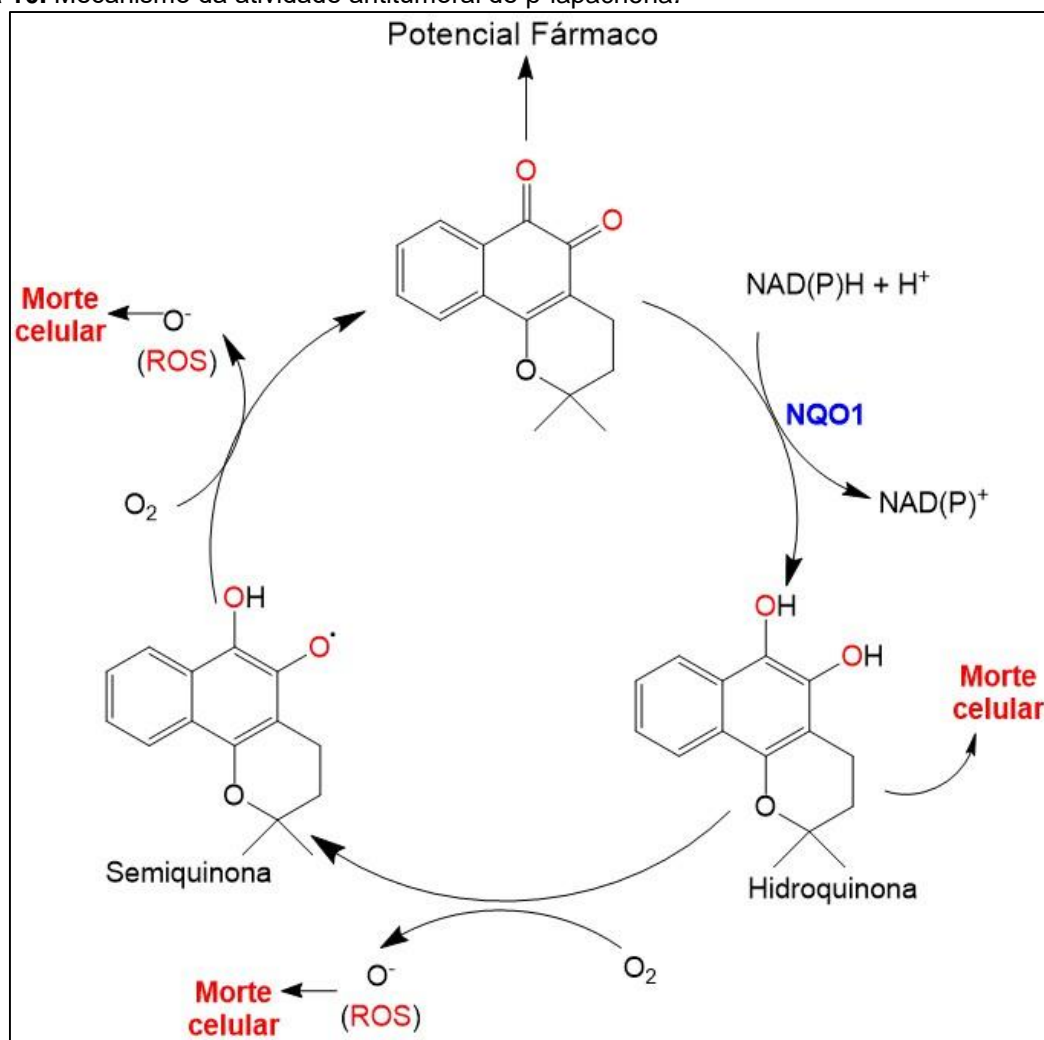


A β -lapachona se destaca por seu potencial biológico e é um alvo promissor para a síntese de novas moléculas bioativas. Demonstra citotoxicidade em relação a uma variedade de linhagens de câncer humano, que geralmente são mais suscetíveis que as células normais a danos oxidativos associados por espécies reativas de oxigênio. A β -lapachona passa por um ciclo

redox mediado pela enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) para aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). Em alguns tipos de câncer a expressão elevada de NQO1 consegue destruir células cancerígenas (Figura 11) (PARDEE, 2002; PINK et al., 2009; TRACHOOTHAM et al., 2009; HUANG et al., 2013; FERREIRA et al., 2016; GERBER, 2018).

