

Universidade Anhanguera de São Paulo
Diretoria de Pós-Graduação Stricto Sensu e Pesquisa
Mestrado em Biotecnologia e Inovação em Saúde

CÉLIA REGINA MARTINEZ FORTUNATO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN SÍLICO* DE NEOLIGNANAS
DE *NECTANDRA LEUCANTHA* (LAURACEAE) E ESTUDO *IN VITRO* DE SUA
ATIVIDADE ANTIMELANOMA.**

São Paulo
2021

CÉLIA REGINA MARTINEZ FORTUNATO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN SÍLICO* DE NEOLIGNANAS
DE *NECTANDRA LEUCANTHA* (LAURACEAE) E ESTUDO *IN VITRO* DE SUA
ATIVIDADE ANTIMELANOMA.

Dissertação apresentada como exigência
parcial à Banca Examinadora da
Universidade Anhanguera de São Paulo,
para obtenção do título de MESTRE em
Biotecnologia e Inovação em Saúde, sob a
orientação da Prof. Dra. Carolina
Gonçalves Passarelli.

São Paulo
2021

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação por processos de fotocopiadoras ou eletrônicos.

Fortunato, Célia Regina Martinez
F851i Isolamento, caracterização, avaliação *in silico* de neolignana de
Nectandra leucantha (Lauraceae) e estudo in vitro de sua atividade
antimelanoma / Célia Regina Martinez Fortunato. - São Paulo:
Universidade Anhanguera de São Paulo, 2021.
98 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (MESTRADO) – Programa de Mestrado em
Biotecnologia e Inovação em Saúde, Universidade Anhanguera
de São Paulo, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Passarelli Gonçalves

1. Biotecnologia. 2. Melanoma. 3. Neolignanas. 4. *Nectandra*
leucantha. 5. Docking molecular I. Gonçalves, Carolina Passarelli. II.
Universidade Anhanguera de São Paulo. III. Título.

CDD 574.87

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO IN SÍLICO DE NEOLIGNANAS DE
NECTANDRA LEUCANTHA (LAURACEAE) E ESTUDO IN VITRO DE SUA
ATIVIDADE ANTIMELANOMA.

Célia Regina Martinez Fortunato

Dissertação apresentada como exigência parcial para a obtenção do grau de título
de Mestre em Biotecnologia e Inovação em Saúde pela Universidade Anhanguera
de São Paulo.

Aprovada em 23/06/2021.

Banca Examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Passarelli Gonçalves – UNIAN/UNIDERP

Profa. Dra. Vânia Claudia Olivon – UNIDERP (Titular)

Prof. Dr. Kleber de Magalhães Galvão – FAM (Titular)

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Lucas e Vitória e meu esposo Luiz que nunca mediram esforços em me ajudar a alcançar os meus sonhos e objetivos, por serem os maiores incentivadores em todas as minhas escolhas, pelo amor, companheirismo e dedicação em todos os momentos.

Com enorme gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Carolina Passarelli Gonçalves que contribuiu com excelência e conhecimento em todas as fases deste trabalho. Agradeço também pelo incentivo e apoio nos momentos de decisão que impactaram meu estudo, mas principalmente pela amizade, disposição, companheirismo e interesse em estar comigo nesta jornada de trabalho.

Em especial a Prof. Dra. Simone Grecco pela amizade, generosidade, respeito, incentivo que fez com que todo o trabalho se tornasse prazeroso. Uma pessoa que vou guardar sempre em meu coração.

Aos colegas e amigos de laboratório, Milena, Kássia, Marta, Cleiton, pelo companheirismo, pelas risadas e pelo cafezinho.

Aos professores Dr.(s) Alejandra H. Gonzalez, Júlia Pezuk, José Agustín Quincoces e Carolina Gonçalves que sempre se mostraram dispostos a esclarecer qualquer dúvida e que me ensinaram preciosidades que levarei para toda a minha vida.

À agência de fomento CAPES, pelo auxílio financeiro, que propiciou a execução deste estudo.

À Universidade Anhanguera de São Paulo – UNIAN – campus Pirituba e aos coordenadores Prof. Dr. Márcio Luiz dos Santos e Prof. Dra. Regina Mara Silva Pereira que proporcionaram o uso dos laboratórios e das instalações da Universidade.

FORTUNATO, Célia Regina Martinez. Isolamento, caracterização, avaliação *in silico* de neolignanas de *Nectandra leucantha* (Lauraceae) e estudo *in vitro* de sua atividade antimelanoma. 2021. 98 fl. Dissertação de Mestrado (Programa Biotecnologia e Inovação em Saúde) - Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2021.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, sendo considerada a segunda principal causa de mortes no mundo. A evolução das taxas de incidência e de mortalidade sinalizam um contínuo crescimento desta doença para as próximas décadas. O melanoma é a neoplasia maligna dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, embora menos frequente, é considerado o mais agressivo e letal dentre os tumores cutâneos, devido à capacidade de invadir outros órgãos, criando metástases. O principal problema associado ao tratamento é a baixa taxa de resposta às terapêuticas existentes, que, por sua vez, se deve à resposta incompleta dos agentes quimioterápicos e à resistência inerente das células do melanoma maligno. Várias estratégias e combinações de fármacos anticâncer tem sido utilizadas no esforço de melhorar os efeitos terapêuticos para este tipo de neoplasia. Pesquisas e estudos destacam um potencial extraordinário voltado para a descoberta de novos compostos com atividade antitumoral em espécies de plantas brasileiras. Neste contexto, destaca-se o gênero *Nectandra*, uma árvore portadora de substâncias químicas que tem despertado grande interesse em pesquisadores, por conta de seu potencial farmacológico, podendo ser utilizada como protótipo para o desenvolvimento de fármacos ou tratamentos do melanoma maligno, atuando como uma importante ferramenta no combate ao câncer. Entretanto, estes compostos tem demonstrado uma baixa solubilidade em meios de cultura celulares, e por conta disso, neste estudo, foi realizado o isolamento de duas neolignanas ativas e posteriormente a preparação de seus derivados salinos sódicos, visando o aumento da hidrofilicidade, e consequentemente sua biodisponibilidade. Posteriormente, os derivados obtidos foram reavaliados quanto suas atividades frente à células tumorigênicas de melanoma. Os dados espectroscópicos e espectrométricos confirmaram a estrutura das neolignanas, bem como a formação de seus derivados sódicos, entretanto, quando avaliados por sua bioatividade, foi observada a perda de seu potencial nas células de melanoma. Ainda assim, para maior aprofundamento e conhecimento das características fisico-químicas, farmacocinéticas e conformacionais foram determinadas através de estudos *in silico* dos compostos isolados e dos derivados sódicos relacionando a estrutura com atividade biológica, assim obteve-se resultados importantes, como a influência da conformação para a obtenção de melhores resultados inibitórios mediante as células de melanoma humano A375. Concomitantemente, foi realizado um estudo de acoplamento molecular com o alvo BRAF-V600 relacionado ao melanoma, este procedimento computacional pôde prever a ligação de um receptor e uma molécula ligante de forma eficiente, com o objetivo de prever as conformações ligadas e a afinidade de ligação.

Palavras-chave: melanoma; neolignanas; *Nectandra*; *BRAF*; docking molecular.

FORTUNATO, Célia Regina Martinez. Isolation, characterization, in silico evaluation of neolignans from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and in vitro study of their antimelanoma activity. 2021. 98 pages. Master's Dissertation (Biotechnology and Innovation in Health Program) - Anhanguera Universidad of São Paulo, São Paulo, 2021.

ABSTRACT

Cancer is a worldwide public health problem it is considered the second leading cause of death in the world. The evolution of the incidence and mortality rates signals a continuous growth of this disease for the next decades. Melanoma is the malignant neoplasm of melanocytes, cells responsible to produce melanin, although less frequent, it is considered the most aggressive and lethal among cutaneous tumors, due to the ability to invade other organs, creating metastases. The main problem associated with treatment is the low response rate to existing therapies, which, in turn, is due to the incomplete response of chemotherapeutic agents and the inherent resistance of malignant melanoma cells. Various strategies and combinations of anticancer drugs have been used to improve the therapeutic effects for this type of neoplasia. Research and studies highlight an extraordinary potential aimed at the discovery of new compounds with antitumor activity in Brazilian plant species. In this context, the genus *Nectandra* stands out, a tree bearing chemical substances that has aroused great interest in researchers, due to its pharmacological potential, and can be used in new prototypes for the development of drugs / treatments for malignant melanoma, acting as an important tool in the fight against cancer. However, these compounds have demonstrated a low solubility in cell culture media, and because of this, in this study, the isolation of bioactive compounds and the preparation of their sodium saline derivatives was carried out, aiming at increasing hydrophilicity, and therefore bioavailability. Subsequently, the derivatives obtained were reassessed as to their activities against melanoma tumorigenic cells. The spectroscopic and spectrometric data confirmed the identification of neolignans, as well as the formation of god sodium salts, however, when evaluated for their bioactivity, the loss of their potential in melanoma was observed. Even so, for greater depth and knowledge of the physico-chemical, pharmacokinetic and conformational characteristics were determined through in silico studies of isolated compounds and sodium derivatives relating the structure to biological activity, thus important results were obtained, such as the influence of conformation to obtain better inhibitory results using A375 human melanoma cells. Concomitantly, a molecular coupling study was carried out with the BRAF-V600 target, which is related to melanoma, this computational procedure can efficiently predict the binding of a receptor and a binding molecule, with the objective of predicting the linked conformations and affinity binding.

Keywords: melanoma; neolignans; *Nectandra*; BRAF; molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre divisão em célula normal e cancerígena	22
Figura 2: Tipos mais importantes de câncer de pele	24
Figura 3: Representação de casos de melanoma ano 2020-2022	25
Figura 4: Melanoma superficial	27
Figura 5: Melanoma tipo nodular	27
Figura 6: Melanoma na unha e tipo acral	28
Figura 7: Melanoma tipo lentigo, e tipo amelanótico	28
Figura 8: Exemplo de ensaio de sequenciação baseados em DNA	30
Figura 9: Representação esquemática da via de sinalização MAPK	32
Figura 10: Mutação no nevo e o desenvolvimento do melanoma	34
Figura 11: Melanoma e os estágios graves da doença	35
Figura 12: Tratamentos únicos e combinatórios aprovados pela FDA	37
Figura 13: Tratamento farmacológico e a inibição da mutação.....	38
Figura 14: Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer	41
Figura 15: Árvore de cânfora, tronco de louro e canela	42
Figura 16: Espécie de árvore família Lauraceae (<i>N. lanceolata</i> - canela amarela) ...	42
Figura 17: Algumas espécies de <i>Nectandra</i> (canela)	43
Figura 18: Esqueleto carbônico de lignana e neolignana.....	44
Figura 19: <i>Nectandra leucantha</i>	45
Figura 20: Estrutura das três neolignanas bioativas	46
Figura 21: Compostos isolados da espécie <i>Nectandra leucantha</i>	47
Figura 22: Cromatograma da fração NEF por CLAE/DAD/EM (λ 190 a 800nm)	61
Figura 23: Espectros de UV e EM dos picos CLAE/DAD/EM (modo +)	62
Figura 24: Placas cromatográficas em CCDC do fracionamento do extrato NEF e dos padrões dos compostos IV, V e VI	62

Figura 25: Espectros de RMN de 1H para compostos 2 e 3	63
Figura 26: Fórmulas estruturais dos compostos bioativos	64
Figura 27: Esquema geral para obtenção dos fenolatos sódicos 4 e 5.....	74
Figura 28: Estruturas otimizadas dos compostos 1, 2, 3 e 4	75
Figura 29: MPE nas posições frontal, posterior do comp. 1 e derivado sódico 3	76
Figura 30: MPE nas posições frontal, posterior do comp. 2 e derivado sódico 4	76
Figura 31: Diagrama 2D do complexo BRAF/1 com V600E-BRAF	79
Figura 32: Diagrama 2D do complexo BRAF/2 com V600E-BRAF	79
Figura 33: Diagrama 2D do complexo BRAF/3 com V600E-BRAF	80

TABELAS

Tabela 1: Incidência de mutações em BRAF	31
Tabela 2: Fármacos utilizados no tratamento do melanoma	38
Tabela 3: As regras de Lipinski	50
Tabela 4: Comparação dos valores de IC50 determinado para medicamentos contra a linhagem tumoral de melanoma humano A374	65
Tabela 5: Parâmetros de Violações e de <i>DrugLikeness</i>	68
Tabela 6: Orbitais de fronteira calculados para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 e seus valores de GAP	73
Tabela 7: Orbitais de fronteira calculados para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5	77
Tabela 8: Interações moleculares de V600E-BRAF (PDB ID: 3OG7) com os compostos 1, 2 e 3 projetados	82

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADME	– Administração – Distribuição - Metabolismo - Excreção
BRAF	– Gene da RAF quinase do tipo B
CCDC	– Cromatografia em camada delgada comparativa
IC50	– Concentração inibitória média de 50%
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EGF	– <i>Epidermal growth factor</i> - fator de crescimento epidérmico
ERK	– <i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i> (proteína quinase regulada por sinal extracelular)
MAPK	– <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MEK	– <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
NEF	– Fração enriquecida com neolignanas
RAS	– RAt Sarcoma
RAF	– Quinase específica da serina/treonina
UVR	– Radiação ultravioleta
µm	– Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1. Câncer	22
3.2. Câncer de pele	23
3.3. Câncer de pele – Melanoma	24
3.3.1. Características gerais	24
3.3.2. Tipos de melanoma e estágios da doença	26
3.3.3. Via molecular de sinalização do melanoma	29
3.3.4. Nevos	33
3.3.5. Tratamentos farmacológicos	35
3.3.6. Fármacos Inibidores da mutação	36
3.4. Produtos Naturais	39
3.4.1. Família Lauraceae	42
3.4.2. Gênero <i>Nectandra</i>	43
3.5. Pesquisas com <i>Nectandra leucantha</i>	45
3.6. Estudos <i>in silico</i> no planejamento de novos fármacos	48
3.6.1. A regra dos cinco de Lipinski	49
3.7. Programas de Modelagem Molecular	52
3.7.1. <i>Docking molecular</i>	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1. Obtenção do extrato de <i>Nectandra leucantha</i>	55
4.2. Fracionamento Cromatográfico.....	55
4.3. Elucidação estrutural.....	56
4.4. Preparo de Derivados Salinos	56
4.5. Avaliação da atividade citotóxica – IC ₅₀	56
4.6. Análise conformacional	57
4.7. Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas ADMET	58
4.8. <i>Docking molecular</i>	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61

5.1. Fracionamento Cromatográfico e elucidação estrutural	61
5.2. Preparo de Derivados Salinos	64
5.3. Avaliação da atividade citotóxica – IC ₅₀	64
5.4. Propriedades Físico-Químicas	66
5.5. Propriedades Farmacocinéticas	69
5.6. <i>DrugLikeness</i>	70
5.6.1. Parâmetros de Lipinski	70
5.6.2. Filtro de Ghose	71
5.6.3. Regras de Veber	71
5.6.4. Modelo de Egan	71
5.6.5. Filtro de Muegge	71
5.6.6. Pains (Compostos de Interferência)	72
5.6.7. <i>Lead-likeness</i>	72
5.6.8. Análise conformacional e mapa de potencial eletrostático (MPE)	74
5.6.9. Energias dos Orbitais Moleculares	74
5.7. <i>Docking molecular</i>	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	

1



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, sendo considerado a segunda principal causa de mortes no mundo. A evolução das taxas de incidência e mortalidade sinalizam um contínuo crescimento para as próximas décadas que podem chegar a 19,5 milhões em 2025, segundo a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (FERLAY et al., 2015). Um tipo bastante frequente no Brasil é o câncer de pele que corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2019). No qual é classificado em tipo não melanoma (carcinoma basocelular e escamoso) e no tipo melanoma, dentre os quais, é o mais agressivo, e com alto potencial de metástases. Este tipo de neoplasia afeta os melanócitos, que são as células responsáveis pela produção de melanina (OTTAVIANO et al., 2018).

Apesar de ser menos frequente, o melanoma é considerado o mais letal dentre os tumores cutâneos, sendo responsável por 75% das mortes por câncer de pele. Isto está relacionado principalmente à sua capacidade de metástase, e pelo número limitado de opções de tratamento com resultados eficazes (LEONARDI et al., 2018). Além disso, muitos pacientes desistem do tratamento devido à escassez de resultados, sendo um problema pontual e determinante no percurso da doença que acaba causando um prognóstico ruim e óbitos em um curto espaço de tempo (FAIÃO-FLORES et al., 2015).

Em vista disso, várias estratégias e combinações de fármacos anticâncer tem sido utilizadas, porém as células de melanoma maligno possuem a capacidade de desenvolver resistência aos antineoplásicos causando a ineficiência na quimioterapia (GUINTA et al., 2020). O resultado ainda é menos eficaz, quando a doença está em estado avançado, por isso, estudos e pesquisas frente a esta problemática são extremamente importantes (SILVA et al., 2013).

Sabe-se que as espécies vegetais são empregadas como tratamento há muitos anos por causa do potencial terapêutico inerente em sua composição, e muitos fármacos foram produzidos através das substâncias bioativas encontrada nas plantas (MORAES, 2015). Neste viés, muitos estudos sinalizam um grande potencial de novos compostos com atividade antitumoral em espécies brasileiras, neste contexto, evidencia-se o gênero *Nectandra*, em especial a espécie lenhosa *N. leucantha*, que tem despertado um grande interesse em grupos de pesquisas, por conta de seu potencial farmacológico e antitumoral.

Resultados de ensaios *in vitro* publicados previamente, as neolignanas isoladas da *N. leucantha* demonstraram atividade citotóxica *in vitro* frente à linhagem tumorigênica de melanoma murino (B16F10) (SOUSA, 2018). Tendo em vista a capacidade farmacológica destes compostos isolados, esta espécie se torna uma importante fonte de neolignanas bioativas (GRECCO et al., 2018). De acordo com Grecco (2016) e Sousa (2017), os extratos brutos obtidos dos galhos apresentam potencial citotóxico, destacando as neolignanas dehidrodieugenol (1), dehidrodieugenol B (2) e dehidrodieugenol B metil éter (3).

Embora as plantas e produtos naturais sejam de suma importância para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, algumas dificuldades ainda são encontradas nos ensaios clínicos, uma vez que nessas etapas avançadas muitos resultados não são tão expressivos. Também os custos e o tempo envolvidos nos processos de obtenção dos resultados tornando muitas vezes os projetos inacabados. Da mesma forma, características intrínsecas das moléculas como baixa solubilidade e a falta de biodisponibilidade destes compostos no corpo humano, acabam por limitar sua eficácia. Por conta disso, metodologias são utilizadas com a intenção de melhorar essas características, sendo a modificação estrutural através de sínteses orgânicas, uma forma possível de aumentar a solubilidade dos compostos (FAIÃO-FLORES et al., 2015).

Muitos desafios são vinculados na pesquisa de novas moléculas bioativas, mas ferramentas computacionais favorecem os denominados estudos *in silico*, que levam em consideração não apenas a química, mas significativamente a física para oferecer uma aproximação plausível da estrutura tridimensional e energia do sistema fármaco-alvo (SILVA, 2015). Também técnicas que possibilitam uma predição de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas com potencial de boa absorção oral são imprescindíveis para melhor entendimento das moléculas promissoras (PEREIRA, 2019).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo melhorar a solubilidade das neolignanas bioativas, por meio do preparo de seus derivados salinos. Após esse procedimento através de estudos *in silico* e modelagem molecular, evidenciar dados e parâmetros que permitam um refinamento adicional sobre as propriedades físico-químicas, conformacionais e de farmacocinética, tanto das neolignanas isoladas, como de seus derivados sódicos.

2



OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal isolar e caracterizar estruturalmente duas neolignanas bioativas, assim como sintetizar novos análogos solúveis em água, e realizar um estudo de modelagem molecular, através de metodologias *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar uma revisão bibliográfica sobre o melanoma maligno e as dificuldades encontradas nos tratamentos atuais, pontuando os fármacos e a via de sinalização molecular referente a este tipo de câncer;
- ✓ Evidenciar a importância dos produtos naturais utilizados no combate ao câncer, destacando a espécie *Nectandra leucantha* e suas atividades farmacológicas;
- ✓ Fracionar o extrato das folhas de *Nectandra leucantha* visando o isolamento das substâncias bioativas;
- ✓ Preparar derivados hidrofílicos funcionais a partir da obtenção de seus respectivos fenolatos sódicos;
- ✓ Caracterizar estruturalmente as substâncias isoladas e os derivados sintetizados, por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- ✓ Realizar análise *in silico* dos compostos, relacionando sua estrutura a sua atividade biológica;
- ✓ Realizar estudo de docking molecular sobre a BRAF-V600, e avaliar a potencial interação fármaco-receptor em locais específicos.

3



REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

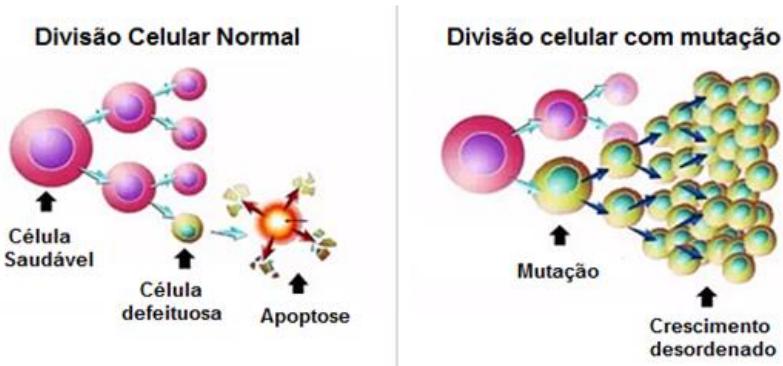
3.1. Câncer

Mais de oito milhões de pessoas morrem anualmente em todo o mundo por causa do câncer. O número de casos e mortes pela doença deve dobrar em todo o mundo nos próximos 20 a 40 anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em 2020, já sejam 16 milhões de novos casos anuais, sendo que 60% desses casos devem ocorrer em países menos desenvolvidos, como o Brasil. (WHO, 2018).

O aumento da ocorrência de câncer é decorrente do envelhecimento da população e da elevada prevalência dos fatores de risco, ou seja, devido ao estilo de vida contemporâneo que pode favorecer a formação de tumores (TORRE et al., 2017). Em consequência ao aumento da prevalência destes fatores de risco, a OMS estima um aumento de 70% de novos casos para as próximas duas décadas, principalmente em países de baixa renda (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer no Brasil (INCA), câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças, que são caracterizadas pelo crescimento de células anormais além de seus limites habituais e que podem invadir partes adjacentes do corpo e/ ou se espalhar para outros órgãos. As alterações no processo de divisão celular levam ao crescimento exagerado destas células, e consequentemente, à formação de tumores (figura 1) (FURTADO, 2014).