Em condições fisiológicas, o NQO1 é atuante na regulação da síntese de melanina por supressão da degradação da tirosinase em melanócitos (DA SILVA et al., 2003; FERREIRA et al., 2010; KEE et al., 2017; HUSSAIN et al., 2017, ARAKAWA et al., 2018).

Figura 10. Mecanismo da atividade antitumoral de β -lapachona.



Fonte: Da Silva Júnior et al, 2019.

Da Silva Junior e colaboradores (2019) apresentaram diversos estudos da atividade antineoplásica de LP em diversas linhagens de câncer. Um estudo

demonstrou que lapachol na concentração de 0,783 μ m apresentou atividade significativa em linhagem de câncer de mama humano A549 (OLIVEIRA et al. 2002).

Outro estudo avaliou a atividade citotóxica de derivados do lapachol, α e β -lapachona em células de câncer esofágico (WHCO1) em que a maioria exibiram boa citotoxicidade (CI50 1.6e11.7 mM) em comparação com o fármaco de escolha atual cisplatina (CI50 $\frac{1}{4}$ 16.5 mM). Também foi observado que os compostos não foram tóxicos em células NIH3T3 de fibroblastos normais (SUNASSEE et al., 2013).

Em relação ao seu mecanismo, a β -lapachona diferencia-se de outros antineoplásicos por atuar na topoisomerase I promovendo a recuperação da capacidade de apoptose celular. Quando em associação com o Taxol®, além de sua combinação com outros tratamentos, como a aplicação de radiação ionizante, promove a inibição em diferentes pontos de replicação celular (CUNHA, 2005; FERREIRA et al., 2010).

Na presença de hidróxido de sódio, o LP forma um sal sódico que confere coloração vermelho brilhante, extremamente ativa como corante. O lapachol é facilmente isolado da serragem do ipê roxo seguindo um método de extração ácido-base que, após um processo de recristalização, permite sua obtenção em rendimentos razoáveis (FONSECA et al., 2003).

Diversos estudos vêm avaliando o perfil antineoplásico de derivados do lapachol, e as comprovações dessa atividade tornam essa molécula um potencial protótipo na síntese de novas estruturas otimizadas. Os modelos *in vitro* são os mais utilizados como método de triagem destas estruturas, porém uma nova perspectiva foi dada com o surgimento dos métodos de modelagem molecular por avaliação *in silico*, que permitem prever aspectos relacionados a afinidade e estabilidade de complexos entre enzima e ligante, além de nortear as etapas seguintes a partir de um planejamento adequado.

3.8. Planejamento racional de fármacos por ferramentas in silico

No século XIX, os extratos naturais usados na medicina tradicional passaram a ser refinados, isolando as estruturas bioativas presentes em sua composição. Este processo teve grande impacto na evolução da química medicinal, o que resultou no desenvolvimento dos primeiros fármacos sintéticos

em 1908 (HAO; ZHENG; WANG, 2014). Com a constante evolução da química medicinal, vários modelos de estudo foram criados a fim de otimizar a descoberta e conhecimento estrutural de moléculas. Em 1960, surgiu o método de QSAR (*quantitative structure-activity relationship*), que possibilitou analisar a relação estrutura-atividade entre moléculas (CAVASOTTO et al., 2019).

Foi então que os primeiros modelos de química computacional surgiram para o aperfeiçoamento da descoberta e elucidação das propriedades de uma biomacromolécula. Assim, foi criado em 1990 os primeiros bancos de dados de proteínas (Uniprot e *protein data bank*- PDB), além de métodos em modelagem molecular e bioinformática (SULIMOV et al., 2019; PAGADALA et al., 2017).

A descoberta de um novo fármaco baseia-se na determinação da estrutura química e suas propriedades físico-químicas, além da determinação da atividade terapêutica e da relação da estrutura-atividade. Nesse contexto, uma das estratégias no planejamento racional de medicamentos fundamenta-se na otimização de modelos protótipos, com o intuito de aprimorar sua potência, afinidade e seletividade. Este processo aproxima diversas especialidades tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras, configurando seu caráter multidisciplinar (AUCAR & CAVASOTTO, 2020; EYRILMEZ, et al, 2019; GAIEB et al., 2018; VIDAL-LIMON et al., 2022; GUIDO et al., 2008).