Figura 1: Comparação entre divisão em célula normal e cancerígena



Fonte: Coelho (2019)

As células diariamente passam por divisão celular, são reparadas e em períodos específicos morrem por apoptose, conforme ilustra a figura acima. Este processo ocorre de uma maneira natural, porém sem motivos aparentes, pode ocorrer uma falha e assim, as células começarem a desenvolver mutações, gerando um crescimento descontrolado (COELHO, 2019). Embora não se saiba ao certo a razão deste crescimento celular descontrolado, evidências e pesquisas científicas relatam que fatores de risco intrínsecos (relacionado ao interior) e extrínsecos (exterior) podem ser os desencadeadores deste processo, nos quais podem estar relacionados ao ambiente físico, fatores genéticos/hereditários, hábitos sociais como o tabagismo, idade, má alimentação, fármacos, exposição solar dentre outros (TORRE et al., 2017).

De acordo com Oliveira (2017) os tratamentos disponíveis são variados e complexos, sendo orientados em função do tipo de tumor e do estágio da doença, que adicionalmente também ponderam o contexto evolutivo da neoplasia e as características do paciente. As alternativas incluem uma abordagem cirúrgica, que na maioria das vezes é o primeiro procedimento utilizado; também por medicamentos sistêmicos (quimioterapia), radioterapia ou a combinação de duas ou mais modalidades, porém todas estas alternativas, ainda apresentam limitações e ou efeitos adversos.

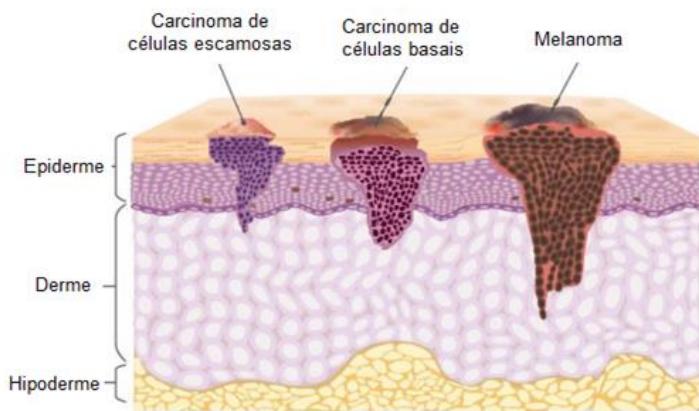
Os medicamentos sistêmicos, os quimioterápicos têm como objetivo causar a morte de células cancerosas, porém não são seletivos ou específicos, e após a administração, ou seja, ao entrar no sistema circulatório, eles se distribuem e interagem com diversos receptores que não são associados a doença, matando as células tumorais, e danificando as células normais e saudáveis (SOMASUNDARAM et al., 2017). Por estes motivos, há uma urgente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e seletivos, ou seja, com atuações específicas nas células tumorais, e assim diminuir as sequelas deixadas pela quimioterapia (SOUZA, 2017).

3.2. Câncer de pele

Segundo as estimativas no Brasil, o câncer de pele é uma neoplasia de grande incidência, representando 30% dos tumores malignos, sendo mais prevalente em pessoas de pele clara e maiores de 40 anos (INCA, 2019). Esta neoplasia cutânea refere-se a lesões que afetam a pele e seus órgãos anexos, sendo que qualquer

estrutura pode estar sujeita a um processo tumoral, que tendem a estar localizados na camada externa da pele, a epiderme (DUARTE et al., 2018), como apresentado na figura 2:

Figura 2: Tipos mais importantes de câncer de pele



Fonte: www.portalfarma.com/Profesionales/comunicacionesprofesionales/informes-tecnico-profesionales/Documents/Informe-Cancer-Piel-PF135.pdf.

A ilustração destaca as doenças malignas mais frequentes da pele, o carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas, e o melanoma maligno. Em termos gerais e considerando as diferenças epidemiológicas e prognósticas, são separados em duas categorias: o câncer de pele não melanoma e o tipo melanoma (INCA, 2019).

3.3. Câncer de pele - Melanoma

3.3.1. Características gerais

O melanoma é a neoplasia maligna dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina (pigmento da pele), e embora menos frequente, é considerado o mais agressivo dentre os tumores cutâneos, possuindo curso clínico muitas vezes imprevisível e opções terapêuticas limitadas (CHEROBIN, 2013).

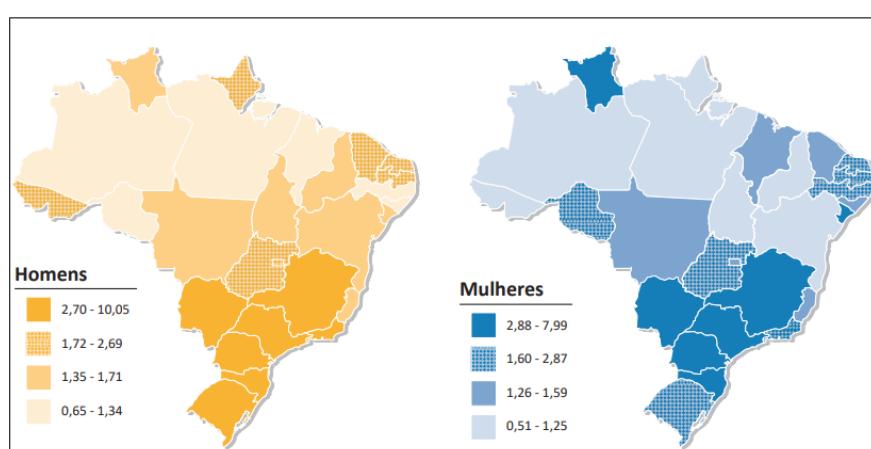
O melanócito é uma célula derivada da crista neural que produz o pigmento melanina, que é gerado pelos melanossomas, localizados na epiderme. Esta substância afeta a cor do cabelo, pele e olhos nos mamíferos. Além disso, a biossíntese de melanina é crucial na defesa do corpo contra os efeitos nocivos à pele causados por danos ao DNA e radiação ultravioleta (UV) (JANG et al., 2020).

Apesar da localização cutânea ser responsável por 95% dos casos, o melanoma não é exclusivo da pele, mas pode também surgir nas superfícies das mucosas (oral, conjuntival, vaginal), no interior do trato uveal do olho e nas leptomeninges (camadas mais internas de tecido que cobrem o cérebro) (LOPES, 2018).

Embora a incidência mundial de melanoma seja baixa, ela vem aumentando o número de casos nos últimos anos, e de acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde, anualmente podem surgir cerca de 150 mil novos casos no mundo, sendo que os países com as maiores taxas de incidência são Austrália, Nova Zelândia e nos países do Norte, Centro e Leste Europeu (WHO, 2018). No Brasil em 2017 foram 1.031 óbitos em homens, e de 804 óbitos em mulheres, contudo, o número de casos continua crescendo, e são estimados novos casos para 2020-2022.

Dados epidemiológicos provenientes do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018) juntamente com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019) estimam um crescimento contínuo no número de casos de melanoma no Brasil para o período de 2020 a 2022 (Figura 3), as taxas são calculadas com base na incidência de 100 mil homens e de 100 mil mulheres, sendo que a prevalência é para o público masculino residentes na região Sul no estado de Santa Catarina (INCA, 2019).

Figura 3: Representação espacial de casos estimados de melanoma para o ano de 2020-2022



Fonte: Inca (2019)

O desenvolvimento do melanoma é consequência da perda dos mecanismos de controle celular, causada por estímulos ambientais, é classificado como uma doença multifatorial decorrente da interação entre a suscetibilidade genética e a

exposição principalmente pelas radiações UVA e UVB, que são agentes carcinogênicos (JOBIM, 2017). Além disso, fatores de risco como fenótipo da pele, números de nevos (pintas), histórico familiar e ambientais, sendo que a exposição excessiva ao sol, com queimadura solar, principalmente nos primeiros 20 anos de vida, é o fator ambiental mais significante, bem como o bronzeamento artificial, especialmente em pessoas com pele e olhos claros (MÉLO et al., 2019).

3.3.2. Tipos de melanoma e estágios da doença

A prevenção primária pode ser realizada através da observação de nevos (pintas) ou qualquer outra lesão cutânea, sendo isto muito importante para a detecção precoce de eventuais doenças relacionadas a pele (LOPES, 2018). Para o melanoma algumas indicações são de grande importância e devem ser observadas quando ocorrerem tais eventos como: formato e bordas irregulares (A – B); cor (C) sem uniformidade (marrom, preto, azul, vermelho ou branco); diâmetro (D) quando a pinta possuir tamanho maior do que 6mm; evolução (E) que são as alterações e mudanças ocorridas na lesão, podendo ser descamação, coceira, sangramentos etc. (MOYA-PLANA, et al., 2017).

De acordo com León et al. (2013) a evolução do tumor depende, antes de tudo do estágio no momento do diagnóstico, que é realizado por meio de testes e exames (físicos, raios-X, tomografia computadorizada etc.) e informações patológicas que combinam os resultados de biópsia da lesão e de gânglios linfáticos, isso no caso de lesões graves.

Acredita-se que as mudanças nos hábitos da população ao longo da história, caracterizadas pela maior exposição solar, associada à valorização estética do bronzeamento da pele, seja da forma natural e/ou artificial, e ao aumento da radiação UV, contribuíram para a expansão da doença, tornando-a um problema de saúde pública (MÉLO et al., 2019).

Importante destacar que há quatro tipos de melanoma e que são distintos em sua apresentação, também possuem níveis de gravidade e características associadas a fenótipos como a cor da pele e dos olhos. Segundo Lopes (2018), o tipo mais comum é o denominado de melanoma extensivo superficial (Figura 4), que acomete pessoas na faixa etária de 40 a 50 anos com relevância no tronco e nas pernas, se mostra da seguinte forma:

Figura 4: Melanoma superficial



Fonte: UK - National Health Service (2019)

Geralmente este tipo de neoplasia possui uma aparência irregular, no formato e na cor, com tons diferentes de preto e marrom, se manifestam principalmente em indivíduos com descendência caucasiana com características de pele clara que tiveram exposição solar intensa e queimaduras na infância, possuem uma associação aos nevos, sendo que pessoas com mais de 10 nevos distribuídos pelo corpo são sujeitas a desenvolver a neoplasia (NEVES, 2018). Possuem evolução crônica, que pode durar de meses a anos até surgir os indícios da doença, que se dá através da presença de nódulos elevados, sangramento ou transudação (vazamento de líquidos), observa-se o crescimento da lesão de forma radial, ou seja, para os lados e quando diagnosticado inicialmente possui chances de cura (LOPES, 2018).

Conforme Hsieh (2012), o tipo nodular é o segundo mais comum com cerca de 15 a 30% dos casos, acomete indivíduos principalmente na faixa etária acima de 50 a 60 anos do sexo masculino. Apresenta lesão papulosa, elevada, de cor castanha, negra ou azulada (Figura 5) geralmente nas costas. São frequentes o surgimento de ulcerações e sangramento, a aparência é característica ao formato de nódulos e seu crescimento é vertical e invasivo, podendo atingir outras áreas da pele indicando prognósticos desfavoráveis.

Figura 5: Melanoma tipo nodular



Fonte: UK - National Health Service (2019)

Outra forma, é o tipo acral lentiginoso que acomete cerca de 2 a 8% dos pacientes. Apresenta-se na forma de lesões discrômicas, geralmente hipercrônicas,

que aparecem no leito ungueal (unhas), palmas das mãos e plantas dos pés. É uma forma pouco frequente em pessoas de origem caucasiana, mas é típica nos orientais e na raça negra com idade acima de 70 anos (Figura 6) (LOPES, 2018).

Figura 6: Melanoma na unha e tipo acral



Fonte: UK - National Health Service (2019)

Neste tipo, muitas vezes pode ocorrer irritação nas lesões surgindo prurido, isto acontece por causa do atrito devido à sua localização, que acabam confundindo com muitos outros processos inflamatórios na pele, como verrugas, micose etc., também a localização vulvar e anorretal, são especialmente terríveis em seu prognóstico, por possuírem ação vertical na pele atingindo linfonodos e outros tecidos (NEVES, 2018).

De acordo com Passos et al. (2014), o melanoma tipo lentigo maligno corresponde a 5% dos casos, geralmente são *in situ*, com grande área de crescimento horizontal. Esta lesão apresenta-se como mancha com coloração irregular, do marrom ao preto, geralmente em áreas da pele expostas ao sol, na maioria dos casos, na face de pessoas com idade avançada, onde muitos realizaram trabalhos expostos ao sol por muitos anos da vida, como por exemplo agricultores, (Figura 7), como observado abaixo:

Figura 7: Melanoma tipo lentigo, e tipo amelanótico



Fonte: UK - National Health Service (2019)

A figura 7 evidencia o tipo amelanótico que ocorre com uma frequência de 1,8%, ou seja, com baixa incidência na população. É uma forma nodular que não desenvolve pigmentação e as vezes é confundida com eczemas ou outras doenças

de pele, por isso acarreta inúmeros atrasos no diagnóstico e, portanto, é acompanhada de um prognóstico desfavorável. Possui pouca ou nenhuma coloração, mas podem ocasionalmente ser rosa ou vermelho, com bordas castanhas claras ou cinzentas (PASSOS et al., 2014).

Outro tipo considerado raro, mas com alta gravidade que acomete uma porcentagem pequena (menos de 5%) de todos os casos é o melanoma mucoso, sua localização preferencial é a cervicofacial, principalmente nasossinusal. A doença é de difícil controle devido ao seu caráter muitas vezes multifocal e às demandas anatômicas da região facial, que dificultam a realização de uma excisão do tumor satisfatória. Além disso, existe um risco metastático significativo que conduz a uma mortalidade precoce significativa, quando diagnosticado em fases iniciais, o tratamento é a cirurgia, seguida classicamente da radioterapia adjuvante (MOYAPLANA, et al., 2017).

Também uma das complicações mais comuns experimentadas por pacientes com melanoma em estágio avançado é a metástase para o cérebro, que é diagnosticada em mais de 60% dos casos e identificada em até 80% dos pacientes na autópsia. Sabe-se que o melanoma se manifesta a partir da transformação maligna dos melanócitos, que são células derivadas da crista neural, responsáveis por muitas funções, onde uma delas é determinar a produção de pigmentação na pele. Assim, a origem dos melanócitos está subjacente à capacidade das células de melanoma de migrar e se desenvolver no cérebro e em outros órgãos importantes, incluindo também os pulmões (REBECCA; SOMASUNDARAM; HERLYN, 2020).

3.3.3. Via molecular de sinalização do melanoma

Torna-se indubitável que um dos fatores que podem gerar esta neoplasia é a exposição exagerada à radiação UVA e UVB que afeta diretamente o DNA das células da epiderme (os melanócitos), esses estímulos exacerbados na superfície celular podem desencadear uma cascata de sinalização, e mutações em genes específicos (ROSSI et al., 2019).

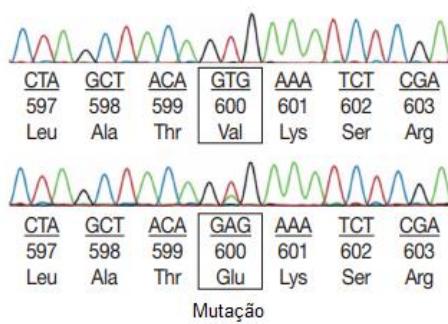
A cascata é a via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase* - proteína quinase ativada por mitógeno) que provavelmente é a via de transdução de sinal mais bem caracterizada na Biologia Celular (ROSSI et al., 2019). Sua função é levar sinais do meio extracelular para o núcleo da célula, realizando assim processos celulares

importantes como o crescimento, divisão, diferenciação e apoptose (ASCIERTO et al., 2012). Também está envolvida na regulação do ciclo celular, cicatrização de feridas e reparo de tecidos, ademais também é capaz de estimular a angiogênese por meio de alterações na expressão de genes diretamente envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos, e de regular uma variedade de funções celulares que são importantes para a formação de tumores (OTTAVIANO et al., 2021).

De acordo com Leonard et al. (2018) BRAF é uma serina-treonina quinase envolvida na proliferação celular que desencadeia a via de sinalização MAPK após sua ativação pela família de proteínas RAS. A via MAPK controla processos celulares importantes propiciando a progressão do ciclo celular, diferenciação e regulação da transcrição, por isso a existência de mutações em BRAF determinará o comprometimento desses processos, sendo o ponto final a oncogênese (VICENTE, 2016). Aproximadamente 80% dos pacientes com melanoma cutâneo apresentam mutações em BRAF (LONG et al., 2011), enquanto em outros tipos como acral, mucosa, conjuntival e uveal sua incidência é bastante baixa (ERLICH; FISHER, 2018).

A ativação de mutações em BRAF está envolvida nas vias da MAPK, ligando sinais extracelulares a processos intracelulares. As mutações são detectadas nos exons 11 e 15 por ensaios de sequenciação baseados em DNA, em particular, a maioria das mutações BRAF nesta oncogênese estão no exon 15, o que resulta na troca de valina por ácido glutâmico no códon 600 (V600E) (PHAN et al., 2021), conforme exemplo abaixo:

Figura 8: Exemplo de ensaio de sequenciação baseados em DNA



Fonte: Phan et al. (2021)

A substituição de valina (VAL) para ácido glutâmico (GLU), no códon 600 (BRAF - V600E) (Figura 8) é a mutação mais prevalente no melanoma e pode ser a repercussão de um efeito secundário de dano ultravioleta (UV), como uma mutação

não clássica do DNA induzida por radiação UV ou por causa da síntese de espécies reativas de oxigênio (CORICOVAC et al., 2018).

Ensaios de sequenciamento do DNA do melanócito, mostram as mudanças no códon 600, com a troca dos aminoácidos citados indicando falha e o surgimento do melanoma. Considera-se que entre as mutações BRAF observadas no melanoma, mais de 90% estão no códon 600 conforme evidencia a Tabela 1 (PHAN et al., 2021).

Tabela 1: Incidência de mutações em BRAF

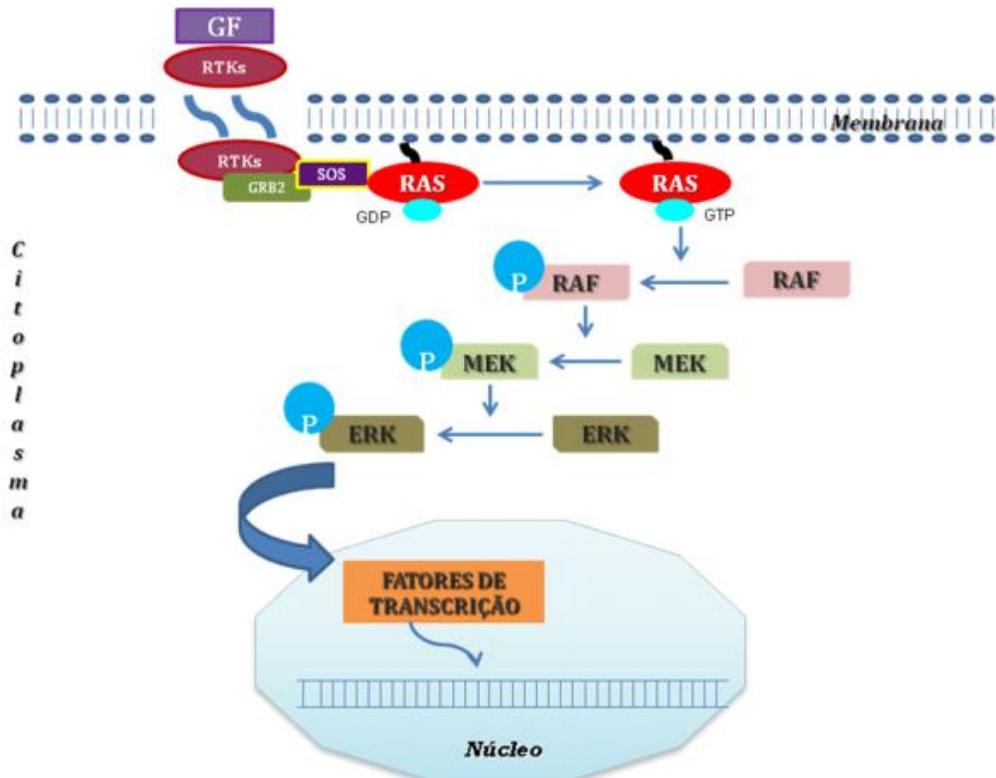
Mutação BRAF	Mutação códon 600	Incidência em BRAF – Melanoma %
<i>Mutações BRAF comuns</i>		
V600 E	Valina → ácido glutâmico	84,6
V600 K	Valina → lisina	7,7
<i>Outras mutações BRAF</i>		
V600 R	Valina → arginina	1
V600M	Valina → leucina	0,3
V600D	Valina → ácido aspártico	0,1

Fonte: Adaptado de Ottaviano et al. (2021)

As mutações representadas envolvem o códon 600, e consistem em mudança de aminoácido de valina para ácido glutâmico sendo a mais prevalente (84,6%), resultando em um aumento de 480 vezes na atividade da quinase em comparação com a proteína nativa. Da mesma maneira, BRAF V600K é a segunda mutação mais comum cerca de 10% de todas as mutações em BRAF códon 600 no melanoma cutâneo (OTTAVIANO et al., 2021).

Ainda neste contexto, os estímulos extracelulares como fatores de crescimento (EGF) acontecem a todo momento no organismo, e consequentemente quando se ligam a receptores específicos, acabam por ativar vias subsequentes, como a MAPK. Toda a sinalização no meio intracelular se inicia através da ativação de proteínas, que se estimuladas erroneamente podem desencadear mutações ou falhas, assim o sinal ou dano chega ao núcleo ocorrendo a expressão gênica (SOUZA, 2017), como retrata a figura 9 abaixo:

Figura 9: Representação esquemática da via de sinalização MAPK



Fonte: Hsieh (2012)

Consequentemente, a sinalização da MAPK inicia-se pelos sinais extracelulares que se ligam aos receptores de tirosina quinases (RTKs) e por consequência a activação do RAS que está ligada a membrana celular. O RAS activa a proteína RAF que fosforila e ativa MEK1 e MEK2, que por sua vez promovem a fosforilação ativando ERK1 e ERK 2, que ativado regula a expressão gênica pela fosforilação de inúmeros fatores de transcrição nuclear ou atingindo moléculas sinalizadoras intracelulares (HSIEH, 2012).

Neste sentido, o gene BRAF desempenha um papel importante na regulação da resposta celular aos sinais extracelulares, e as mutações neste gene são detectadas com grande prevalência no melanoma maligno (GIUNTA et al., 2020). A identificação da via de sinalização RAS – RAF – MEK – ERK e seu direcionamento representou um marco valioso para o tratamento avançado e, mais recentemente, para o tratamento de melanoma em estágio III e IV (OTTAVIANO et al., 2021).

Segundo Cheng et al. (2018) o melanoma mutado por BRAF tende a exibir características clínicas distintas e é caracterizado por um comportamento biológico mais agressivo, mais frequente em pacientes jovens em regiões como cabeça,

pescoço, tórax, abdômen, pelve, membro superior, membro inferior. Além disso, os tumores mutantes de BRAF têm maior probabilidade de metástase para o cérebro e associado a uma sobrevida global mais curta em pacientes com câncer em estágio IV (denominação dada ao tumor que se espalhou para além do local original).

Sendo assim, uma das descobertas mais impactantes foi a identificação de mutações ocorridas no gene BRAF que auxiliou na compreensão da patogênese molecular do melanoma (HSIEH, 2012). Esta descoberta também levou ao desenvolvimento de terapias direcionadas para pacientes com BRAF V600E, incluindo os inibidores BRAF mutantes seletivos (BRAFi) e os inibidores MEK (MEKi) (YAMAZAKI, et al., 2015). Atualmente, o *status* de mutação BRAF é o único biomarcador que prediz uma resposta terapêutica no melanoma avançado. O teste molecular para mutações BRAF em pacientes com melanoma avançado se tornou um padrão para determinar o curso da terapia, e o teste é recomendado pelas diretrizes atuais da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) e da *European Society for Medical Oncology* para melanoma (CHENG et al., 2018).

3.3.4. Nevos

O termo nevo é derivado de uma raiz latina que significa “marca de nascença”, indicando que os nevos estão presentes no nascimento, é o termo médico que descreve, uma lesão na pele popularmente conhecida como mancha ou pinta. Curiosamente, esses nevos adquiridos ao longo da vida compartilham, fatores de risco genéticos e ambientais, assim como o melanoma maligno. Indivíduos com pele clara, tendência a queimaduras solares e baixa capacidade de bronzeamento apresentam risco aumentado de melanoma maligno e aumento do número de nevos melanocíticos (SOUZA, 2017). Ademais, vários estudos implicam uma propensão para desenvolver nevos melanocíticos como um fator de risco para melanoma cutâneo, e como 20-30% dos melanomas surgem de nevos melanocíticos preexistentes, não é surpreendente que muitos dos fundamentos genéticos do melanoma também tenham sido encontrados em nevos (ROH et al., 2016).

Os nevos seriam provenientes da expansão clonal de um melanócito, isso ocorreria espontaneamente ou por estímulos externos, como foto-exposição, que levaria a uma proliferação geralmente uniforme e histologicamente simétrica, com mutações genéticas homogêneas na maioria das células constituintes. Sendo assim,

as mutações genéticas encontradas em alguns nevos também são consideradas fundamentais no desenvolvimento de um melanoma, portanto, foi proposto que os nevos podem ser verdadeiras lesões precursoras de melanoma, que acabariam se desenvolvendo como consequência de um acúmulo progressivo de mutações genéticas (MARTÍN-GORGOJO; NAGORE, 2018).

Diversos estudos científicos relatam que os nevos são proliferações benignas de células dos melanócitos, ademais estão positivamente correlacionadas com a susceptibilidade ao melanoma, e que estão comumente presentes na pele humana, no entanto, pouco se sabe sobre quais os fatores que levam ao seu desenvolvimento e evolução para o melanoma. Em 20–50% dos casos, o melanoma pode ser rastreado até um nevo preexistente, que se desenvolvem por mutações oncogênicas em BRAF (NASTI et al., 2016).

A Figura 10 demonstra o provável início do melanoma através de uma mutação em um nevo existente na pele e que recebeu exposição exacerbada a agentes carcinogênicos:

Figura 10: Mutação no nevo e o desenvolvimento do melanoma



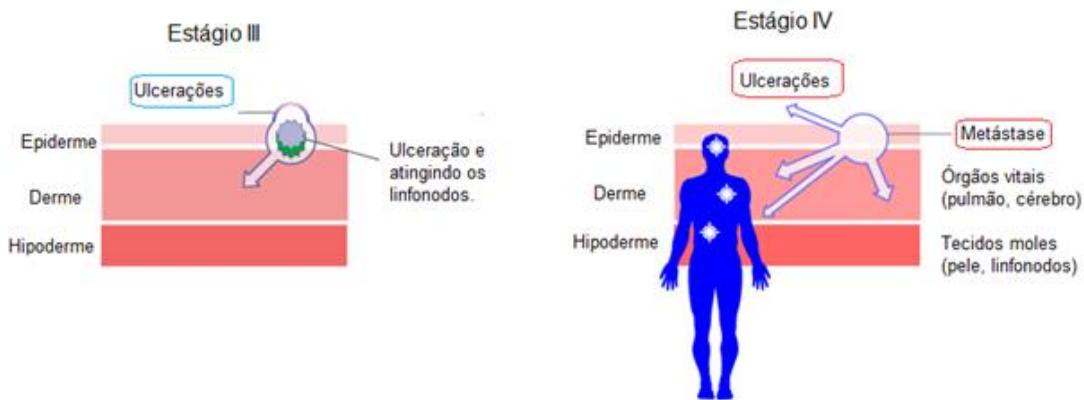
Fonte: Souza (2017)

Por isso, a luz solar e as fontes artificiais de UVR são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de nevos e por consequência o melanoma, levantando a possibilidade de que a exposição a xenobióticos e fatores ambientais podem ser relevantes no início do desenvolvimento do nevo e sua possível transformação em melanoma invasivo (NASTI et al., 2016).

3.3.5. Tratamentos farmacológicos

O melanoma é classificado em estágios, que são utilizados para determinar qual o melhor tratamento a ser utilizado, é rotulado em números a partir de 0 quando a lesão é superficial, e se encontra apenas na epiderme sendo denominado de melanoma *in situ*. A partir de numerais romanos de I a IV, são classificados e determinam o crescimento dos tumores e com os estágios evolutivos, a gravidade, também diâmetro e espessura da lesão (NEVES, 2018). Segundo Souza (2017) os estágios I e II são definidos pela espessura e a presença de ulcerações, sendo que nesta fase não há evidências de que o tumor se espalhou para os gânglios linfáticos ou locais distantes (metástase). O melanoma estágio III (Figura 11), é definido pelo nível de envolvimento e ulceração dos linfonodos já indicando uma fase de gravidade, onde o tumor pode estar em camadas mais profundas da pele (derme), como ilustra a figura abaixo:

Figura 11: Melanoma e os estágios graves da doença



Fonte: www.melanomaespana.es/respuestas/estadios-del-melanoma/resumen-de-etapas-0-iv/.

O melanoma em estágio IV ocorre quando o tumor se espalhou para além do local original, e dos linfonodos regionais para áreas mais distantes do corpo. Os locais mais comuns de metástase são órgãos vitais (pulmões, órgãos abdominais, cérebro e ossos) e tecidos moles (pele, tecido celular subcutâneo) e linfonodos distantes, ou seja, além da região do tumor primário (LOPES, 2018).

O tratamento depende do diagnóstico e do estágio do tumor, e de acordo com isso, diferentes terapias têm sido utilizadas, as quais são implementadas individualmente ou em conjunto, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e

imunoterapia (HU-LIESKOVAN et al., 2014) A cirurgia é a primeira opção de tratamento, pois sua aplicação é baseada na eliminação ou diminuição do tumor. No entanto, se não for detectado precocemente, o tumor pode gerar metástase espalhando para outros tecidos, então neste caso a cirurgia não se mostra efetiva e assim a utilização de terapias sistêmicas são mais indicadas (MOYA-PLANA, et al., 2017).

O tratamento preconizado para o melanoma no Brasil para casos inoperáveis ou avançados, é a radioterapia e quimioterapia sistêmica como já citado anteriormente (JOBIM, 2017). Todavia, a forma metastática na maioria dos casos é incurável e com o prognóstico de vida de cinco anos, atingindo apenas 5% dos pacientes, porém para uma grande parte dos pacientes o período de sobrevida é por volta de 4 meses (SILVA et al., 2013).

3.3.6. Fármacos Inibidores da BRAF

Desde a descoberta de mutações ativadoras no oncogene BRAF e a estimulação de uma resposta antitumoral imunomediada no melanoma, houve uma busca por desenvolvimento de terapias direcionadas para este estágio do melanoma. Embora inibidores da mutação BRAF e inibidor de MEK tenham sido associados a resultados clínicos impressionantes, a maioria dos pacientes tem recidiva por volta de 6 meses (LITO; ROSEN; SOLIT, 2013).

De fato, os melanomas em estágio avançado são difíceis de tratar mesmo com terapias, que visam a inibição do BRAF oncogênico mostrando respostas que frequentemente são de curta duração (SOMASUNDARAM et al., 2017). As razões existentes pela falha nestes tipos de terapêuticas não são completamente compreendidas (REBECCA; SOMASUNDARAM; HERLYN, 2020).

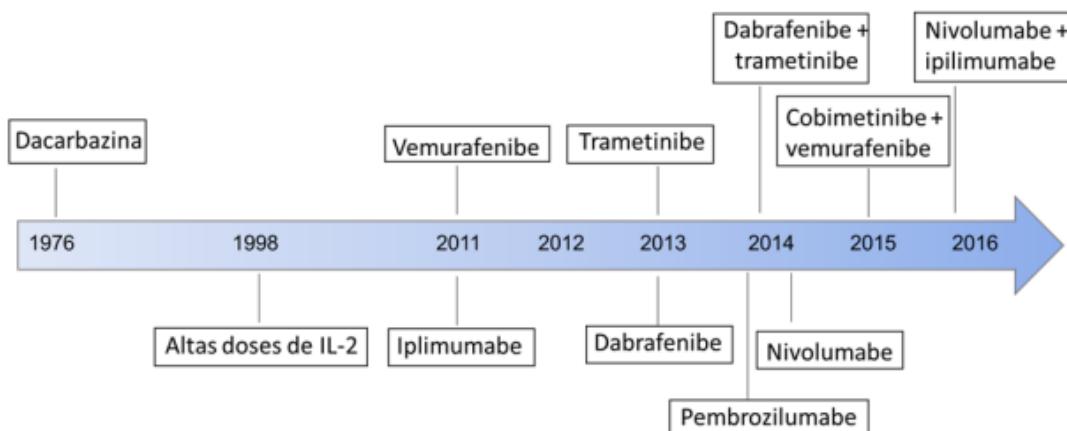
Embora novas terapias sejam atualmente indicadas para melanoma, as mesmas apresentam limitações e dificuldades em compreendê-las tais como interferência na mutação do gene BRAF, que estimula as células a se desenvolverem de forma anormal e se dividirem fora de controle, e causar uma resposta inflamatória atingindo órgãos do corpo, piorando a saúde do paciente (PARK et al., 2020).

O tratamento com dacarbazina que é um medicamento quimioterápico para melanoma aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para pacientes com quadro grave é utilizado desde 1976, porém este quimioterápico não propicia

melhorias na taxa de sobrevida do paciente (PARK et al., 2020). Visto que o principal problema associado ao tratamento é a baixa taxa de resposta às modalidades existentes, que, por sua vez, se deve à resposta incompleta dos agentes quimioterápicos e à resistência inerente das células do melanoma maligno (LEONARDI et al., 2018).

De acordo com Souza (2017), os tratamentos com fármacos inibidores específicos começaram a ser utilizados em 2011 (Vemurafenibe - inibidor mutação BRAF), em 2013 inibidor de MEK (Trametinibe), e em ordem cronológica visualiza-se a combinação de inibidores (MEK e BRAF) na tentativa de potencializar o tratamento e obter a cura do melanoma, como mostra a figura 12:

Figura 12: Tratamentos únicos e combinatórios aprovados pela FDA

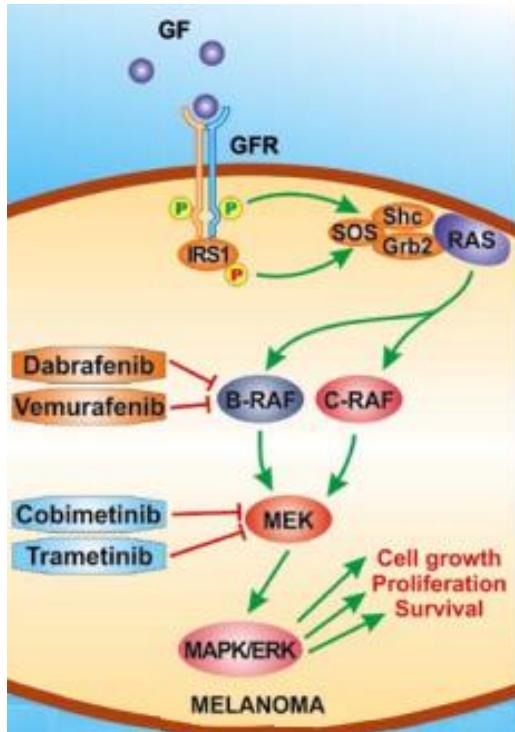


Fonte: Souza (2017)

Observa-se que, houve um avanço no arsenal terapêutico a partir da descoberta da mutação em BRAF, e muitos fármacos foram desenvolvidos buscando a regressão e diminuição da inibição de vias moleculares referentes ao melanoma.

Os melhores resultados encontrados ainda que muito limitados, para o tratamento do melanoma, são baseadas nos inibidores da proteína quinase serina/treonina e nos inibidores do ponto de verificação imunológico (SANCHES et al., 2020). A figura 13 refere-se aos principais fármacos e os inibidores da mutação em melanoma:

Figura 13: Tratamento farmacológico e a inibição da mutação



Fonte: Leornardi et al. (2018)

Legenda: GF é fator de crescimento; GFR é receptor do fator de crescimento; IRS1 substrato 1 do receptor de insulina; SOS, Shc e SHC são proteínas adaptadora e ligadas ao receptor do fator de crescimento; RAS proto-oncogene GTPase; BRAF proto-oncogene B-Raf; C-RAF proto-oncogene RAF-1; MAPK proteína quinase ativada por mitogênio; ERK proteína quinase 1 ativada por mitogênio.

Os anticorpos monoclonais utilizados na imunoterapia são fármacos que aumentam a eficácia do sistema imunológico, que é capaz de reconhecer e erradicar as células tumorais, como mostrado na tabela 2 alguns fármacos deste tipo e seu mecanismo de ação:

Tabela 2: Fármacos utilizados no tratamento do melanoma

Fármaco	Mecanismo de ação
Dabrafenibe e Vemurafenibe	Inibidores seletivos do B-RAF
Cobimetinibe e Trametinibe	Inibidores seletivos da MEK
Ipilimumabe, Nivolumabe e Pembrolizumabe	Anticorpo monoclonal IgG1k, anticorpos monoclonais PD-1 IgG4 e IgG4k respectivamente

Fonte: Adaptado de Beltrão (2015)

De fato, no cenário de estágio avançado, anticorpos como Nivolumabe, Pembrolizumabe E Ipilimumabe, bem como inibidores B-RAF seletivos (Vemurafenibe

E Dabrafenibe) sozinhos e/ou em combinação com inibidores MEK (Cobimetinibe e Trametinibe, mostram resultados promissores em ensaios clínicos (LEONARDI et al., 2018). O Vemurafenib inibe a via da MAPK através do bloqueio de ligação ao domínio ATP da BRAF mutada, sendo que seu uso tem melhorado e prolongado a vida de pacientes com melanoma (BELTRÃO, 2015).

A situação clínica para a maioria dos pacientes com melanoma metastático representa um desafio para os médicos e para os pesquisadores que tentam superar tais adversidades (REBECCA; SOMASUNDARAM; HERLYN, 2020). Melhorias e novas descobertas no tratamento do melanoma foram alcançadas na última década. Os esforços incansáveis dos pesquisadores lançaram luz sobre os mecanismos essenciais envolvidos na biologia do melanoma, abrindo caminho para o tratamento direcionado com o uso de anticorpos monoclonais (imunoterapia). Uma elucidação adicional da biologia e evolução do melanoma também na presença de pressão seletiva de tratamento representa um objetivo central da pesquisa do câncer neste campo e pode, em última análise, melhorar o atendimento ao paciente e o prognóstico (LEONARDI et al., 2018).

3.4. Produtos Naturais

O uso de produtos naturais é uma das características da sociedade desde os tempos primórdios, registros da medicina romana, egípcia, persa e hebraica mostram que as plantas eram utilizadas de forma extensiva para curar praticamente todas as doenças conhecidas pelo homem, pois muitas delas continham poderosos ingredientes que, se usados corretamente, ajudavam a curar o corpo (BRASIL, 2016).

Durante muito tempo foram utilizadas apenas de forma empírica, sem conhecimentos sobre suas atividades farmacológicas ou constituintes ativos, mas no século XVIII iniciou-se investigações sobre algumas espécies venenosas, e a partir disso lançou-se as bases para a investigação clínica racional de ervas medicinais (ATANASOV et al., 2015). Sabe-se que as espécies vegetais oferecem uma riqueza de aplicações medicinais que são praticadas e repassadas por gerações, também na vasta utilização em tratamentos medicinais com o intuito de promover a saúde, na fabricação de cosméticos e de alimentos (JANG et al., 2020).

Produto natural é todo o tipo de substância produzida pela natureza por intermédio dos seres vivos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal

do mundo, e as plantas são uma fonte abundante de produtos naturais com atividade biológica e farmacológica, contudo, apesar deste potencial gigantesco muitas delas permanecem desconhecidas, pois não foram estudadas (SOUSA, 2018). Acredita-se que a biodiversidade vegetal oferece uma gama de moléculas e bioativos a serem descobertas com o intuito de fornecerem a matéria prima para o desenvolvimento de novos medicamentos e fármacos para tratamentos de diversas doenças (SANTOS; FURLAN; AMORIM, 2016).

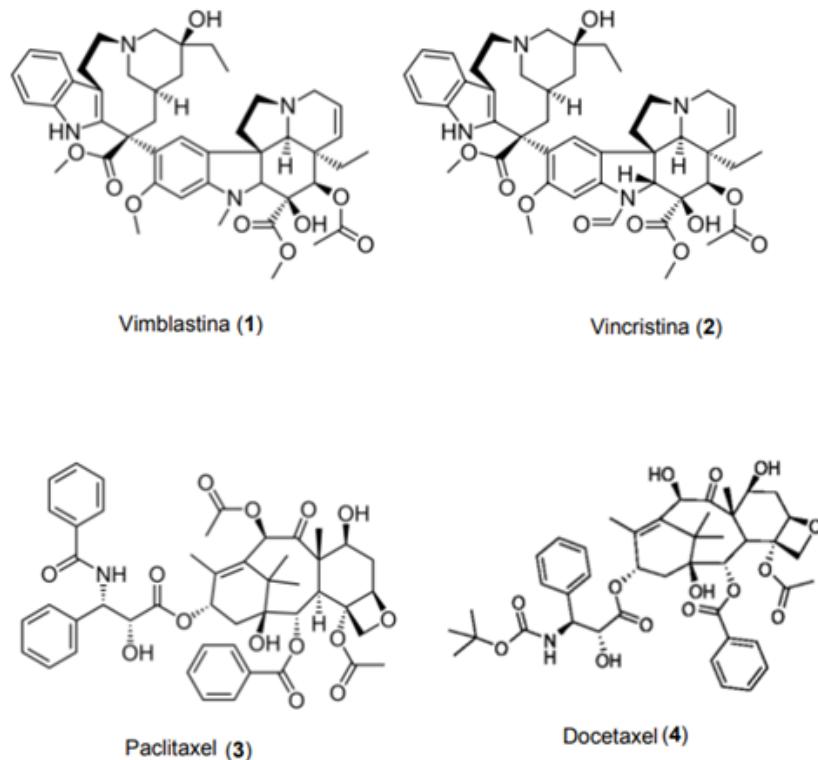
De acordo com Berlinck et al. (2017), os produtos naturais podem ser classificados em metabólitos essenciais (principais ou primários), substâncias que estão diretamente envolvidas no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos seres vivos, tais como: produtos de fermentação (etanol, ácido acético, cítrico e láctico) e constituintes celulares (lipídeos, vitaminas e polissacarídeos). E, metabólitos especiais (secundários) que são substâncias que não estão diretamente envolvidas nos processos vitais, tais como: pigmentos, carotenoides, polifenóis etc., mas que são produzidas pelas plantas em situações específicas que a espécie vivência, tais como para a proteção contra predadores, atração à polinizadores, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, altitude, função de atrair ou afastar outras espécies de seres vivos (SOUSA, 2018).

Há um grande interesse em produtos naturais, pois consistem em uma fonte inesgotável de substâncias químicas que se originam a partir da diversidade das espécies vegetais e dos biomas que ressaltam a riqueza cultural de cada região (SILVA, 2019). Isto ocorre a partir dos metabólitos secundários que possuem atividades biológicas relevantes, provenientes da constituição química da planta, no qual muitos atuam como antioxidantes, anti-inflamatórios, antiparasitários, antivirais entre outras, sendo que do ponto de vista farmacêutico, essas substâncias bioativas podem ser utilizadas para a criação, aprimoramento e desenvolvimento de novas terapêuticas/fármacos (LIMA NETO et al., 2015). Do mesmo modo, são considerados pelos pesquisadores como fontes disponíveis e acessíveis de agentes biológicos com atividade terapêutica que possuem mecanismos de ação diferentes em comparação com as drogas convencionais, sendo assim capazes de representar bases para o desenvolvimento de novos produtos visando a cura de doenças (NEGUT et al., 2020).

Essa abordagem levou à descoberta de um número imenso de substâncias com propriedades farmacológicas, principalmente provenientes de compostos naturais derivados de plantas, que se tornaram indispensáveis para a farmacoterapia

moderna onde muitos são encontrados no campo de agentes anticâncer, como por exemplo, Paclitaxel (Figura 14) e seus derivados de espécies de Teixo (*Taxus*), Vincristina e Vimblastina da Vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), a camptotecina e seus análogos inicialmente descobertos na árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (ATANASOV et al., 2015).

Figura 14: Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer



Fonte: Sousa (2018)

Neste sentido, Ponci et al. (2015), clarifica que a busca por substâncias químicas para serem usadas em tratamentos contra o câncer envolve muitas vezes a descoberta de novos protótipos baseados em produtos naturais, como os exemplos citados anteriormente especialmente aqueles que são derivados de plantas, no qual esta perspectiva levou ao desenvolvimento de drogas usadas atualmente na terapia oncológica.

Desse modo, fica evidente que as pesquisas e os estudos focados em bioativos com atividade antitumoral derivadas de espécies brasileiras são essenciais, e devem ser incentivadas e estimuladas para que novas descobertas possam surgir, pois sabe-se que a grande diversidade de plantas no país podem proporcionar esses objetivos (MORAES et al., 2015).

3.4.1. Família Lauraceae

A pesquisa, desenvolvimento e a utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos, especialmente aqueles oriundos de plantas tem aumentado nos últimos anos, principalmente quando o foco é de compostos com potencial citotóxico e antitumoral, no qual a família Lauraceae é investigada por diversos pesquisadores (GRECCO, 2016; SOUSA, 2018). Esta família de plantas encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais do planeta, englobam cerca de 50 gêneros e várias espécies que se destacam nas Américas, Ásia, Austrália, Madagascar, sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros (QUINET et al., 2016; SOUSA, 2018) como exemplos a árvore da canfora, do louro e da canela representados na Figura 15.