O planejamento de novas moléculas bioativas pode ser longo e de alto custo, o que gera a necessidade de inovações que possibilitem melhor custo-benefício. Nesse contexto, tem vantagens a modelagem molecular por métodos computacionais, que emprega programas capazes de prever a afinidade de uma macromolécula (enzima) e seu ligante, permitindo a otimização, aumento da potência e seletividade desse último (SANTOS et al., 2019; SMITH & MEILER, 2020).

Para a identificação e seleção das moléculas bioativas várias estratégias podem ser adotadas tais como a organização de bases padrões de dados, a aplicação de filtros moleculares, o emprego de triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS) e a *triagem virtual* (VS, do inglês, *virtual screening*). Além disso, técnicas de *planejamento baseado na estrutura do receptor* (SBDD), e de *planejamento baseado na estrutura do ligante* (LBDD) também são amplamente utilizadas (LU et al., 2020; ZHU et al., 2020). Dentre estes, a triagem virtual

permite selecionar de bases de dados de milhares de estruturas os compostos não promissores, eliminando-os antes mesmo de serem sintetizados (SHI; ZHA, 2019).

Após seleção do alvo molecular vários métodos podem ser empregados para analisar a interação entre ligante e receptor. O ancoramento molecular (*docking*) é capaz de determinar a interação do complexo formado (poses) e a afinidade entre a ligação (*scoring*). A validação do alvo selecionado é fundamental para estabelecer sua relevância e seletividade nos processos patológicos e sua capacidade de resposta farmacológica (CAVASOTTO: AUCAR, 2020; POUSTFOROOSH et al., 2022).

Os alvos utilizados no docking são macromoléculas obtidas por método de cristalografia de raio X, que atuam como receptores dos ligantes. Geralmente são enzimas que tiveram sua estrutura química tridimensional determinada por Ressonância Magnética Nuclear ou cristalografia de raios X. Esta última, a técnica mais comum, usa a radiação de diversas maneiras, como o espalhamento a baixos ângulos, a difração magnética e o estudo dos fenômenos ultrarrápidos, permitindo conhecer a estrutura de moléculas a nível atômico (SILVA, 2020).

A importância da validação do alvo molecular e método de modelagem é essencial para se determinar sua função no processo fisiopatológico e no impacto de sua modulação no tratamento e cura de doenças. Esta etapa determina ainda a precisão do teste, onde o ligante cocrystalizado à proteína é retirado e reinserido a estrutura cristalográfica (*redocking*). O RMSD, do inglês “Root Mean Square deviation”, é o valor médio para o desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y. Para serem considerados válidos os valores de RMSD entre a pose obtida pelo *docking* e pose original deve ser menor que 2,0 Å (LI et al., 2010; PLEWCZYNSKI et al., 2011; MURPHY et al, 2016, CHAPUT & MOUAWAD, 2017).

Estima-se que existam cerca de 30 programas capazes de realizar modelagem molecular, entre eles, DOCK, Gold, FlexX, Glide, Autodock, e Surflex-Dock, são amplamente utilizados (CHAPUT & MOUAWAD, 2017). Esses programas avaliam o modo de ligação e a afinidade do ligante pelo sítio, a qual é baseada em funções de pontuação: Campos de força; Forças empíricas; Funções baseadas no conhecimento (TORRES et al., 2019).

As análises por métodos computacionais, trabalham com a hipótese do “análogo ativo”, onde é possível investigar o conjunto de domínios funcionais, os tipos de interação, condições energéticas e previsões de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Precisa-se ainda conhecer os níveis toxicológicos das moléculas, para que se possa prever e planejar uma estratégia adequada na sua otimização (FERREIRA & ANDRICOPULO, 2019).

É de fundamental importância que desde as primeiras etapas do planejamento de um fármaco, haja a preocupação com a baixa toxicidade e alta especificidade dos *hits*. Por meio de ferramentas *in silico*, também é possível prever propriedades-chave, tais como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (*ADMET*), além da toxicidade das estruturas investigadas. Para tanto, as moléculas avaliadas por metodologia de docking podem ser analisadas em programas adicionais, tais PreADMET, Osiris (Property Explorer) e SwissADME (Institute of Bioinformatics) (Santos et al., 2018).