Figura 15: Árvore de canfora, tronco de louro e canela



Fonte: Quinet et al. (2016)

Segundo Gonçalves et al. (2018) as espécies são caracterizadas por arbustos ou árvores, geralmente aromáticas, possuem folhas alternadas, simples, sem estípulas, com bordas inteiras e geralmente duras. Possuem importância ecológica significativa, visto que na Mata Atlântica há muitos representantes vegetais, evidenciando este bioma e a riqueza de espécies. A espécie conhecida popularmente como canela amarela evidenciada na Figura 16.

Figura 16: Família *Lauraceae* (*N. lanceolata* - canela amarela)



Fonte: Gonçalves et al. (2018)

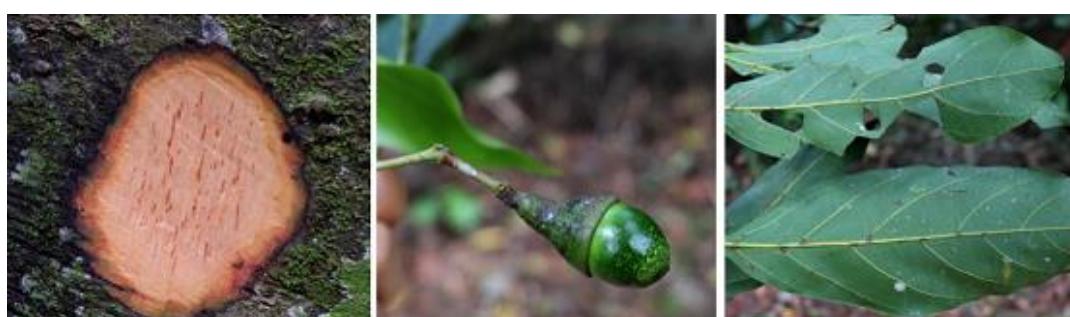
Na Figura 16-A é visualizada o ramo da árvore e na 16-B o disco do tronco recém-cortado da espécie canela amarela pertencente à família Lauraceae. Esta família possui grande importância econômica, no qual muitas espécies são utilizadas nas indústrias farmacêuticas, madeireiras e alimentícias. Alguns gêneros são utilizados na carpintaria e na construção civil, por apresentarem madeiras de boa qualidade (Figura 16-B), outros são amplamente utilizados na indústria alimentícia como por exemplo a canela e louro (GONÇALVES et al., 2018). Existem também gêneros que agregam valor comercial pois são usados na indústria de aromas e de cosméticos, muitas das espécies são endêmicas, inclusive algumas da Mata Atlântica como os gêneros *Aiouea*, *Aniba*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Licaria* e *Nectandra* conhecidas comumente como canelas (FONTANA; GASPER; SEVEGNANI, 2016).

3.4.2. Gênero *Nectandra*

Pertencente a família Lauraceae, encontra-se o gênero *Nectandra* que possui cerca de 120 espécies distribuídas mundialmente e no Brasil com 43 representantes, conhecida popularmente como canelas (GRECCO et al., 2016). Como já descrito anteriormente, do ponto de vista econômico, as espécies de *Nectandra* são importantes por apresentarem madeira de boa qualidade, sendo seu uso na construção civil e na indústria moveleira (SOUSA, 2018).

Em tratamentos caseiros através da utilização da medicina popular, é conhecida pelas propriedades farmacológicas tais como digestivas, antidiarreica, antirreumática, antifúngica, controle da febre e antiinflamatória (MACÍAS-VILLAMILZAR et al., 2015), algumas espécies de *Nectandra* são conhecidas como canelas, como está ilustrado na Figura 17.

Figura 17: Algumas espécies de *Nectandra* (canela)

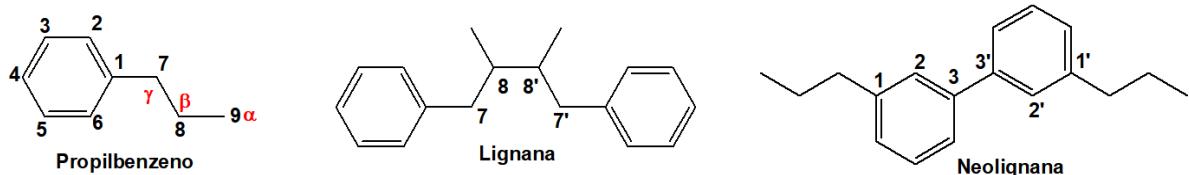


Fonte: <https://floradigital.ufsc.br/>.

Segundo Grecco et al. (2016) vários estudos comprovam quimicamente que o gênero *Nectandra* (Figura 17) é composto predominantemente por alcaloides e lignoides, seguidos por terpenoides, esteroides, fenilpropanoides e flavonoides. Contudo, a principal característica química é pela presença de lignanas e neolignanas que são bastante comum neste gênero *Nectandra* (MACÍAS-VILLAMIZAR et al., 2015).

A família das lignanas é um grande grupo de moléculas naturalmente abundantes que podem ser encontradas em uma infinidade de plantas superiores (CUI et al., 2020). O termo lignana foi definido pela primeira vez em 1936 por Haworth como dímeros fenilpropanóides consistindo em duas unidades fenilpropano (C6-C3) ligadas por seu carbono C8 central. Em 1972, Gottlieb introduziu o termo neolignana para abranger compostos de unidades de fenilpropano ligadas de uma maneira diferente de C8-C8' (Figura 18). Mais recentemente, foi proposto que micromoléculas com duas unidades proprilbenzeno acopladas de outras maneiras, deveriam ser nomeadas de “neolignanas”, onde podem ser encontradas em mais de 60 famílias de plantas e isoladas de diferentes partes da planta (RAO, 2012).

Figura 18: Esqueleto carbônico de lignana e neolignana



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Rao (2012)

De acordo com Souza, Nakamura e Corrêa (2012, p.198) “esses metabólitos são formados a partir do acoplamento oxidativo de duas unidades fenilpropanoides”. Assim, compreendem uma classe de produtos naturais com uma grande diversidade de estruturas químicas e atividades farmacológicas (SOUSA, 2018).

As lignanas são amplamente distribuídas no reino vegetal e podem ser encontradas nas raízes das plantas, rizomas, caules, folhas, flores, frutos, sementes, xilema e resinas. Até o momento, são encontradas mais de 200 lignanas clássicas e aproximadamente 100 neolignanas que já foram caracterizadas em estudos científicos. Os gêneros *Machilus*, *Ocotea* e *Nectandra* possuem esses constituintes químicos, que geralmente se apresentam como dímeros (molécula composta por duas unidades similares) (CUI et al., 2020).

Formam um grupo de produtos naturais proeminentes por apresentarem atividades biológicas e farmacológicas significativas como antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antiasmática, e por consequência destas características isso tem atraído um grande interesse em pesquisas, por apresentarem vários benefícios à saúde (SILVA, 2019).

3.5. Pesquisas com *Nectandra leucantha*

Nectandra apresenta várias espécies que têm sido utilizadas pelas pessoas através da medicina popular para tratar a inflamação e dor, como analgésico, antifúngico e antiprotozoário. Pode se dizer que seu uso é benéfico, pois possuem uma variedade de propriedades farmacológicas provenientes de suas estruturas químicas, que é relatado em estudos, através de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* que confirmam as propriedades biológicas descritas (GRECCO et al., 2016).

Neste viés, destaca-se a *N. leucantha* (Figura 19), que é uma espécie lenhosa, conhecida popularmente como canela branca ou canela seca, árvore endêmica do Brasil com predominância nos estados de MG, RJ, SP, PR e SC (SOUSA, 2018), abaixo a figura demonstra as flores e galhos da espécie:

Figura 19: *Nectandra leucantha*



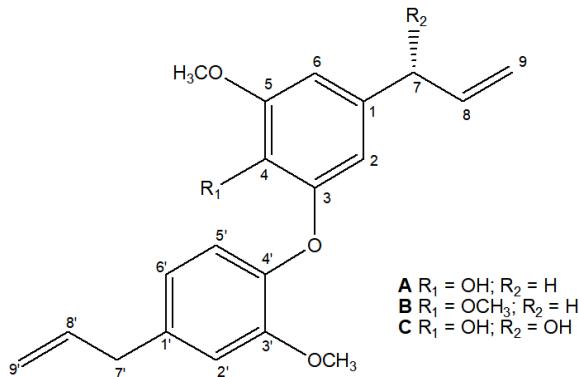
Fonte: Disponível em: <https://floradigital.ufsc.br>.

Nativa da Mata Atlântica, constata-se através de experimentos científicos que possui diversos bioativos, que são reportados atividades biológicas tais como ação antiparasitárias (Leishmaniose e Doença de Chagas) e antitumorais (SOUSA et al., 2017; GRECCO et al., 2017; GRECCO et al., 2018), tornando inédita e importante a investigação da aplicação destes compostos (GRECCO et al., 2019).

Costa-Silva et al. (2015) realizou o primeiro estudo experimental com os compostos obtidos da espécie, que foram caracterizados e identificados, destacando

a ocorrência de três neolignanas bioativas (Figura 20). Estes compostos mostraram potencial imunomodulatório e antiprotozoário, principalmente para formas amastigotas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*.

Figura 20: Estrutura das três neolignanas bioativas



Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Costa-Silva et al. (2015)

Do mesmo modo, Grecco et al. (2015) realizou pesquisas e experimentos através do isolamento de substâncias das folhas da espécie arbórea, onde os resultados identificaram um potencial citotóxico obtido através dos óleos essenciais existentes nas folhas de *N. leucantha*. Neste mesmo sentido, Grecco (2016) relatou que os estudos com o óleo essencial, bem como os extratos das folhas apresentaram também um excelente potencial antiparasitário, com efeitos importantes na Leishmaniose (antileishmania e antitripanossoma). De acordo com Grecco et al. (2017) os estudos realizados com a *N. leucantha* destacam a atividade antiparasitária, onde o mecanismo de ação do metabólito derivado e isolado das folhas eliminaram seletivamente os parasitas intracelulares sem ativação da célula infectada, eles possuem respostas satisfatórias frente a forma amastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (GRECCO et al., 2017).

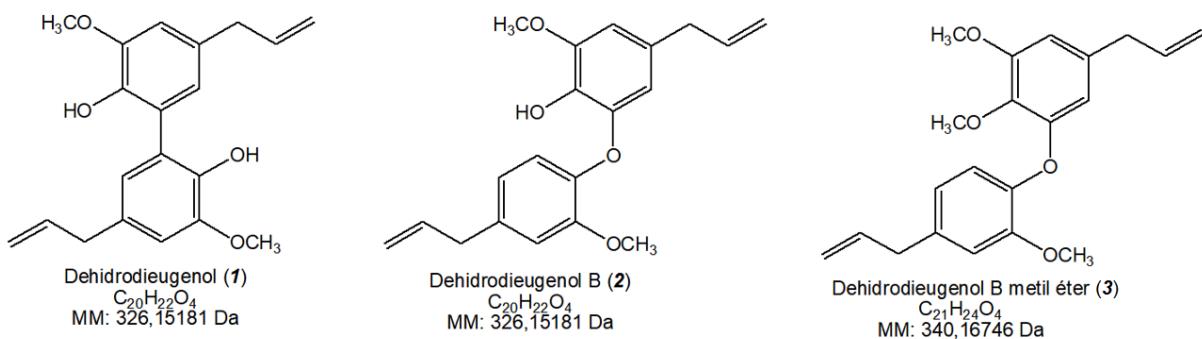
Igualmente Sousa et al. (2017) verificou o perfil citotóxico das neolignanas obtidas da *N. leucantha* frente ao melanoma, através de evidências substanciais em desencadear características apoptóticas prejudicando a organização do citoesqueleto, causando danos oxidativos no DNA e degradação por reações de alquilação, que superam o alto perfil de resistência apoptótica de células de melanoma.

Da mesma maneira, Ponci et al. (2020) realizou estudos experimentais com extratos hexânicos obtidos das folhas de *N. leucantha*, nos quais apresentaram resultados significativos e efeitos antiasmáticos em camundongos, esta ação

alcançada nos experimentos *in vivo* demonstram uma redução da inflamação e da hiperresponsividade das vias aéreas, com efeitos semelhantes aos da Dexametasona (fármaco com ação antiinflamatória), apresentando uma alternativa promissora para o tratamento da asma granulocítica mista.

Tendo em vista a capacidade farmacológica dos compostos isolados da *N. leucantha*, estudos relatam que esta espécie vegetal se torna uma importante fonte de obtenção de produtos bioativos, podendo ser um aliado no tratamento do câncer devido seu potencial citotóxico *in vitro* (GRECCO, 2016; SOUSA, 2018), comprovados pelos compostos dehidrodeugenol (1), seu isômero dehidrodeugenol B (2) , e seu derivado dehidrodeugenol B metil éter (3) (GRECCO et al., 2016) como se encontram dispostos na figura 21:

Figura 21: Compostos isolados da espécie *Nectandra leucantha*



Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Grecco et al. (2018)

Em conformidade com o assunto, os extratos da espécie através dos compostos citados acima, apresentaram bons resultados nos testes *in vitro*, demonstrando a atividade citotóxica em células de melanoma murino (B16F10), que apresentaram valores de IC_{50} para os compostos 1, 2 e 3 de $28,3 \pm 1,2$; $25,7 \pm 0,9$ e $75,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$ respectivamente (SOUSA, 2018). Os experimentos realizados *in vitro* com células tumorigênicas de melanoma murino (B16F10) determinaram que os compostos desempenharam um papel importante na indução de apoptose acessada por condensação e fragmentação de DNA, potencial transmembranar mitocondrial. Além disso, o composto dehidrodeugenol B pôde promover reações de alquilação em células tumorais, o que pode danificar o DNA ou outros nucleófilos das células (SOUSA et al., 2019).

A descoberta de novas substâncias vegetais em prol da melhoria ou cura de doenças é um assunto bastante pesquisado no meio científico, muitos estudos têm conseguido obter boas alternativas, porém o caminho é longo e com muitos percalços (MORADI et al., 2020). Dificuldades ainda são encontradas nos ensaios clínicos demonstrando que muitos bioativos não estão adequados para serem utilizados como futuros fármacos, pois sua eficácia pode ser limitada, onde as propriedades dos compostos muitas vezes não possuem a solubilidade ou biodisponibilidade necessária para serem administradas no corpo humano, por isso novas metodologias surgem com a intenção de melhorar essas características (BILIA et al., 2017).

*3.6. Estudos *in silico* no planejamento de novos fármacos*

Para o desenvolvimento de um novo fármaco, independente da origem da molécula com atividade farmacológica, seja natural ou sintetizada em laboratório, na maioria das vezes são necessárias modificações moleculares para que estes novos compostos apresentem propriedades biológicas aceitáveis (MEANWELL, 2011). De fato, milhares de moléculas são sintetizadas todos os anos, porém a grande maioria acaba sendo descartada nos estágios iniciais de pesquisa por não serem consideradas eficientes frente aos alvos para os quais foram construídas ou pela toxicidade (PANDEY et al., 2017). Portanto, são consideradas estruturas privilegiadas as moléculas que possuem afinidade por alvos biológicos e boas propriedades farmacológicas, para que tais compostos sejam considerados promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (SOARES, 2020).

Assim sendo, diferentes abordagens para o planejamento e a obtenção destes compostos são capazes de produzir grandes quantidades de dados que devem ser analisados de forma rápida e eficaz. Nesse contexto, os métodos em bioinformática têm papel fundamental, possibilitando a organização, o gerenciamento, a visualização e interpretação da informação gerada. O objetivo é estabelecer padrões de correlação entre os diversos eventos bioquímicos e celulares envolvidos no estado de doença (GONZÁLEZ et al., 2019).

Nas fases de planejamento de um fármaco são recomendados estudos denominados *in silico* (através de uma simulação computacional), que são realizados a partir da molécula em questão, visando verificar se a substância possui as propriedades necessárias para se tornar um fármaco (PRESS et al., 2019). Vários

estudos relacionados a farmacocinética e farmacodinâmica podem ser realizados, com a função de se certificar, a potencialidade da molécula alvo, ou seja, se a molécula estudada possui um bom perfil de biodisponibilidade no organismo. Para isso, são estudadas e analisadas as propriedades físico-químicas, conformacionais, assim como sua capacidade de interação com o receptor, mimetizando como o possível fármaco irá se comportar perante os órgãos (SILVA, 2015). Para tal, alguns desafios são enfrentados e vinculados a esta problemática, tais como, problemas com absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade denominado de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) (PRESS et al., 2019).

Em virtude disso, as moléculas devem apresentar alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade. Por sua vez, esses parâmetros ADMET podem ser avaliados separadamente por métodos computacionais (CARVALHO et al., 2019). Estudos sinalizam que a estimativa inicial de ADMET na fase de descoberta reduz drasticamente a fração de falhas relacionada à farmacocinética nas fases clínicas (PANDEY et al., 2017). Modelos computacionais têm sido fomentados como uma alternativa válida aos procedimentos experimentais para predição de ADMET, especialmente em etapas iniciais, quando as estruturas químicas investigadas são numerosas, mas a disponibilidade de compostos é escassa (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

As ferramentas computacionais são rotineiramente utilizadas para filtrar grandes bases de dados de modo que os compostos previstos para ter perfis aceitáveis de ADMET possam ser pesquisados e comparados com fármacos já existentes ou prever uma nova molécula que poderá ser utilizada (CARVALHO et al., 2019). De maneira geral, os métodos computacionais possuem vantagens e acabam por contribuir na redução de gastos e tempo em ensaios biológicos, auxiliando nos resultados que são mais efetivos. Dentre os parâmetros utilizados no estudo *in silico* para a previsão de um bom perfil de ADMET de um fármaco, destaca-se a chamada Regra dos 5 de Lipinski, que considera fatores de grande importância na identificação de moléculas promissoras (BRITO, 2011).

3.6.1. A regra dos cinco de Lipinski

Para a criação destas regras, Christopher A. Lipinski realizou um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observou que algumas propriedades físico-químicas

eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral (BRITO, 2011). Os resultados alcançados geraram a "Regra dos 5 de Lipinski (RO5)", que tem o intuito de auxiliar nas decisões relacionadas às modificações químicas e, assim, reduzir o número de compostos preparados com propriedades físico-químicas indesejadas (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018). De acordo com a RO5 as propriedades moleculares relevantes estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: As regras de Lipinski

Regra dos 5 de Lipinski (RO5)	
LogP	< ou igual a 5
Doadores de ligações de hidrogênio	< ou igual a 5
Aceptores de ligações de hidrogênio	< ou igual a 10
Peso molecular	< ou igual a 500

Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Santos; Gonsalves; Araújo (2018)

A RO5 estabelece que, para uma molécula ter potencial para se tornar um bom fármaco deve apresentar determinados valores, de acordo com os intervalos apresentados na Tabela 3, para os 4 parâmetros múltiplos de 5 (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018). Se os valores forem maiores que os determinados na RO5 provavelmente a molécula pesquisada terá uma má absorção ou permeação indevida desclassificando a substância para uso no corpo humano. Desta forma, as regras permitem uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas (CARVALHO et al., 2019).

Da mesma forma, é importante acompanhar outros elementos considerados como adicionais, e por isso várias melhorias acabaram por acrescentar outros parâmetros propondo resultados mais robustos. Dentre esses, inclui-se a área de superfície topológica polar (TPSA) que deve ser $\leq 140 \text{ \AA}^2$, no qual avalia a absorção tanto da barreira hematoencefálica como intestinal; LogS que é o coeficiente de solubilidade em meio aquoso, sendo bastante utilizado em estudos *in silico* de moléculas com biodisponibilidade, também a informação sobre o número de ligações rotáveis que deve ser ≤ 10 (SLIWOSK et al., 2014). Todos esses elementos corroboram para a avaliação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, e de semelhança com drogas, que se enquadram na área da química medicinal (CARVALHO et al., 2019).

Elementos como o coeficiente de partição entre *n*-octanol e água denominado de LogP o/w, é o descritor clássico para indicar a lipofilicidade (habilidade de um composto químico ser dissolvido em gorduras, óleos vegetais, lipídios em geral), que é uma propriedade físico-química importante em um fármaco, pois determina a capacidade da substância de atravessar membranas (CALDEIRA, 2015). Da mesma maneira a solubilidade em água, no qual uma molécula solúvel facilita muitas atividades para o desenvolvimento de drogas, principalmente a facilidade de manuseio e formulação (PANDEY et al., 2017). Além disso, para projetos de descoberta que visam a administração oral, a solubilidade é uma propriedade importante que influencia a absorção, da mesma forma, uma droga destinada ao uso parenteral deve ser altamente solúvel em água para fornecer uma quantidade suficiente de ingrediente ativo no pequeno volume de tal dosagem farmacêutica (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

Outra particularidade relevante é sobre os compostos serem substrato ou não substrato da glicoproteína de permeabilidade (P-gp), que é fundamental para avaliar o efluxo ativo através de membranas biológicas, por exemplo, da parede gastrointestinal para o lúmen, através da barreira hematoencefálica. Um dos principais papéis de P-gp é proteger o sistema nervoso central (SNC) dos xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo humano, como inseticidas, pesticidas, substâncias tóxicas, fármacos etc.). Também é importante ressaltar que P-gp é super expressada em algumas células tumorais e pode levar a cânceres multirresistentes (PEREIRA, 2019).

As enzimas da família citocromo P450 (CYPs) constituem uma superfamília de hemoproteínas oxidativas, que desempenham um papel chave no metabolismo de uma ampla variedade de xenobióticos, e podem ser encontradas em uma ampla variedade de espécies. São responsáveis pelo metabolismo de mais de 90% de todos os fármacos prescritos no mercado. As enzimas principais deste complexo que são expressas em diferentes níveis no fígado são a CYP1A2 (13%), CYP2C9 (20%), CYP2D6 (2%), CYP2C19 (5%), e CYP3A4 (30%) (SILVA, 2015).

Estes parâmetros são importantes pois podem melhorar as estimativas e chances de as moléculas serem futuros fármacos com propriedades farmacológicas eficazes (CARVALHO et al., 2019). Considerando a relevância da disponibilidade das drogas durante os ensaios clínicos, bem como as vantagens da via oral para a administração de fármacos, é muito importante que durante o desenvolvimento de

novas moléculas bioativas, seja verificado se a RO5 está sendo seguida ou violada em algum parâmetro (PEREIRA, 2019).

3.7. Programas de Modelagem Molecular

A modelagem molecular utiliza programas específicos de computador, alguns disponibilizados comercialmente e outros baixados gratuitamente em sítios de domínio público na Internet. As estratégias empregadas podem ser divididas em dois grandes grupos, o planejamento de fármacos baseado na estrutura dos ligantes (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) aplicado quando se dispõe de informações sobre a estrutura dos compostos bioativos e sobre suas atividades biológicas, e o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*), aplicado quando se dispõe também de informações sobre a estrutura do alvo bioquímico da ação dos compostos bioativos (BARROS, 2015). Qualquer que seja a estratégia escolhida para realizar o estudo, geralmente se inicia com o uso de programas para a construção de modelos de estruturas moleculares, que podem ser moléculas pequenas ou macromoléculas, como as proteínas (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Os estudos levam em consideração não apenas a química, mas significativamente a física para oferecer uma aproximação plausível da estrutura tridimensional e energia do sistema fármaco-alvo. Porém, vale salientar que o ramo da Modelagem Molecular é muito mais abrangente (PIMENTEL et al., 2013). Dependendo do tamanho do sistema a ser estudado, da finalidade e do tempo que se tem para que o cálculo seja feito, pode-se optar por uma abordagem clássica no qual o cálculo e resultados são rápidos (ESMAILE, 2019).

De acordo com Barros (2015), os métodos computacionais são utilizados como ferramentas no desenvolvimento de novos fármacos, visando o estudo das relações entre estrutura e atividade (SAR, do inglês *structure-activity relationships*), o estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês *quantitative structure-activity relationships*), e a investigação das possíveis orientações que uma determinada molécula pode assumir no interior do sítio ativo de um biorreceptor (*Docking Molecular*). No caso do *docking* molecular, possíveis moléculas bioativas são testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo (BARROS, 2015).

3.7.1. Docking molecular

Um dos procedimentos que mais se popularizou nos últimos anos, em estudos de química medicinal foi o ancoramento molecular (também denominado *docking* molecular). Além dos programas de acesso público e comerciais, há também servidores na internet disponíveis para o uso deste procedimento (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Também denominado como acoplamento molecular, é um procedimento computacional que apresenta potencial de prever a ligação não covalente de macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma macromolécula (receptor) e uma pequena molécula (ligante) de forma eficiente, com o objetivo de prever as conformações ligadas e a afinidade de ligação (BARROS, 2015).

A previsão da ligação de pequenas moléculas a proteínas é de particular importância prática porque é utilizada para rastrear bibliotecas virtuais de moléculas semelhantes a drogas, a fim de obter informações, principalmente do ponto de vista estrutural para o desenvolvimento de novas substâncias ativas. O *docking* molecular também pode ser empregado para prever a conformação de ligantes conhecidos (TROTT; OLSON, 2010).

Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. Em vista disso, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica (NUNES et al., 2016).

Por consequência, esta ferramenta permite que diversas estruturas moleculares de possíveis compostos bioativos sejam testadas a fim de obter um *screening* virtual, em que aquelas que se apresentarem como mais promissoras passam para as etapas de síntese e avaliação de suas atividades biológicas, acelerando a fase inicial do desenvolvimento de um novo fármaco e evitando o trabalho desnecessário de síntese e avaliação biológica de estruturas não promissoras (BARROS, 2015).

4



MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato de *Nectandra leucantha*

Os extratos das folhas de *N. leucantha* utilizados neste estudo, foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Grecco (2016). Sendo assim, as folhas foram coletadas em mar/2014 no Parque Ecológico do Perequê (Cubatão/SP), a coleta e identificação botânica foram realizadas em colaboração com o Prof. Me. Euder G.A. Martins e a exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da USP, sob o código EM 357 (SPF00215113). Após a secagem e moagem do material vegetal, 2,55 Kg deste foram submetidos a processos extractivos até exaustão, por meio de maceração com hexano. Após evaporação do solvente, sob pressão reduzida, foram obtidos 84,5 g de extrato bruto (NLH). Visando a remoção do material graxo e obtenção de uma fração enriquecida com neolignanas (NEF), parte do extrato hexânico (51,9 g) foi ressuspendido em hexano (500 mL) e particionado com acetonitrila (3 x 250 mL), ambas as fases foram separadas e os solventes evaporados sob pressão reduzida. A partir da fase em acetonitrila foram obtidas 31,6 g da NEF.

4.2. Fracionamento Cromatográfico

A fração enriquecida com neolignanas (NEF) foi analisada por CLAE/DAD/EM (λ 190 a 800nm e modo positivo), visando definir seu perfil cromatográfico e confirmar a presença das neolignanas de interesse. Parte da fração NEF foi submetida a fracionamento cromatográfico em fase reversa, utilizando coluna LoBar LiChroprep C₁₈ (40-63 μ m; Merck) como fase estacionária e solução etanólica a 50, 70, 90 e 100%, como fase móvel. As frações obtidas foram analisadas por CCDC (utilizando o sistema eluente Hex:AcOEt 7:3), e reagrupadas de acordo com a semelhança após revelação sob luz UV. Foram utilizados padrões dos compostos de interesse, visando identificar em quais frações eles se encontram.

4.3. Elucidação estrutural

Após o fracionamento, como descrito anteriormente, os compostos de interesse isolados foram submetidos a caracterização estrutural por meio de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas de alta resolução, a partir da análise por CLAE/DAD/EMAR. Os espectros de RMN ^1H , foram registrados em espectrômetro Ultrashield 300 Bruker Avance III, operando a 300 MHz, os quais foram obtidos em deuteroclorofórmio ($\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$), da Cambridge isotope Laboratories (99,96% de pureza) como solvente e padrão de referência interna.

4.4. Preparo dos Fenolatos Sódicos

Visando o aumento da hidrofilicidade dos compostos isolados, as neolignanas **1** e **2**, que apresentam em sua estrutura (s) fenólica(s) livre(s), foram submetidas a reação com metanolato de sódio, de acordo com o protocolo descrito a seguir, adaptado de Quincoces (2014) (QUINCOCES, 2014; QUINCOCES, 2018). Para obtenção de seus respectivos sais, foram dissolvidos 1 mol de sódio metálico em metanol absoluto “seco”, para cada mol de hidroxila fenólica livre. À essa solução de metóxido de sódio, foram adicionadas as neolignanas de interesse, de acordo com a quantidade sugerida acima. O meio reacional foi deixado sob refluxo, tempo suficiente para ocorrer a salinização de todo material de partida, que foi monitorada por CCDC (cromatografia em camada delgada). Tal procedimento foi realizado em colaboração do pesquisador Prof. Dr. José Agustín Quincoces Suarez.

4.5. Avaliação da atividade citotóxica – IC_{50} frente a linhagem de melanoma humano A375

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados na Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração da Dra. Fernanda Samara de Sousa. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada frente a linhagem celular de melanoma humano (A375). As células foram cultivadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou EMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA),

suplementado com 10 mM de ácido 2-hidroxietilpiperazina-N2 etanosulfônico (Hepes) (Sigma, St. Louis, MO), bicarbonato de sódio 24 mM (Sigma), 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, São Paulo), pH 7,2, e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). Para a determinação das concentrações inibitórias a 50% de morte, 1×10^4 células foram dispostas em placas de 96 poços em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 8h de inoculação, as células foram incubadas com os compostos ativos em diferentes concentrações variando de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou com o veículo de diluição dos compostos (MeOH) como controle negativo. Para acessar a viabilidade celular perante a incubação com os compostos bioativos, foi utilizado o método colorimétrico de MTT, baseado na medida da atividade metabólica da célula na presença das amostras em estudo, através da avaliação das atividades das enzimas mitocondriais presentes nas células viáveis ou vivas. Após o período de incubação com os compostos, foram adicionados 10 μL de solução de MTT (5 mg/mL) e as células foram incubadas por 3h a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de SDS 10% na solução celular com MTT e incubada por 24 h a 37°C. A absorbância será obtida em leitor de placas (SpectraMax® - M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 570 nm com um filtro de referência a λ 650 nm. A inibição do crescimento de 50% das células tumorais foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC_{50} .

4.6. Análise conformacional

A otimização estrutural foi realizada pelo método AM1 implementado no pacote do software de química quântica semi-empírica MOPAC 2016. Os arquivos contendo as informações tridimensionais de cada estrutura, assim como as informações de carga de potencial eletrostático, foram os arquivos de entrada visualizados pelo software Jmol. Através da conformação mais estável obtida para cada composto, os valores de energia dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) foram determinados e extraídos através do software Jmol. Os mapas de potencial eletrostático molecular (MPEs), obtidos através de um conjunto de cargas pontuais que representa o potencial quântico molecular de pontos definidos em torno da molécula, foram obtidos e puderam ser visualizados, também pelo software Jmol. Os dados das energias orbitais, cargas parciais de momento dipolo e volume atômico foram utilizados na

análise comparativa através da qual se pretendia realizar estudos qualitativos da estrutura química e da atividade biológica (SAR).

4.7. Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas ADMET

Para avaliar as propriedades farmacocinéticas, físico-químicas e Druglikeness dos compostos, a estrutura 2D dos compostos foi desenhada no Chemdraw Ultra 12.0. Cada estrutura foi importada e a estrutura SMILE foi inserida na interface do site (<http://swissadme.ch/>).

4.8. Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando o AutoDockTools, versão 4.2 e disponível no endereço <http://autodock.scripps.edu/> para download gratuito. A estrutura cristalina do receptor foi obtida na base de dados do PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). A primeira etapa do processo envolveu o preparo dos arquivos de *input* do alvo molecular e do ligante. O alvo molecular foi preparado removendo, a parte que não codifica a macromolécula, as cadeias repetidas, e as moléculas de água, de acordo com o descrito por Umar e col. (2020) (UMAR et al., 2020). A partir destas modificações foi gerado um arquivo com a extensão PDBQT, necessário para os cálculos do AutoGrid e para realização do *docking* molecular. Para a preparação do ligante, obteve-se primeiramente o modelo tridimensional, otimizado mediante emprego de metodologia semi-empírica AM1, com auxílio do software MOPAC.

Através da conformação mais estável obtida, o ligante foi salvo na extensão MGF e posteriormente convertido em um arquivo PDBQT com auxílio do software OpenBabel capaz, de realizar a conversão de arquivos moleculares. A segunda etapa foi a parametrização para realização dos cálculos através do *AutoGrid*, utilizando a ferramenta *AutoDockTools*. Com o arquivo do ligante e do alvo parametrizados, o menu Grid foi selecionando, a macromolécula indicada e que em seguida foi salva na extensão PDBQT. Na sequência, foi definido o espaço tridimensional de procura dentro do qual o ligante tenta ligar-se à estrutura da proteína. Por se tratar de um estudo novo, toda a área da macromolécula foi selecionada. Para a terceira etapa do processo foram utilizados os arquivos preparados referentes ao alvo molecular, ao

ligante e o arquivo com os parâmetros do Grid. Como saída, foi definido um arquivo de extensão DLG no qual foram informados os resultados encontrados no *docking*. Os resultados foram analisados com auxílio do software *Discovery Studio Visualizer*, em sua versão gratuita.

5



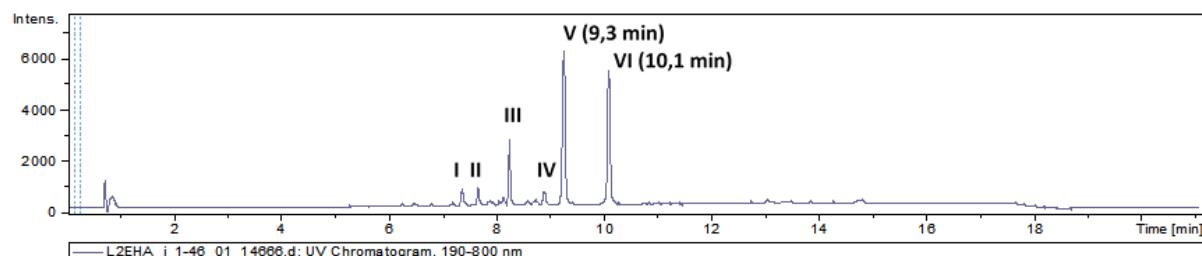
RESULTADOS DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fracionamento Cromatográfico e elucidação estrutural

O fracionamento cromatográfico foi realizado como descrito anteriormente, onde a fração NEF foi analisada por CLAE/UV/EM (modo positivo). De acordo com os resultados obtidos na Figura 22, pode-se observar o cromatograma da fração NEF com seis picos (**I** a **VI**), sendo os dois de maior tempo de retenção, os majoritários.

Figura 22: Cromatograma da fração NEF obtido por CLAE/DAD/EM (λ 190 a 800nm).

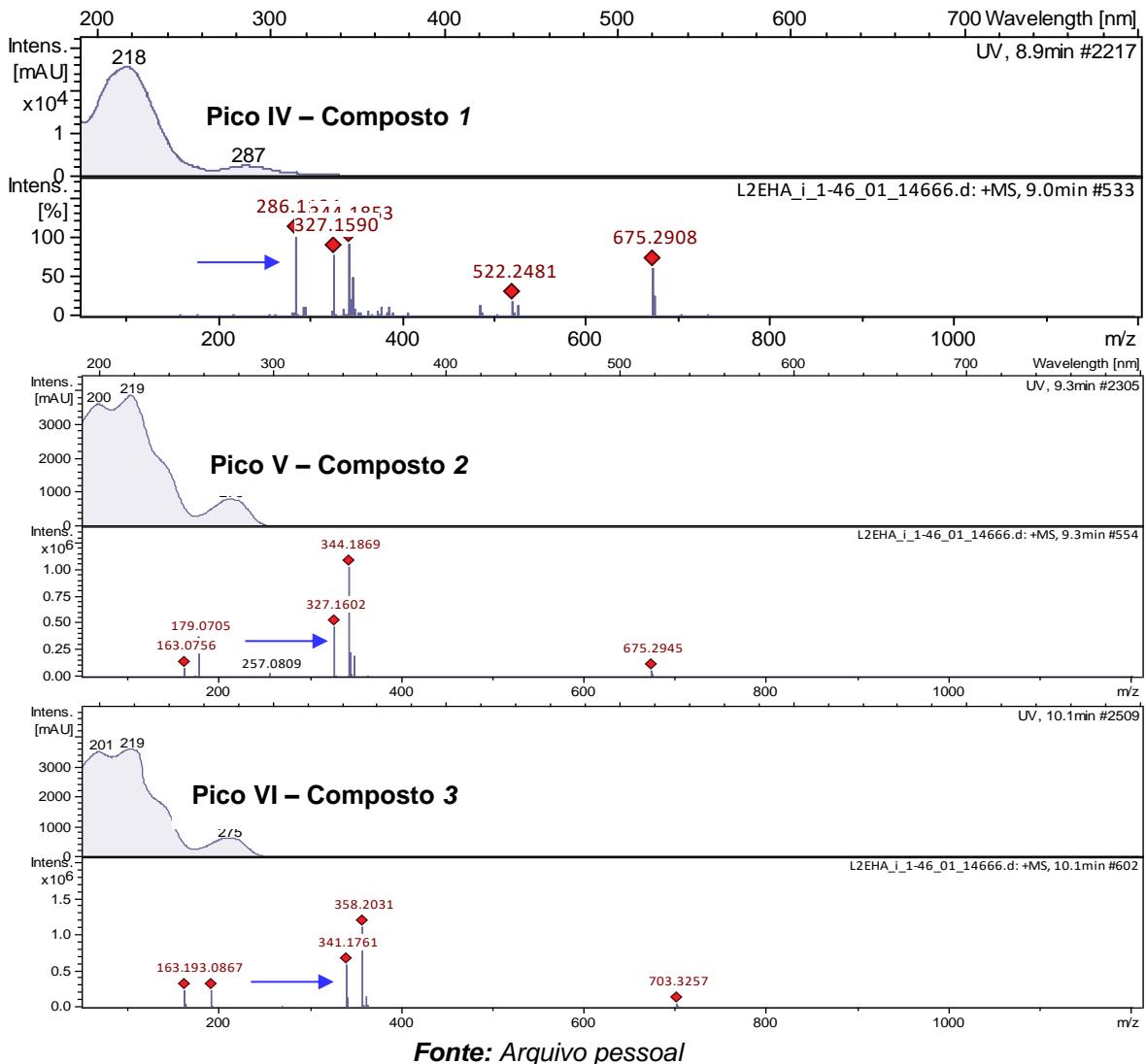


Fonte: Arquivo pessoal

Por meio dos espectros de massas de alta resolução dos picos **IV** (t_R 8,9 min) **V** (t_R 9,3 min) e **VI** (t_R 10,1 min) foi possível observar sinais referentes aos íons pseudo-moleculares em m/z 327,1590 [$M + H$]⁺ e em 344,1853 [$M + NH_4$]⁺ e 675, 2908 [2 $M + Na$]⁺ para **IV**; m/z 327,1602 [$M + H$]⁺ e em 344,1869 [$M + NH_4$]⁺ e 675, 2945 [2 $M + Na$]⁺ para **V**; e em m/z 341,1761 [$M + H$]⁺, 358,2031 [$M + NH_4$]⁺ e 703.3257 [2 $M + Na$]⁺ para **VI**. Sendo assim foi possível confirmar a presença das neolignanas bioativas de interesse, sendo os isômeros **1** e **2** nos picos **IV** e **V** ($C_{20}H_{22}O_4$) respectivamente, e o composto **3** no pico **VI** ($C_{21}H_{24}O_4$), como observados nos espectros abaixo, na Figura 23, que se encontra na próxima página.

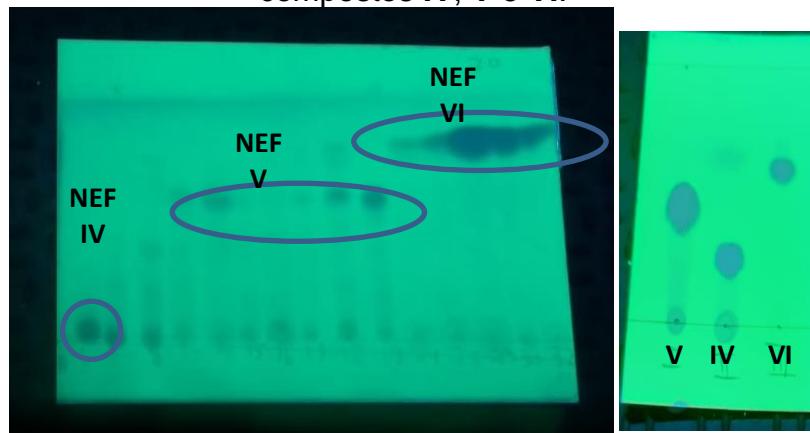
Após a confirmação da presença dos compostos de interesse na fração NEF, ela foi submetida a fracionamento cromatográfico em fase reversa. Deste processo foram recolhidas 147 frações (5 mL cada). As frações obtidas foram analisadas por CCDC e foram reagrupadas em 17 grupos (NEF A – NEF O), de acordo com a semelhança após revelação sob luz UV (Figura 24), e em comparação aos seus respectivos padrões, os compostos **IV**, **V** e **VI** foram identificados nas frações NEF IV (5 mg), NEF V (74,26 mg) e NEF VI (15,17 mg).

Figura 23: Espectros de UV e EM dos picos **IV**, **V** e **VI**, obtidos por CLAE/DAD/EM (modo positivo).



Fonte: Arquivo pessoal

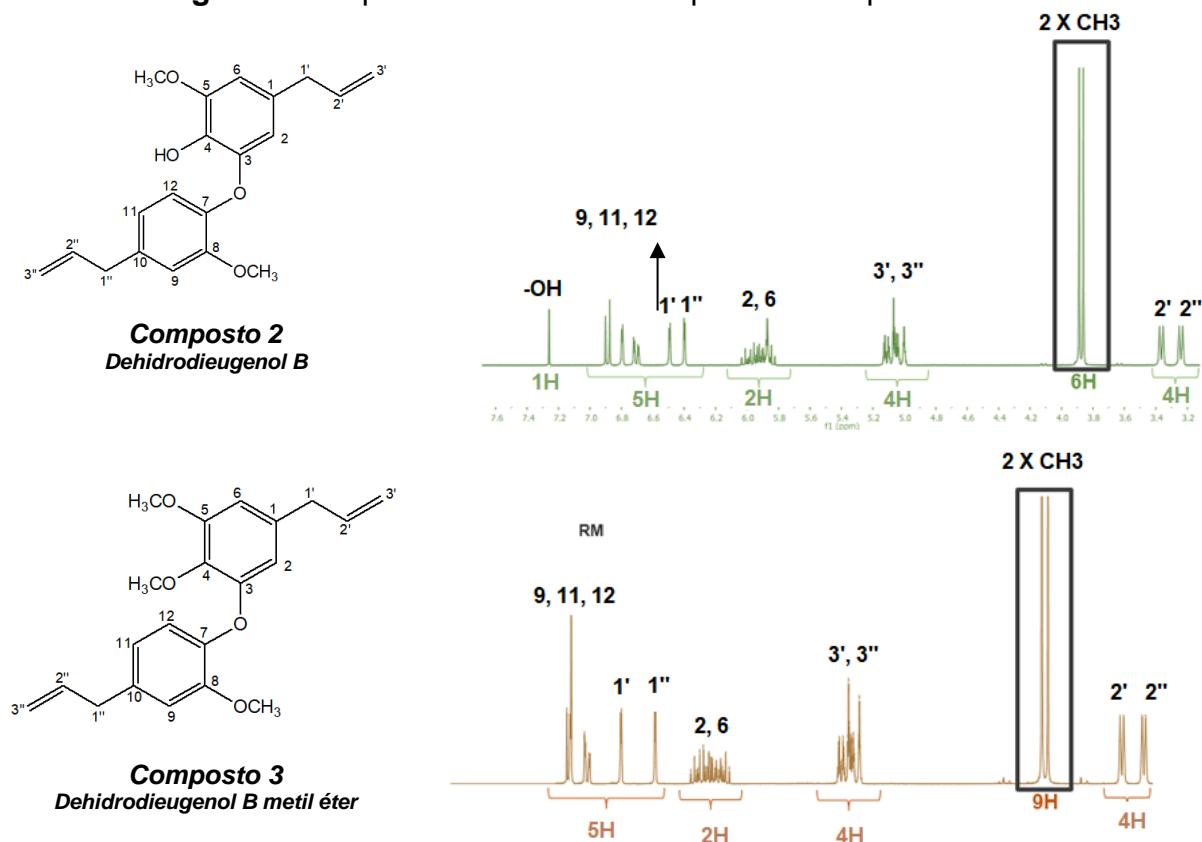
Figura 24: Placas CCDC do fracionamento do extrato NEF e dos padrões dos compostos **IV**, **V** e **VI**.



Fonte: Arquivo pessoal

Frente a esses resultados, somente os grupos e NEF VI, correspondente ao composto **2**, e NEF V, correspondente ao composto **3** foram analisados por RMN ^1H , devido a quantidade em massa ser suficiente para realizar a análise.

Figura 25: Espectros de RMN de ^1H para os compostos **2** e **3**



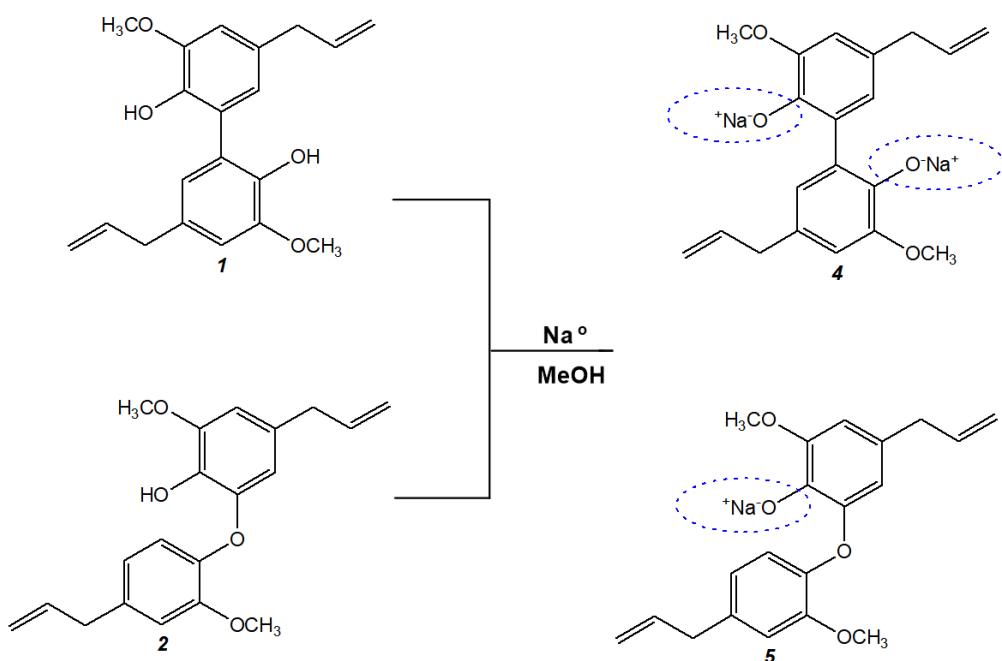
Fonte: Arquivo pessoal

Os espectros de RMN de ^1H para os compostos **2** e **3**, apresentaram respectivamente dois dupletos na região entre δH 6,0 e 7,0 referentes a hidrogênios de anéis aromáticos tetrassubstituídos (2H, H₂/H₆), e sinais entre δH 6,7 e 6,9, referentes aos sistemas aromáticos trissubstituídos (3H, H₉/H₁₁/H₁₂). Foram observados dois dupletos entre δH 3,2 e 3,4 (4H, H_{2'}/H_{2''}) e dois multipletos, um entre δH 5,9 e 6,0 (4H, H_{1'/}H_{1''}) e outro multipletos entre δH 5,0 e 5,1 (4H, H_{3'/}H_{3''}), referentes as duas cadeias alílicas. Além desses sinais, em ambos os espectros de foram observados dois singletos entre δH 3,8 e 3,9. Entretanto a única diferença entre os compostos **2** e **3**, foi a integral destes singletos, para **2** foram atribuídos 6H, enquanto para **3**, 9H, relativos a dois e três grupos metoxílico, respectivamente. Tais informações, em comparação aos dados encontrados em literatura, comprovaram o isolamento e caracterização dos compostos de interesse, **2** em NEF V e **3** em NEF VI.

5.2. Preparo de Derivados Salinos

Devido à característica lipofílica dos compostos isolados neste trabalho, para os compostos **1** e **2**, uma vez que são os únicos que possuem hidroxila fenólica livre, visando o aumento da biodisponibilidade, por meio do aumento da hidrofilicidade, foi utilizada a estratégia de semi-síntese para obtenção dos respectivos fenolatos de sódio **4** e **5** (Figura 26).

Figura 26: Esquema geral para obtenção dos fenolatos sódicos **4** e **5**



Fonte: Elaborado pelo autor

5.3. Avaliação da atividade citotóxica – IC_{50}

Os fenolatos sódicos (**4** e **5**), bem como seus precursores, foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica, contra a linhagem tumoral de melanoma humano (A375). Sendo que **2** e **3** exibiram IC_{50} de 110,3 e 57,2 μM contra a linhagem tumoral de melanoma humano A375, respectivamente. Por outro lado, seus derivados salinos foram inativos nas concentrações máximas testadas ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$) em comparação com todas as cepas testadas. Os compostos **2** e **3** apresentaram resultados significativos para a linhagem tumoral de melanoma humano A375. Inclusive, é importante observar que o composto **3** teve uma melhor atuação inibitória para a

linhagem humana A375, quando comparado aos resultados obtidos pelo mesmo composto para a linhagem de melanoma murino B16F10.

Os resultados obtidos foram comparados com alguns medicamentos anticâncer já comercializados, e representados na Tabela 4.

Tabela 4: Comparação dos valores de IC₅₀ determinado para medicamentos contra a linhagem tumoral de melanoma humano A374

COMPOSTO	IC ₅₀ (μ M)	FONTE
Axitinib	30,84	CancerDR: Cancer Drug Resistance DataBase
Bicolutamida	71,46	
Cisplatina	525,12	
Doxorrubicina	0,01	
Pazopamibe	41,07	
Plaquitaxel	0,00715	
2	110,3	
3	57,2	

Fonte: Adaptado de CancerDR: Cancer Drug Resistance DataBase. Disponível em:
crdd.osdd.net/raghava/cancerdr/submitkey_a.php?ran=1434

Como é possível observar, os resultados alcançados se mostram mais promissores em relação a alguns medicamentos, quando testados para a mesma linhagem tumoral de melanoma humano A375. Entretanto, apesar dos bons resultados, os valores encontrados para os compostos **2** e **3** não superam outros medicamentos também já aprovados e utilizados na terapêutica.

Os valores inibitórios encontrados através do ensaio de MTT mostram também que, os derivados **4** e **5** não apresentaram resultados inibitórios significativos, e por este motivo, ressalta-se alguns pontos importantes, em relação a atividade biológica de compostos hidrossolúveis.

Apesar da hidrofilicidade ser um parâmetro importante quando o propósito é o desenvolvimento de compostos ativos que serão administrados, uma vez que não é possível administrar um fármaco ou qualquer veículo oleoso, por via endovenosa, por exemplo, moléculas altamente polares costumam não serem bem absorvidas. Este fato, pode ser constatado claramente ao observar, por exemplo, o baixo potencial de absorção de medicamentos como a gentamicina, vancomicina e calcitonina, as quais são drogas polares com baixa disponibilidade oral. Ainda em relação a gentamicina,

vancomicina e calcitonina, foi observado que sua absorção também é baixa, quando elas são administradas pela via endovenosa (BOWE et al, 2007). Além disso, espécies iônicas apresentam normalmente baixa absorção lipídica (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012)

Por outro lado, algumas substâncias ativas hidrofílicas já demonstraram ter uma alta eficácia no transporte através das barreiras lipídicas, resultando em efeitos biológicos importantes (CARPENTIERI-RODRIGUES, 2007). Diversos estudos sugerem que moléculas hidrofílicas geralmente requerem algum tipo de sistema de transporte seletivo para cruzar a bicamada lipídica. Com o objetivo de compreender os resultados obtidos, estudos computacionais sobre as características físico-químicas, farmacocinéticas e conformacionais foram conduzidos.

5.4. Propriedades Físico-Químicas

As propriedades físico-químicas de compostos ativos, desempenham um papel importante tanto para o desenvolvimento de novos compostos, como para o melhor entendimento da capacidade de interação o sítio alvo, mesmo para compostos já conhecidos, visto que a substância passa por diversos processos biológicos, que dependem diretamente destas propriedades, estando diretamente relacionadas a boa interação dos compostos na fase farmacocinética, que envolve a absorção, distribuição, metabolização e eliminação. Dentre as principais propriedades físico-químicas estão, o coeficiente de partição, que expressa a relação entre a hidrofilicidade e a lipossolubilidade (LogP), a massa molecular (MM), a quantidade de aceptores de ligação de hidrogênio (HBSAs), assim como a quantidade de doadores de ligação de hidrogênio (HBDs), e a área de superfície polar topológica (TPSA) (ABEL et al., 2017).

Analisando os valores de massa molecular (MM) calculada para cada compostos, encontram-se valores entre 326 e 370 g/mol. A MM é um fator de extrema importância no estudo de relação estrutura química versus atividade biológica, pois é considerado como consenso que quanto menor a massa melhor a difusão destas substâncias no organismo, uma vez que compostos de alta massa molecular podem ter sua difusão diretamente afetada. A grande maioria das drogas no mercado tem pesos moleculares entre 200 e 600 Dalton, sendo a maioria <500 (BOS, 2000). Nesse sentido, todos os compostos avaliados apresentam resultados favoráveis.

As ligações rotáveis (RB) são uma medida de flexibilidade molecular importante na determinação da biodisponibilidade oral dos medicamentos. Apenas 4% das moléculas utilizadas para fins terapêuticos, não têm ligações giratórias, enquanto 32% têm 1-10 ligações giratórias e 47% das moléculas têm entre 36-50. O valor médio para a distribuição de ligações rotativas descrito, são de 27, com o número máximo de ligações rotativas em uma molécula de metabólito sendo 83 (KHANNA, 2009). Dentre os padrões mais conhecidos e aceitos dentro da química medicinal, entende-se que uma molécula promissora não pode apresentar mais do que 10 RB (VEBER et al., 2002), e neste sentido, as moléculas estudadas estão dentro do aceito.

No estudo também foram obtidos os números de aceitadores (HBAs) e doadores de ligação de hidrogênio (HBDs), que desempenham um papel crucial na determinação da especificidade da interação do ligante. Os doadores de ligações de hidrogênio são determinados pela contagem do número de ligações OH e NH em cada molécula. Já os aceitadores de ligações de hidrogênio, são principalmente grupos como, vinilsulfonas e carbonilas α e β -insaturadas. Os compostos estudados, apresentam números de HBAs e HBDs, dentro da média esperada, para fármacos que apresentam boa biodisponibilidade oral.

Em relação a TPSA, que é definida como a soma da superfície de todos os átomos ou moléculas polares, principalmente oxigênio e nitrogênio, incluindo também seus átomos de hidrogênio ligados, e obtido como a área de superfície de Van der Waals, é um parâmetro dentro da química medicinal comumente empregado para a otimização da capacidade da substância em permear células.

A título de orientação, os medicamentos ativos por via oral que são transportados pela via transcelular não devem exceder um TPSA de 120\AA^2 . Da mesma forma, para uma boa penetração cerebral de fármacos no SNC, esse número deve ser adaptado para TPSA $<100\text{\AA}^2$. Considerando estas informações, é possível verificar que os quatro compostos estudados também se encaixam nos parâmetros desejados, para que a substância seja bem absorvida e distribuída. A Tabela 5 apresenta os resultados calculados para os derivados **1, 2, 3, 4 e 5**, suas principais propriedades físico-químicas e farmacocinéticas.

Tabela 5: Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos

Sigla	Composto	Propriedades Físico-Químicas					Propriedades Farmacocinéticas (ADME)							
		MM (g/mol)	RB	HBDs	HBAs	TPSA (Å ²)	LogP	TGI	BHE	CYP 1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
1		326,39	7	2	4	58,92	4,22	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
2		326,39	8	1	4	47,92	4,44	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
3		340,41	9	0	4	36,92	4,75	Alto	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
4		370,35	7	0	4	64,58	-1,90	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não
5		348,37	8	0	4	50,75	1,52	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Composto 1: Dehidrodieugenol. Composto 2: Dehidrodieugenol B. Composto 3: Dehidrodieugenol B metil éter. Composto 4: Derivado Dissódico do Dehidrodieugenol. Composto 5: Derivado Monosódico do Dehidrodieugenol B; MM (g /mol) massa molecular; RB Número de ligações giratórias; HBDs número de grupos doadores de hidrogênio; HBAs aceitadores de hidrogênio; TPSA Å² área de superfície polar; LogP coeficiente de lipofilicidade; TGI trato gastrointestinal; BHE Barreira hematoencefálica; CYP isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase Sim: inibidor da enzima/ Não: não é inibidor da enzima.

Outro parâmetro analisado foram os valores de LogP para os compostos **1, 2, 3, 4 e 5**. A lipofilicidade é possivelmente a propriedade físico-química mais importante de um potencial composto ativo, pois desempenha um papel na solubilidade, absorção, penetração da membrana, ligação às proteínas plasmáticas, distribuição, penetração do SNC e partição em outros tecidos ou órgãos como o fígado e tem um impacto no rotas de liberação. Um levantamento realizado mostra que, mais de 50% dos compostos ativos apresentam valores de LogP entre 4,25 e -4,75, entretanto a literatura clássica, assim como a RO5 também sugere que, compostos potencialmente ativos, devem apresentar valores de LogP acima de 1 e abaixo de 5 (OPREA, 2002). Em relação a resultados negativos de LogP, é reportado que o composto tem uma afinidade maior pela fase aquosa, o que com certeza dificultara sua interação com a membrana fosfolipídica das células.

Considerando os parâmetros que tratam do LogP, concluímos que, os compostos **1, 2, 3 e 5** apresentaram valores de LogP satisfatórios, já o fenolato **4** apresentou, um valor abaixo do esperado, sinalizando uma possível interferência na sua absorção e interação com as células tumorais estudadas, e consequentemente um resultado inibitório insatisfatório. Sugerimos que, os compostos mais hidrossolúveis não foram capazes de ultrapassar a membrana das células estudas, resultando em uma baixa atividade. Já quando consideramos os descritores clássicos e a RO5 em relação ao LogP, somente o composto **4** está fora do esperado. Neste sentido, entendemos que, apesar do composto **4** ter um valor de LogP ainda dentro dos parâmetros aceitáveis, trata-se de um composto iônico, que normalmente tem dificuldade de ultrapassar as barreiras celulares.

5.5. Propriedades Farmacocinéticas

Nos estudos farmacocinéticos avaliou-se a potencial absorção através do trato gastrointestinal (TGI), o potencial que a substância tem de atravessar ou não a barreira hematoencefálica (BHE), e as possíveis interações com algumas enzimas do complexo citocromo P450 (CYP). Os resultados encontrados mostram que, os cinco compostos estudados têm potencial para ter uma alta absorção pelo trato gastrointestinal. Entretanto a permeabilidade através da BHE, dos compostos **4 e 5** é baixa, o que está relacionado a suas características iônicas, e aos valores do LogP encontrados.

Para a avaliação dos resultados de metabolismo foi considerado, a interação com alguma enzima do complexo citocromo P450 (CYP). Substâncias que inibem dois ou mais CYP, em especial o CYP3A4 e o CYP2C9, podem interferir no metabolismo de muitos fármacos e outras substâncias, podendo contribuir para elevação da sua toxicidade. Para substâncias que inibem apenas uma CYP, pode ocorrer redução do número de fármacos que possuem interação farmacocinética com este complexo. Substâncias não inibidoras e não indutoras de CYP são consideradas substâncias ideais, pois não interferem no metabolismo de outros fármacos (DOLABELA et al., 2018).

Considerando estas informações e os resultados obtidos, os compostos **1**, **2** e **3** apresentam potencial para contribuir no metabolismo de outras substâncias ativas que são metabolizadas pelo complexo CYP, o que poderia indicar a princípio uma ação tóxica. Já os derivados **4** e **5** não apresentaram potencial para interagir com quaisquer enzimas do complexo CYP, sugerindo um baixo potencial tóxico.

5.6. Druglikeness

Com a necessidade de rápida identificação de novos compostos farmacologicamente ativos pela indústria farmacêutica de alta produção, nos últimos anos o conceito de "semelhança com drogas" ou *druglikeness* tornou-se foco para seleção de novas substâncias. Atualmente, várias abordagens têm sido desenvolvidas para avaliar a fármaco-similaridade/semelhança de compostos bioativos a partir de descritores topológicos, impressões digitais da estrutura molecular e outras propriedades físico-químicas. As bases utilizadas como parâmetros pelo software utilizado nesse trabalho são: Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge.

5.6.1. Parâmetros de Lipinski

O químico farmacêutico Christopher Lipinski e sua equipe analisaram as propriedades físico-químicas de diversas substâncias ativas, e concluíram que um composto é mais provável que seja membrana permeável e facilmente absorvido pelo organismo se ele corresponde a seguinte critério: o seu peso molecular é inferior a 500; a lipofilicidade dos compostos expressa como uma quantidade conhecida como o LogP seja inferior a 5; o número de grupos na molécula que pode doar átomos de

hidrogênio para ligações de hidrogênio seja inferior a 5; e o número de grupos que podem aceitar átomos de hidrogênio para formar ligações de hidrogênio seja menor que 10 (LIPINSKI, 2004). Segundo esses parâmetros, nenhum dos compostos avaliados apresentou qualquer violação.

5.6.2. Filtro de Ghose

O filtro de Ghose considera os seguintes critérios para aceitação de um composto como druglikeness: logP entre -0.4 e 5.6; refratividade molar deve estar entre 40 e 130 mol⁻¹; peso molecular de 160 a 480 g/mol, número de átomos deve estar entre 20 e 70 e a área de superfície polar inferior a 140 Å². Nesses parâmetros os compostos aceitos foram o **1**, **2** e **3**. Já os derivados **4** e **5** apresentam uma violação em relação ao seu valor de LogP.

5.6.3. Regras de Veber

De acordo com as regras de Veber, um composto tem chance de se tornar um fármaco desde que: a possibilidade de rotação da ligação seja igual ou menor que 10; e que a área de superfície polar seja menor ou igual a 140 Å². Sendo assim, nenhum dos compostos avaliados apresentou qualquer violação (MUEGGE, 2001).

5.6.4. Modelo de Egan

Utilizando dados da literatura sobre fármacos bem absorvidos e mal absorvidos, criaram um modelo computacional geral para a absorção intestinal passiva humana. Para isso foi considerado: os valores de solubilidade; os valores para o LogP; a área de superfície polar; o número de rotações das ligações e o peso molecular. Todos os compostos avaliados apresentaram resultados adequados para estes parâmetros (MUEGGE, 2001).

5.6.5. Filtro de Muegge

Baseia-se na observação de não-fármacos que são frequentemente desfuncionalizados e em fármacos já aceitos. O filtro assegura que os compostos

tenham um número de pontos farmacofóricos como, por exemplo, aminas, amidas, cetonas, sulfonas e ésteres, que possuam capacidades de ligação de hidrogénio essenciais para interações com seus alvos. Além disso, considera parâmetros físico-químicos para sua avaliação de potencialidade. Os compostos **3**, **4** e **5** apresentaram violação em relação aos parâmetros de LogP.

5.6.6. PAINS (Compostos de Interferência)

Os compostos de Interferência PAINS, do inglês **Pan Assay INterference compoundS**, são definidos pela sua capacidade de mostrar atividade através de uma gama de plataformas de ensaio e contra uma gama de proteínas. As causas mais comuns da atividade de não desejável são: quelação de metal, agregação química, atividade redox, fluorescência composta, oxidação de cisteína ou ligações inespecíficas. Muitos PAINS têm múltiplas funcionalidades, causando diferentes tipos de interferência e resultando em atividade *in vitro* e *in vivo* não desejadas. Nenhum dos compostos estudados apresentaram características de PAINS.

5.6.7. Lead-likeness

Lead-likeness avalia a similaridade de moléculas com compostos líderes ou candidatos a fármacos (*leads*), visando otimização estrutural após identificação da atividade. É importante ressaltar que *leads* geralmente apresentam menor complexidade estrutural que os fármacos. Existem inúmeras definições e valores para se definir lead-likeness, porém os mais utilizados são: MM ≤ 250Da; LogP ≤ 3, HBD ≤ 3 e área de superfície polar (PSA) ≤ 70 Å², e ligações rotáveis ≤ 7.

Seguindo esses parâmetros, os quatro compostos apresentaram violações. O composto **1** foi sinalizado, pois apresenta um valor de LogP maior do que 3. Os compostos **2** e **3** apresentaram dois sinais em relação ao valor de LogP ≥ 3 e mais do que 7 ligações rotáveis. O sal dissódico **4** apresentou um resultado fora do indicado, em relação a massa molecular ≥ 250Da. E finalmente o composto **5**, com uma indicação sobre o número de ligações rotáveis acima de 7. Considerando estes resultados isoladamente, nenhum composto foi considerado como promissor para se tornar um fármaco, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros de Violações e de *DrugLikeness*

Sigla	Composto	Número de Violações					PAINS	<i>Lead-likeness</i>
		Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge		
1		0	0	0	0	0	0	1
2		0	0	0	0	0	0	2
3		0	0	0	0	1	0	1
4		0	1	0	0	1	0	1
5		0	1	0	0	1	0	1

Fonte: Elaborado pelo autor

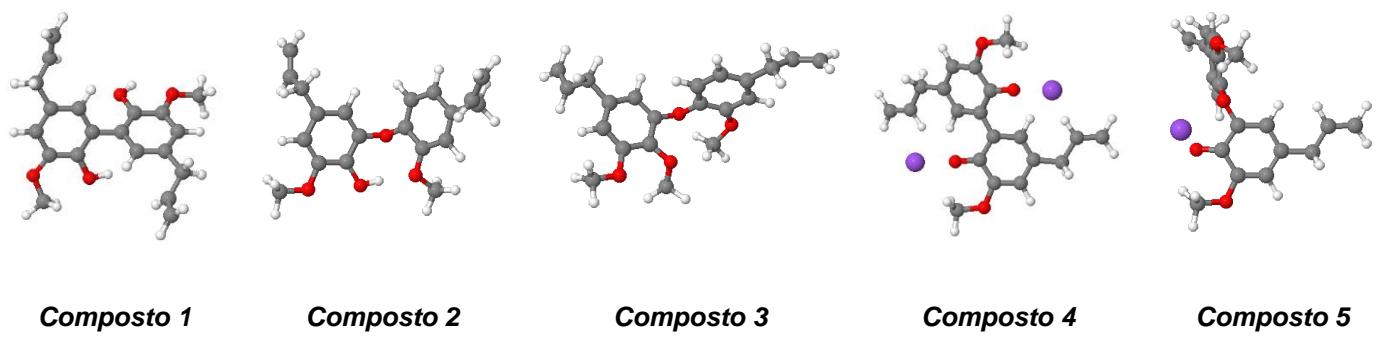
Legenda: Composto 1: Dehidrodieugenol. Composto 2: Dehidrodieugenol B. Composto 3: Dehidrodieugenol B metil éter. Composto 4: Derivado Dissódico do Dehidrodieugenol. Composto 5: Derivado Monosódico do Dehidrodieugenol B; Parâmetros de violações. PAINS Compostos de Interferência e *Lead-likeness* semelhança de chumbo.

5.6.8. Análise conformacional e mapa de potencial eletrostático (MPE)

A busca conformacional é importante para identificar confôrmeros, que é um pré-requisito para bons resultados em uma ampla gama de métodos de modelagem. Os parâmetros eletrônicos são um dos principais fatores que governam a interação fármaco-receptor. Neste sentido, o MPE ajuda a compreender a contribuição eletrostática dos compostos para a atividade, além disso, a amostragem adequada é extremamente importante nos cálculos de *docking* molecular e pequenas mudanças nos parâmetros de pesquisa podem ter um efeito significativo em seu desempenho (CASTRO-ALVAREZ; COSTA; VILARRASA, 2017).

O MPE é um dos descritores mais utilizados nos estudos e pretende revelar o tamanho molecular total e a localização dos potenciais eletrostáticos na molécula. Inicialmente a estrutura dos compostos foi otimizada com auxílio do software MOPAC com o modelo semi-sempiríco AM1. As estruturas mais estáveis são apresentadas na Figura 27.

Figura 27: Estruturas otimizadas dos compostos 1, 2, 3, 4 e 5



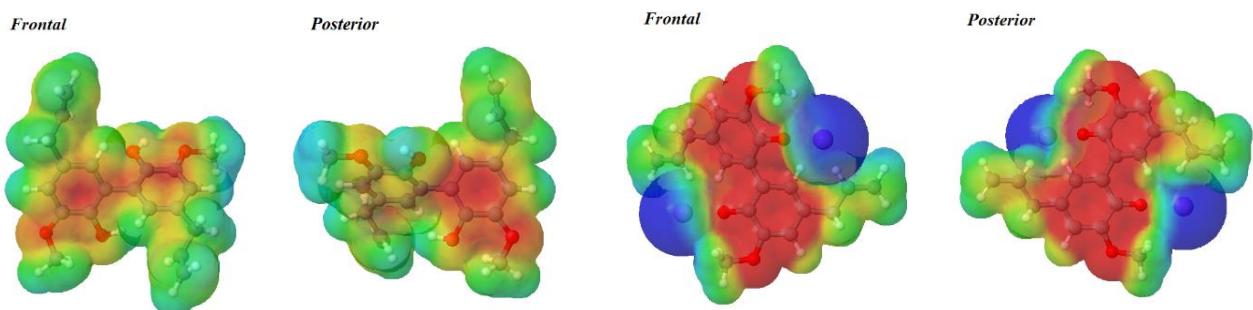
Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software J Mol

As superfícies tridimensionais dos mapas de potenciais eletrostáticos moleculares são geradas após a sobreposição na molécula de uma partícula carregada positivamente que sob a superfície de contato de van der Waals da molécula, revelando uma região de repulsão, representando o potencial positivo, de coloração azulada e a região na molécula de potencial negativo, representado pela coloração vermelha. Para a construção do MEP são necessárias três etapas: a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula, a construção da

superfície de potencial eletrostático e a aplicação de cores a superfície obtida para designar valores de potencial (MAGALHÃES, 2009).

Pela análise dos MPE é possível observar, que tanto o composto **1** quanto o seu derivado sódico, o composto **4** apresentam semelhança, em relação ao volume estrutural. Entretanto, o composto **4** apresenta alta densidade eletrônica, representada pela cor vermelha intensa localizada no centro da estrutura. A baixa densidade eletrônica é representada pela cor azul, que no derivado **4**, se localiza destacadamente sobre os íons sódio. A diferença de distribuição da densidade eletrônica, no composto **1**, é com certeza menos intensa, por se tratar de um composto molecular. Existe uma leve densidade eletrônica representada pela coloração vermelha de baixa intensidade, sobre os átomos de oxigênio. A baixa densidade eletrônica, é observada muito discretamente na representação posterior, sobre os átomos de hidrogênio. Os MPE podem ser observados na Figura 28, a seguir.

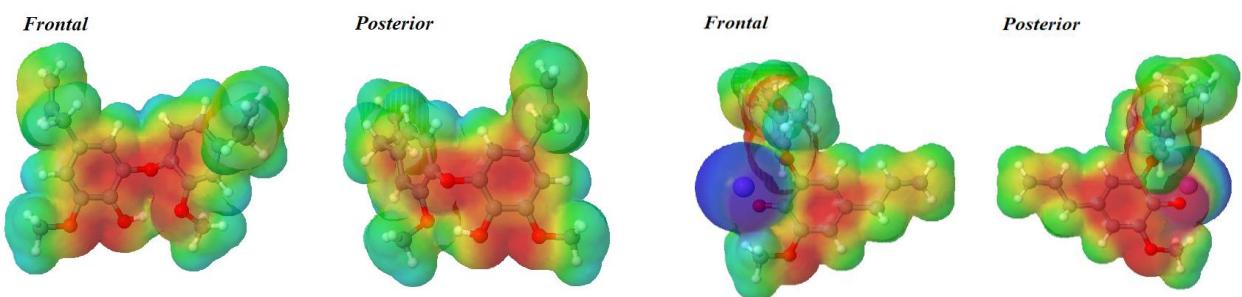
Figura 28: MPE nas posições frontal, posterior do composto **1** e derivado sódico **4**



Fonte: Elaborado pelo autor através do software J Mol

Em relação dos compostos **2** e seu derivado **5**, é possível observar que em termos de volume, as estruturas não apresentam qualquer semelhança. Em relação ao composto **2**, observa-se que, a otimização estrutural levou a uma aproximação dos átomos de oxigênios presentes na estrutura, o que fez com que a nuvem eletrônica se concentre sobre estes átomos. Logicamente no composto **5**, a deficiência eletrônica é notada com muita intensidade sobre o íon sódio. Entretanto a alta densidade eletrônica, não é observada com grande diferença de intensidade entre os dois análogos, e está localizada ao redor dos átomos de oxigênio, em ambos os casos.

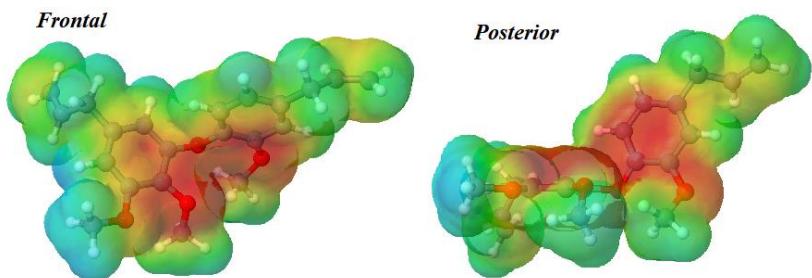
Figura 29: MPE nas posições frontal, posterior do composto **2** e derivado sódico **5**



Fonte: Elaborado pelo autor através do software J Mol

O composto **3**, o único que não foi empregado com protótipo para a obtenção de fenolatos sódicos, por não dispor de qualquer grupo -OH livre, e que apresentou o melhor resultado inibitório de IC₅₀, é o composto que após sofrer otimização molecular apresentou uma conformação diferente dos outros compostos estudados, como é possível observar na Figura 30.

Figura 30: MPE nas posições frontal, posterior do composto **3**



Fonte: Elaborado pelo autor através do software J Mol

Considerando que, a conformação desempenha um papel fundamental na atividade biológica, uma vez que a maioria dos mecanismos de ação são baseados no ajuste correto entre o sítio ativo de uma enzima e o substrato, a conformação menos energética encontrada para o composto **3**, pode ter tido um papel fundamental para o seu melhor desempenho nos testes biológicos realizados. Vale ressaltar, no entanto, que esses resultados são preliminares e devem ser realizados estudos de atividades estruturais mais específicos para entender a eficiência desta série de compostos como substâncias ativas.

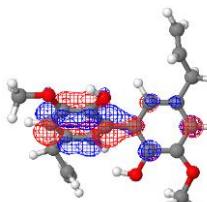
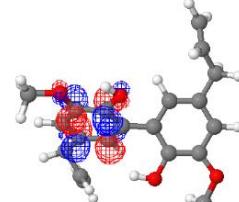
5.6.9. Energias Dos Orbitais Moleculares

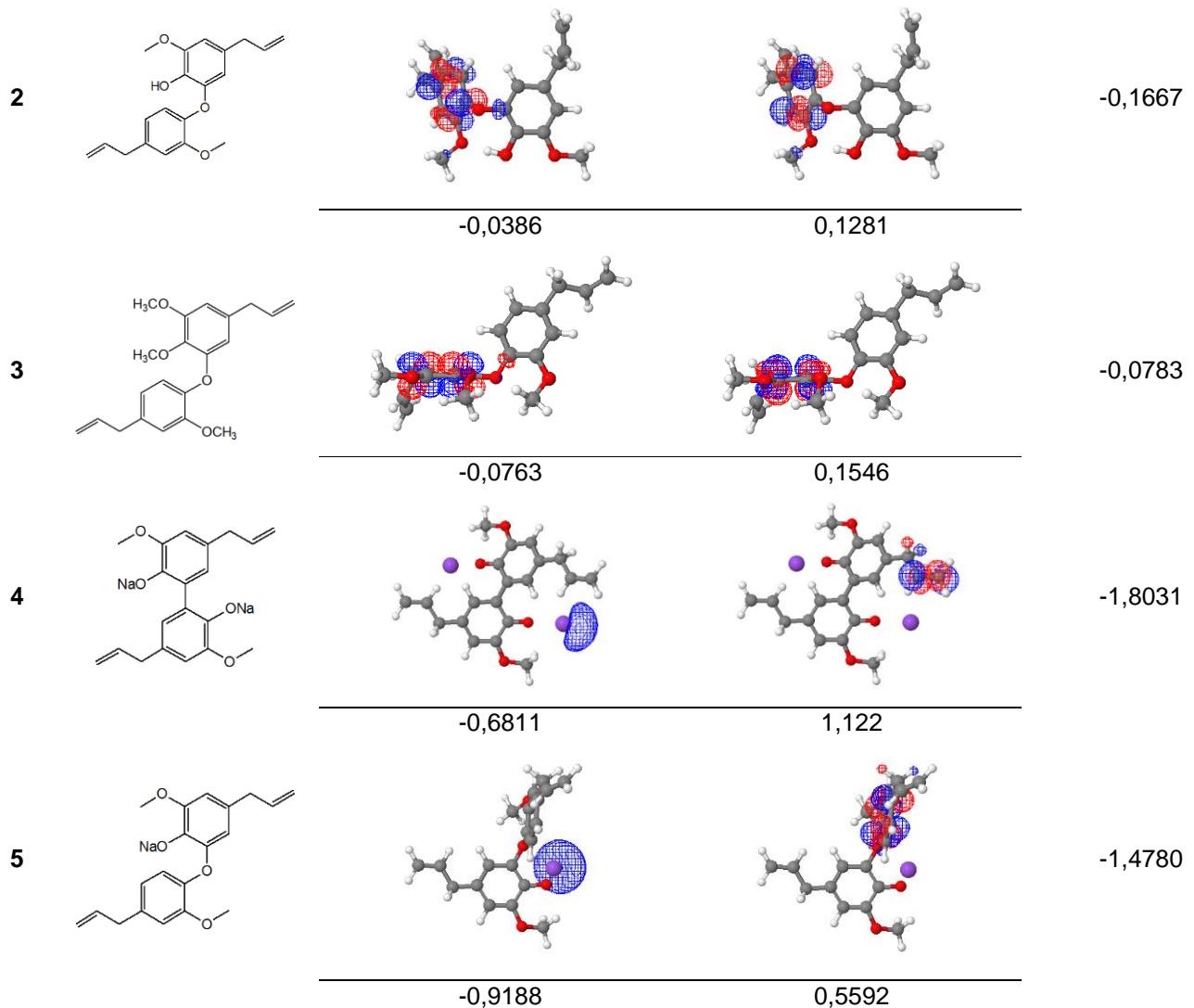
As energias dos orbitais de fronteira, ou seja, o orbital molecular ocupado de maior energia (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e o orbital molecular desocupado de menor energia (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), são descritores químico-quânticos bastante utilizados que desempenham um papel importante nas reações químicas e na formação de diversos complexos de transferência de cargas.

A energia de HOMO está diretamente relacionada ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos. A energia de LUMO está diretamente relacionada à afinidade eletrônica, caracterizada pela susceptibilidade do composto em relação a ataques por nucleófilos. A diferença entre as energias dos orbitais HOMO-LUMO, denominado como GAP, é um importante indicador de estabilidade molecular. Moléculas com baixo valor de GAP são geralmente reativas, enquanto moléculas com alto valor de GAP indicam alta estabilidade da molécula, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas. A densidade eletrônica dos orbitais de fronteira nos átomos fornece uma forma útil para a caracterização detalhada das interações doador-aceitor. A maioria das reações químicas ocorre no local de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira (ZHANG; MUSGRAVE, 2007).

Considerando os valores apresentados de GAP, temos que o composto **4** é o menos estável da série, pois apresenta o menor valor de GAP, e o composto **3** por apresentar o maior valor de GAP é o composto que tem maior probabilidade de apresentar um resultado biológico promissor, devido a sua alta estabilidade, e baixa probabilidade de reagir com substâncias endógenas. A densidade dos orbitais HOMO e LUMO dos compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Orbitais de fronteira calculados para os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5**

COMPOSTO	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP (eV)*
1 	 -0,1413	 0,2251	-0,3664



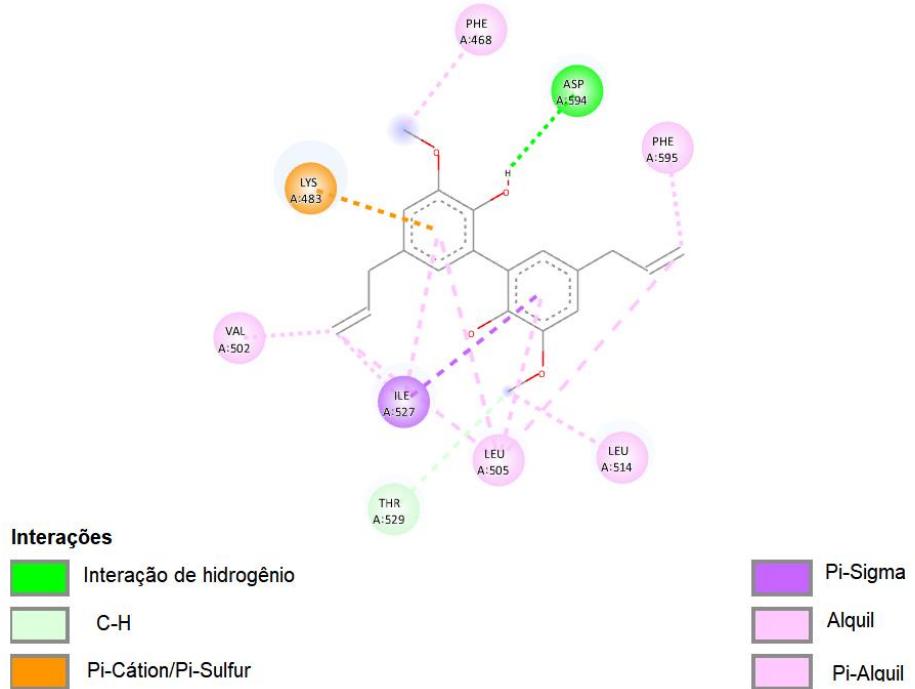
* O cálculo do GAP foi realizado a partir da diferença do valor de energia do orbital LUMO pelo valor de energia do orbital HOMO

5.7. Docking molecular

As moléculas projetadas **1**, **2** e **3** foram escolhidas para o estudo de simulação de docking molecular, pois apresentaram o maior IC₅₀ previsto, não apenas neste estudo, mas também em estudos anteriores (GRECCO et al., 2018).

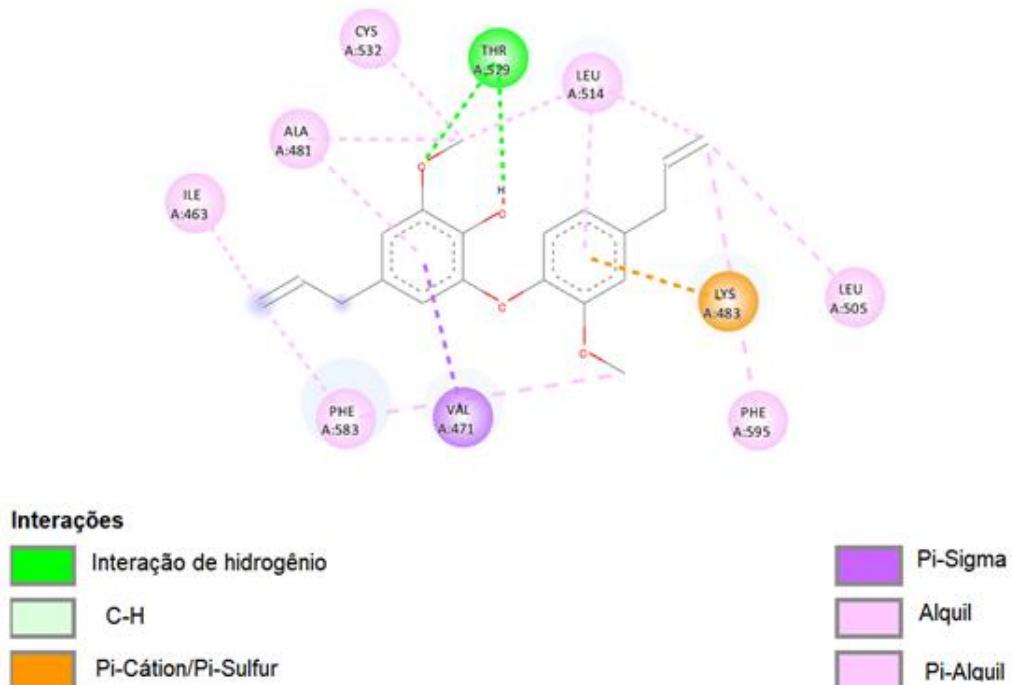
As afinidades de ligação das substâncias estudadas foram comparadas com os locais ativos do alvo 3OG7, para os bolsos de interação com o complexo BRAF/Vemurafenib. As figuras a seguir mostram o diagrama 2D das interações encontradas para o complexo BRAF/1, BRAF/2 e BRAF/3 construídos a partir dos compostos **1**, **2** e **3** respectivamente com V600E-BRAF.

Figura 31: Diagrama 2D do complexo BRAF/1 com V600E-BRAF



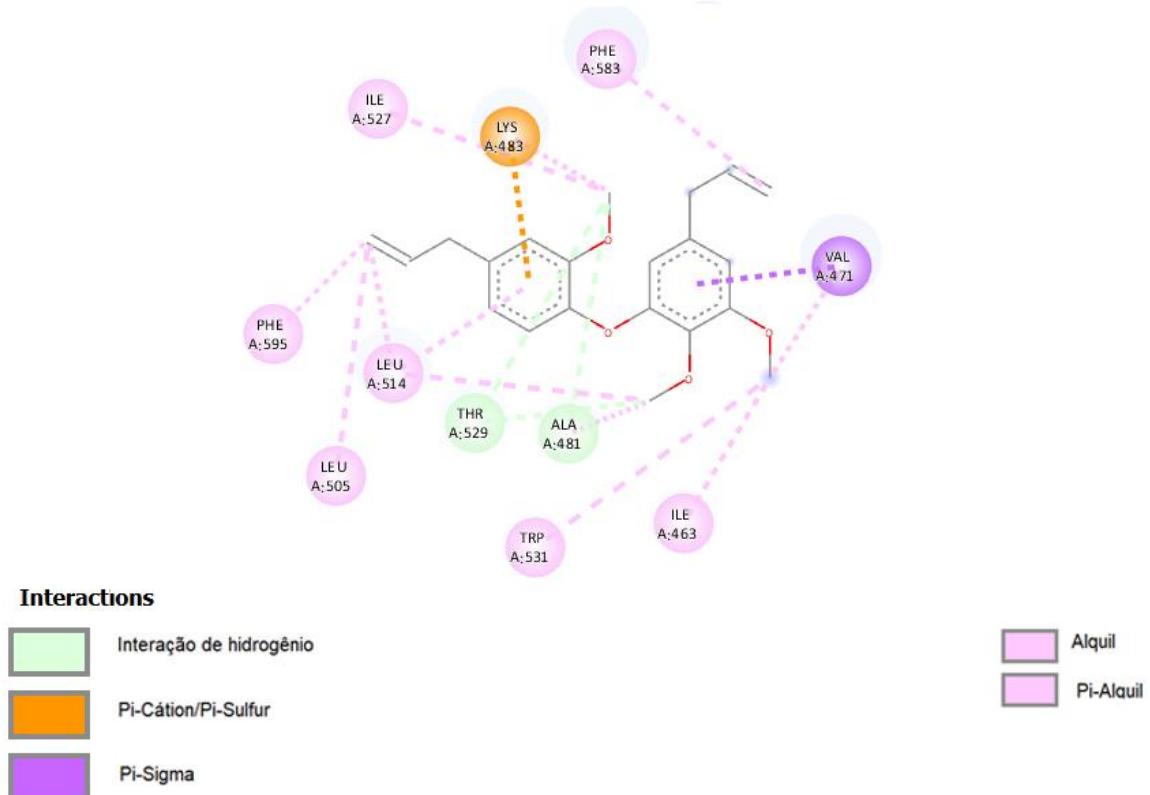
Fonte: Elaborado pelo autor, através do software Discovery Studio Visualizer

Figura 32: Diagrama 2D do complexo BRAF/2 com V600E-BRAF



Fonte: Elaborado pelo autor, através do software Discovery Studio Visualizer

Figura 33: Diagrama 2D do complexo BRAF/3 com V600E-BRAF



Fonte: Elaborado pelo autor, através do software Discovery Studio Visualizer

As moléculas projetadas tinham energia livre negativa de ligação menor em magnitude quando em comparação com Vemurafenib. Apesar dos resultados serem bons, não indica uma melhor afinidade de ligação com o receptor, mas indica que, os compostos projetados podem ser usados como um medicamento anti-melanoma. As poses de encaixe dos compostos projetados mostraram que eles interagiram com o bolso de ligação de um alvo de proteína em uma forma semelhante ao Vemurafenib com interações adicionais.

O composto **1** acopla com o domínio V600E-BRAF com a energia livre de ligação de $-7,73$ Kcal/mol, conforme apresentado na Figura 31. Uma ligação de H foi encontrada entre o receptor e a molécula (ligante), com o aminoácido ASP594 com comprimento de ligação de 2,2000. Além disso, duas interações alquil foram encontradas entre o ligante e os aminoácidos PHE 468, PHE 595, VAL 502, LEU 505 e LEU 514. Uma ligação forte Pi-Sigma com o aminoácido ILE 527 foi também prevista, assim como uma ligação Pi-Cation com LYS 483 e uma interação C-H com o aminoácido THR 529. Ao todos foram encontradas nove interações entre o ligante

e a macromolécula, das quais duas são iguais as interações do Vermurafenib com o receptor V600-BRAF.

O composto **2** acopla com o domínio V600E-BRAF com a energia livre de ligação de –6,53 Kcal/mol, conforme apresentado na Figura 32. Duas ligações de H foram encontradas entre o receptor e a macromolécula, com o aminoácido THR529, com comprimentos de 1,839094 e 3,296243. Além disso, cinco interações alquil foram encontradas entre o ligante e os aminoácidos PHE595 e LEU505. Cinco ligações Pi-Alquil com os aminoácidos ILE463, ALA481, CYS532, LEU514 e PHE583 também foram previstas, assim como cinco ligações Pi-Cation com LYS 483. Ao todos foram encontradas onze interações entre o ligante e a macromolécula, das quais cinco são iguais as interações do vermurafenib com o receptor V600-BRAF.

O composto **3** acopla com o domínio V600E-BRAF com a energia livre de ligação de – 8,00 Kcal/mol, ou seja, o menos energético da série, indicando um potencial melhor para interação. O diagrama 2D é apresentado na Figura 33. Além disso o composto **3** demonstrou potencial para realizar quatro ligações de hidrogênio, sendo assim, duas interações com o grupo metóxi proveniente do anel tetra substituído, e mais duas interações de hidrogênio com o grupo metóxi do outro anel aromático tri substituído. Comparando com as interações possíveis previstas pelos outros dois compostos estudados, o composto **3** foi o que demonstrou melhor potencial para este tipo de interação. O composto **3** também apresentou sete possíveis interações alquila, com os aminoácidos PHE583, ILE527, PHE595, LEU514, LEU505, TRP531 e ILE463, sendo assim é também o composto com maiores números de interações alquila. Os resultados preliminares encontrados através do estudo de ancoragem molecular, estão em concordância com os resultados alcançados pelos estudos *in vitro*, contra a linhagem humana de melanoma A375, já que o composto 3 apresentou o menor valor de IC₅₀, e consequentemente foi o melhor composto da série.

Os resultados obtidos sobre o estudo de *docking* molecular para os compostos selecionados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Interações moleculares de V600E-BRAF (PDB ID: 3OG7) com os compostos **1**, **2** e **3** projetados

Complexo	Energia Livre de Ligação (Kcal / mol)	Ligaçāo de hidrogēnio (LH)	Comprimento da ligação (Å)	Alquil	Pi-Sigma	Pi-Pi	Pi-Alkyl	Pi-cation	C-H
BRAF/1	-7,73	ASP 594	2,2000	PHE 468 PHE 595 VAL 502 LEU 505 LEU 514	ILE 527	---	---	LYS 483	THR 529
BRAF/2	-6,53	THR529 THR529	1,839094 3,296243	PHE595 LEU505	VAL471	---	ILE463 ALA481 CYS532 LEU514 PHE583	LYS 483	---
BRAF/3	-8,00	<i>Anel trisubstituido</i> ALA481 THR529 <i>Anel tetrasubstituido</i> ALA481 THR529	4,145664 3,418814 3,594955 3,412275	---	VAL471		PHE583 ILE527 PHE595 LEU514 LEU505 TRP531 ILE463	LYS483	---
BRAF/Vemurafenib	-11.3	CYS532 GLN530 ASP594 PHE595 GLY596	3.04242 2.44521 2.29258 2.67992 2.14527	CYS532	---	TRP531 PHE583	TRP531 PHE583 ALA481 LEU514 CYS532 LYS483 ILE463	LYS483	---

6



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de novos compostos com atividade antitumoral a partir de produtos naturais, mostra-se cada vez mais relevante no combate ao câncer. Diversos esforços vêm sendo realizados no intuito de se desenvolver/aperfeiçoar terapias antineoplásicas, principalmente devido à ausência de especificidade da maioria dos fármacos hoje utilizados. No que tange o melanoma maligno, este apresenta capacidade metastática e de resistência a múltiplas drogas, o que o torna agressivo e com alta taxa de mortalidade, por isso a urgência na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Nectandra leucantha é uma espécie vegetal portadora de substâncias químicas importantes que tem despertado grande interesse em pesquisadores, pois através dos experimentos realizados, tem alcançado resultados positivos e demonstrando um grande potencial farmacológico como fonte de compostos bioativos, para o desenvolvimento de fármacos/tratamentos do melanoma maligno, assim como outras doenças. Os compostos bioativos da *N. leucantha* são hidrofóbicos e não possuem características favoráveis de solubilidade e biodisponibilidade em sistemas aquosos, o que prejudicaria sua administração. Com isso, os fenóis **1** e **2** isolados das neolignanas foram submetidos a modificação estrutural por meio do preparo de seus derivados salinos sódicos, e, portanto, tornando-os solúveis. Entretanto, após a reavaliação de seus potenciais citotóxicos frente a células de melanoma humano A375 foi possível verificar que elas se tornaram inativas, demonstrando que por vezes a estratégia de modificação estrutural, pode levar ao aumento ou a perda de bioatividade.

Para maior aprofundamento e conhecimento das características físicas-químicas, farmacocinética e conformacionais dos compostos estudados, parâmetros importantes foram determinados e estudados através de metodologia *in silico*. Os resultados sugerem que, para os padrões físico-químicos estudados dos compostos **1**, **2**, **3** e **5** todos estão dentro do esperado. Apenas o composto **4** está fora do desejado, já que apresenta um valor de LogP teórico negativo, o que é um grande indicativo de diminuição da sua absorção. Em relação as características de *druglikeness*, e considerando principalmente a regra de Lipinski, a qual é amplamente utilizada, os compostos têm potencial para se tornar fármacos promissores.

Considerando que o melhor resultado nos testes *in vitro* foi alcançado pelo composto **3**, a análise conformacional foi decisiva, para traçar uma proposta para tal resultado, e ao analisar sua estrutura otimizada, é possível perceber que o composto em questão, apresentou uma conformação totalmente diferente dos outros quatro derivados, sugerindo que sua interação com o receptor pode ser mais efetiva, quando comparado com os outros derivados.

Da mesma maneira foi realizado um estudo de acoplamento molecular com o alvo BRAF-V600 que está relacionado ao melanoma, este procedimento computacional pode prever a ligação não covalente de macromoléculas ou, mais frequentemente, de receptor e uma pequena molécula ligante de forma eficiente, com o objetivo de prever as conformações ligadas e a afinidade de ligação. Os resultados do estudo de docking molecular apresentaram resultados em conformidade com os resultados biológicos obtidos *in vitro*, pois o composto **3**, apresentou maior potencial de interação com o receptor.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABEL, R. et al. Advancing Drug Discovery through Enhanced Free Energy Calculations. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 7, p. 1625–1632, 2017.
- ALMEIDA, Vera L. de et al. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. **Quím. Nova** v. 33, n.7 São Paulo, 2010.
- AMARAL, Maiara et al. A semi-synthetic neolignane derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6114, 2019.
- ASCIERTO, P. A. et al. The Role of BRAF V600 Mutation in Melanoma. **J. of Translational Medicine**, v. 10, n. 85, 2012.
- ASSIS, Igor Medeiros de. **Lignóides de Burseraceae da Amazônia**. 2013. 107 fls. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2013.
- ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plantderived natural products: A review. **Biotechnology Adv.** v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- BARROS, Maria Ester de Sá Barreto. **Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-) - massoialactona e da combretastatina A-4**. 2015. 128 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssou. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos** [recurso eletrônico] - 3. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BERLINCK, Roberto G. S. et al. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, 706-710, 2017.
- BILIA, A. R. et al. Improving on nature: the role of nanomedicine in the development of clinical natural drugs. **Planta Med.** v. 83, n. 5, p. 366-381, 2017.
- BOS, J. D.; MEINARDI M. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 165-169, 2000.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste**. Secretaria de Biodiversidade, Brasília, DF: 2016. 160 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil - 2018**. Rio de Janeiro. INCA, 2018. 130 p.

BRITO, Monique Araújo de. Pharmacokinetic study with computational tools in the medicinal chemistry course. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 47, n. 4, 2011.

BOWE, C. L. et al. Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 28, n. 94, p. 12218-12223, 1997.

CALDEIRA, Tamires Guedes. **Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da permeabilidade in vitro da eremantolida C**. 2015. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, MG, 2015.

CARPENTIERI-RODRIGUES, L. N.; ZANLUCHI, J. M.; GREBOGI, I. H.; Percutaneous absorption enhancers: mechanisms and potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 949-961, 2007.

CASTRO-ALVAREZ, Alejandro; COSTA, Anna M.; VILARRASA, Jaume. The performance of several docking programs at reproducing protein–macrolide-like crystal structures. **Molecules**, v. 22, 136, 2017.

CARVALHO, A. L. S. et al. Estudo das moléculas majoritárias do extrato Da casca de *Cinnamomum verum* por modelagem Molecular. **XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação Científica**, v. 1, n. 6 Uberlândia, MG, 2019.

CAVALCANTI, Iago Dillion Lima et al. Nanoparticles in the Use of Natural Products for the Treatment of Lung Cancer. **Ars Pharmaceutica**. v. 60, n. 3, p. 185-195, 2019.

CHEROBIN, Ana Carolina Figueiredo Pereira. **Fatores prognósticos para a metástase no melanoma cutâneo**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CHENG, Liang et al. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. **Mod Pathol.** v. 31, n. 1, p. 24–38, 2018.

COELHO, Júlio Cesar. **Modelo Matemático de Crescimento de Tumor Avascular Invasivo**. 2019. 82 f. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada e Computacional) - Universidade Estadual de Londrina, PR, 2019.

COSTA-SILVA, Thais Alves da et al. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucanta*. **Journal of Natural Products**. v. 78, n. 4, p. 653-657, 2015.

CORICOVAC, Dorina et al. Cutaneous Melanoma — A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. **Int. J. Mol. Sci.** v. 19, 1566, 2018.

CUI, Qinghua et al. Lignans and their derivatives from plants as antivirals. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 183, 2020.

DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **SCientifiC REpOrtS**, v. 7, 42717, 2017.

DOLABELA, M. F. et al. Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 227, 2018.

DUARTE, Ana Filipa et al. Risk factors for development of new skin neoplasms in patients with past history of skin cancer: A survival analysis. **Scientific Reports**. v. 8: 15744, 2018.

ERLICH, Tal H.; FISHER, David E. Pathways in melanoma development. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**. v. 153, n. 1, p. 68-76, 2018.

ESMAILE, Stephany Campanelli. **Modelagem molecular do fármaco olmesartana acoplado ao receptor de angiotensina AT1 em pH ácido ou fisiológico**. 2019. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

FAIÃO-FLORES, Fernanda et al. Curcumin Analog DM-1 in Monotherapy or Combinatory Treatment with Dacarbazine as a Strategy to Inhibit In Vivo Melanoma Progression. **PLoS One**. v. 10, n. 3, e0118702, 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in globocan 2012. **International Journal of Cancer**, Wiley Online Library. v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FIGUEIREDO C.R. et al. Pyrostegia venusta heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. **Pharmacognosy Magazine**, v.10, p.363-76, 2014.

FONTANA, Cláudia; GASPER, André Luís de; SEVEGNANI, Lúcia. A raridade das espécies arbóreas de Lauraceae no planalto do Estado de Santa Catarina, Brasil. **HOEHNEA**. v.43, n.3, São Paulo, 2016.

FORTUNATO, Célia Regina M. et al. Isolation of bioactive neolignans from leaves of *Nectandra leucantha*, preparation of salt derivatives and evaluation of antitumoral activities. In **7º BCNP – Brazilian Conference Natural Products**, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

FURTADO, Glória Tamiris Farias da Silva. **Quitosana / curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2014.

GRECCO, Simone Santos et al. Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. **Pharm. Biol.** 53, p. 133 e137, 2015.

GRECCO, Simone Santos et al. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). **Tetrahedron: Asymmetry** report number XX, 2016.

GRECCO, Simone dos Santos. **Prospecção Químico-Farmacológica de *Nectandra Leucantha* (Lauraceae) – Isolamento e Caracterização de Compostos com Atividade Antiparasitária.** 2016, 272 f. Tese (Doutorado em Ciência & Tecnologia – Química) – Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Santo André, SP, 2016.

GRECCO, Simone Santos et al. Neolignans from leaves of *Nectandra leucantha* (Lauraceae) display in vitro antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. **Chemico-Biological Interactions**, 2017.

GRECCO, Simone Santos et al. Neolignans isolated from twigs of *Nectandra leucantha* Ness & Mart (Lauraceae) displayed in vitro antileishmanial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, p. 1-7, 2018.

GIUNTA, Emilio Francesco et al. Optimal treatment strategy for metastatic melanoma patients harboring BRAF-V600 mutations. Therapeutic Advances in Medical Oncology. **Ther Adv Med Oncol.** v. 12, p. 1–15, 1758835920925219, 2020.

GONÇALVES, Ricardo de Almeida et al. Caracteres anatômicos e perfil químico de folhas de três espécies da família Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1 Curitiba, 2018.

GONZÁLEZ, Juan F. et al. Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approaches. **Expert Opin Drug Discov.** v. 14, n. 9, p. 879-891, 2019.

HU-LIESKOVAN, Siwen et al. Combining Targeted Therapy with Immunotherapy in BRAF-Mutant Melanoma: Promise and Challenges. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 21, p. 2248-2254, 2014.

HSIEH, Ricardo. **Melanoma primário da mucosa oral: estudo imunoistoquímico e molecular da via da MAPK.** 2012. 123 fls. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, 2012.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120 p.

JANG, Dae Kil et al. Anti-melanogenesis activity of 6-o-isobutyrylbritannilactone from *Inula britannica* on B16F10 melanocytes and in vivo zebrafish models. **Molecules**. v. 25, n. 17: 3887, 2020.

JOBIM, Gleyce dos Santos Barbosa. **Atividade antineoplásica in vitro e in vivo de 4'-cloro-1-nitro-2-fenileteno em modelo de Melanoma.** 2017. 138 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2017.

KHANNA V.; RANGANATHAN S. Physiochemical property space distribution among human metabolites, drugs, and toxins. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 15, S10, 2009.

LEÓN, Maria Laura Vilalobos et al. Melanoma. Medicine - **Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, Madrid Espanha, v. 11, n. 26, p. 1597-1607, 2013.

LEONARDI, Giulia C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **J. of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.

LIMA NETO, G.A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

LIPINSKI, Christopher A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LITO, Piro; ROSEN, Neal; SOLIT, David B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. **Nature medicine** v. 19, n. 11, p. 1401-1409, 2013.

LONG, Georgina V. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **J Clin Oncol**. v. 29, n. 10, p. 1239-1246, 2011.

LOPES, Jéssica Dayane. **Principais avanços no tratamento do melanoma cutâneo: imunoterapia e terapia alvo**. 2018. 37 fls. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade de Uberaba, MG, 2018.

MACÍAS-VILLAMIZAR et al. Genus *Nectandra*: Phytochemistry and Biological Activity. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, Chile v. 14, n. 4, p. 317-342, 2015.

MARTÍN-GORGOJO A; NAGORE E. Melanoma associado a nevo melanocítico. **Actas Dermo-sifiliograficas**. v. 109, n. 2, p. 123-132, 2018.

MEANWELL, Nicholas A. Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. **Chem. Res. Toxicol.** v. 24, n. 9, p. 1420–1456, 2011

MÉLO, Kathleen Cézar de et al. Análise temporal da mortalidade por câncer de pele melanoma no Brasil: 2000 a 2016. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. Rio de Janeiro v.11, n.4, p. 287-94, 2019.

MORAES, Tâmara N. Potencial antitumoral de plantas medicinais: uso popular x evidência científica. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 4 n. 1 - Suplemento Especial II Congresso de Ciências Farmacêuticas do Brasil Central, 2015.

MORADI, S. Z. et al. Nanoformulations of Herbal Extracts in Treatment of Neurodegenerative Disorders. **Front Bioeng Biotechnol**. v.8, 238, 2020.

MOYA-PLANA, A. et al. Melanoma cutâneo cervicofacial. **EMC – Otorrinolaringología**. v. 46, n. 4, p. 1-9, 2017.

MUEGGE, I. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **J Med Chem**. v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.

NASTI, Tahseen H. et al. A Murine Model for the Development of Melanocytic Nevi and Their Progression to Melanoma. **Molecular Carcinogênese**. v. 55, n. 5, p. 646–658, 2016.

NEGUT, Irina et al. Nanostructured Thin Coatings Containing *Anthriscus sylvestris* Extract with Dual Bioactivity. **Molecules**. v. 25, n. 17: 3866, 2020.

NEVES, Pedro Lobo Alcântara. **Melanoma cutâneo: aspectos histológicos e clínicos dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais no período de 1995 a 2017**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2018.

NHS – National Health Service, UK. **Melanoma Skin câncer**. Disponível em <https://www.nhs.uk/conditions/melanoma-skin-cancer/>. Acesso em 26 de setembro de 2019.

NUNES, Renata Rachide et al. Successful application of virtual screening and molecular dynamics simulations against antimalarial molecular targets. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 12, p. 721-730, 2016.

OLIVEIRA, Daiane da Silva. **Caracterização do perfil epidemiológico do paciente com câncer de reto no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo: determinação dos fatores associados ao tempo de internação hospitalar do paciente cirúrgico**. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, 2017.

OPREA, T. I. Current trends in lead discovery: Are we looking for the appropriate properties? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, p. 325–334, 2002.

OTTAVIANO, Margaret et al. BRAF Gene and Melanoma: Back to the Future. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, 3474, 2021.

PANDEY, Rajan Kumar et al. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 37, n. 1, 2017.

PEREIRA, Ana Ligia da Costa. **Síntese, elucidação estrutural e estudos in silico de novos compostos 2-amino-tiofênicos imídicos candidatos a fármacos antifúngicos, antileishmanicida e antitumorais**. 2019. 164 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2019.

PHAN, Thu Dang Anh et al. A study of pathological characteristics and BRAF V600E status in Langerhans cell histiocytosis of Vietnamese children. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 55, n. 2, p. 112-117, 2021.

PARK, Jaehyun et al. Anti-Cancer Effects of *Lactobacillus plantarum* L-14 Cell-Free Extract on Human Malignant Melanoma A375 Cells. **Molecules**, v. 25, n. 17, 3895, 2020.

PASSOS, Maria José et al. **Melanoma – 2013**, Editora IGPM, Portugal, Coimbra, 2014, 445 pág.

PONCI, Vitor et al. Neolignans from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) display in vitro Cytotoxic activity and induce apoptosis in leukemia cells. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12757–12768, 2015.

PONCI, Vitor et al. Biseugenol Exhibited Anti-Inflammatory and Anti-Asthmatic Effects in an Asthma Mouse Model of Mixed-Granulocytic Asthma. **Molecules**, v. 25, 5384, p. 1-13, 2020.

PRESS, Neil J.; JOLY, Emilie, ERTL, Peter. Natural product drug delivery: A special challenge? **Prog Med Chem.** v. 58, p. 157-187, 2019.

QUINCOCES, J. et al. Japan-Patent: JP 5317290, 19.07.2013; European-Patent: EP 2,054,365, 24.09. 2014; US-Patent: US 8,859,625, 14.10, 2014.

QUINCOCES, J. et al. Japan-Patent: JP 5802658, 04.09.2015; US-Patent: US 9,381,169, 05.07.2016; European-Patent: EP 2,441,452, 26.12, 2018.

QUINET, et al. **Lauraceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016.

QUIROGA, Rodrigo; VILLARREAL, Marcos A. Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0155183, 2016.

RAO, Venketeshwer. **Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.** Editora BoD - Books on Demand, [versão ebook] 2012. 550 p.

REBECCA, Vito W.; SOMASUNDARAM, Rajasekharan; HERLYN, Meenhard. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nature Communications**. v. 11, n. 1, 2858, 2020.

ROH, Mi Ryung et al. Genetics of Melanocytic Nevi. **Pigment Cell Melanoma Res.** v. 28, n. 6, p. 661–672, 2015.

ROSSI, Alessandro et al. Drug resistance of BRAF-mutant melanoma: Review of up-to-date mechanisms of action and promising targeted agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 862, 172621, 2019.

SANTOS, Lourdes C. dos; FURLAN, Maysa; AMORIM, Marcelo Rodrigues de Amorim. **Produtos naturais bioativos.** São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, 482 p.

SANTOS, Victória Laysna dos Anjos; GONSALVES, Arlan de Assis; ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo. Abordagem Didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: Regra Dos Cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-Oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Quím. Nova** v.41, n.1, São Paulo, 2018.

SAVJANI, Ketan T.; GAJJAR, Anuradha K.; SAVJANI, Jignasa K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharm.** p. 1-10, 195727, 2012.

SILVA, Flávia Cristina da. **Desenvolvimento de modelos de QSAR para identificação de substratos e inibidores de CYP3A4.** 2015. 109 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, Cassio Fernando Nunes da et al. Modelos experimentais de melanoma murino in vivo. **Biosaúde**, Londrina, v. 15, n. 2, p. 73 – 80, 2013.

SILVA, Matheus Lopes. **Avaliação de atividade antiparasitária de uma neolignana isolada das folhas de Saururus cernuus L. (Saururaceae).** 2019. 47 f. Monografia (Graduação em Química) - Centro de Ciências Naturais e Humanas - Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. **Wiley Online Library**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SOMASUNDARAM, Rajasekharan et al. Tumor-associated B-cells induce tumor heterogeneity and therapy resistance. **Nature Communications**. v. 8, n. 607, p. 1-16, 2017.

SOUSA, Fernanda S. de et al. Neolignans isolated from Nectandra leucantha induce apoptosis in melanoma cells by disturbance in mitochondrial integrity and redox homeostasis. **Phytochemistry** v. 140, p. 108-117, 2017.

SOUSA, Fernanda Samara de. **Metabólitos especiais dos galhos de Nectandra leucantha Nees & Mart. (Lauraceae) e derivados semissintéticos – caracterização molecular, avaliação do potencial e mecanismo antitumoral contra o melanoma murino.** 2018. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, 2018.

SOUSA Fernanda S. de et al. Genotoxic and cytotoxic effects of neolignans isolated from Nectandra leucantha (Lauraceae). **Toxicology in Vitro**. v. 55, p. 116-123, 2019.

SOUZA, Gisele da Conceição. **Síntese de 8,4'-Oxineolignanas e Análogos com Atividade Anticâncer.** 2017. 274 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade de Brasília, DF, 2017.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p.197 - 207, 2012.

SLIWOSK, Gregory et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacol Rev.** v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014.

SOARES, Franciela Arenhart. **Síntese, fotofísica e modelagem molecular de compostos tendo como alvos as enzimas colinesterases e a proteína BSA.** 2020. 103 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Química, Porto Alegre, RS, 2020.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 26, n. 4, p. 444-457, 2017.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem.** v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

UMAR, A. B. et al. QSAR modelling and molecular docking studies for anti-cancer compounds against melanoma cell line SK-MEL-2. **Heliyon**, v. 6, e03640, 2020.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 45, p. 2615-2623, 2002.

VICENTE, Anna Luiza Silva Almeida. **Perfil Molecular de Melanomas Cutâneos e de Mucosas**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Pio XII Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, 2016.

WHO - **Health statistics and information systems 2018** - World Health Organization

YAMAZAKI, Naoya et al. BRAF V600 mutations and pathological features in Japanese melanoma patients. **Melanoma Res.** v. 25, n. 1, p. 9–14. 2015.