

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO *in silico*, *in vitro* E *in vivo* DE UM NOVO DERIVADO DE XANTENO COM
POTENCIAL ANTIMELANOMA

ISIS ARIEL FLORÊNCIO DE SOUSA

MANAUS

2025

ISIS ARIEL FLORÊNCIO DE SOUSA

**ESTUDO *in silico*, *in vitro* E *in vivo* DE UM NOVO DERIVADO DE XANTENO COM
POTENCIAL ANTIMELANOMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas PPGCF/UFAM, como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
CO-ORIENTADORA: DRA. KEYLA EMANUELLE RAMOS DE HOLANDA

MANAUS

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725e Sousa, Isis Ariel Florêncio de
 Estudo in silico, in vitro e in vivo de um novo derivado de xanteno com
 potencial antimelanoma / Isis Ariel Florêncio de Sousa. - 2025.
 75 f. : il., color. ; 31 cm.

 Orientador(a): Patrícia Danielle Oliveira de Almeida.
 Coorientador(a): Keyla Emanuelle Ramos de Holanda.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
 de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus, 2025.

 1. Xanteno. 2. Caracterização físico-química. 3. Citotoxicidade. 4.
 Antitumoral. 5. Melanoma. I. Almeida, Patrícia Danielle Oliveira de. II.
 Holanda, Keyla Emanuelle Ramos de. III. Universidade Federal do
 Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV.
 Título

“ESTUDO *in silico*, *in vitro* E *in vivo* DE UM NOVO DERIVADO DE XANTENO COM POTENCIAL ANTIMELANOMA”

DISCENTE: ISIS ARIEL FLORÊNCIO DE SOUSA

PARECER:

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

Manaus, AM, 29/11/2024.

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

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA**
Data: 12/06/2025 18:18:35-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF, Orientadora e Presidente da Banca

Documento assinado digitalmente
 **STEFANI FERREIRA DE OLIVEIRA**
Data: 29/04/2025 12:34:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Stéfani Ferreira de Oliveira
Membro Externo

Documento assinado digitalmente
 **LEILANE DE SOUSA MENDONÇA**
Data: 12/06/2025 08:50:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Leilane de Sousa Mendonça
Membro Externo

***Aos meus pais, Carlos Frank e Verônica Virgínia, e à
minha irmã, Ágata Agnes, meus maiores exemplos de
amor, dedicação e fonte inesgotável de inspiração!***

AGRADECIMENTOS

À Deus, a minha eterna gratidão. Tudo foi feito através Dele, e sem Ele nada teria sido possível. Ele e Nossa Senhora foram meus fieis aliados nos momentos de aflição. Meu fardo foi leve porque, com Eles, nunca estive sozinha.

À minha família, especialmente aos meus pais, Carlos Frank e Verônica Virgínia, à minha irmã, Ágata Agnes, ao meu cunhado, André Matheus, e ao meu sobrinho, Manoel Florêncio, pelo apoio incondicional. Cada gesto de carinho, cada palavra de incentivo, e cada momento de compreensão foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. A força de vocês foi o que me manteve firme, e o amor de vocês foi o que me deu paz para seguir em frente.

À minha orientadora, professora Doutora Patrícia Danielle Oliveira de Almeida, pela orientação, paciência e por sempre acreditar no meu potencial. Suas valiosas contribuições e ensinamentos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento como pesquisadora.

Ao Laboratório de Atividades Biológicas – Biophar, por ser o espaço onde não só realizei minha pesquisa de mestrado, mas onde minha trajetória científica começou a ganhar forma desde a graduação em Farmácia. A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos.

À todos os colegas de pesquisa e professores que cruzaram meu caminho durante essa jornada, pela troca de ideias, pelas amizades, pelo apoio, pela colaboração e por cada momento compartilhado no processo de aprendizagem. Foi neste ambiente que pude amadurecer como cientista. Sei que ainda tenho muito a evoluir, mas é com a base sólida que construí que seguirei em busca de novos desafios e conquistas.

RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva e letal do câncer de pele, caracterizado por processos metastáticos, e apesar dos avanços terapêuticos, como a terapia direcionada e a imunoterapia, ainda existem desafios relacionados à resistência aos tratamentos. Estudos recentes sugerem que derivados de xanteno podem ser novas opções terapêuticas promissoras para o melanoma, devido à sua estrutura que permite a incorporação de grupamentos químicos capazes de desencadear atividades terapêuticas. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimelanoma de um novo derivado de xanteno, o PD01, por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. A triagem virtual foi realizada utilizando técnicas de *docking molecular* para avaliar a afinidade de interação entre o composto PD01 e o medicamento de referência vemurafenib. Os parâmetros farmacocinéticos do PD01 foram analisados por meio da plataforma *SwissADME*. A caracterização físico-química do PD01 foi realizada com Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrofotometria de absorção no Infravermelho (IV). Ensaios de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizados para investigar a estabilidade térmica do PD01. Nos ensaios *in vitro*, foram utilizadas em três linhagens celulares: melanoma humano (SK-MEL-28), melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto humano (MRC-5) e a citotoxicidade foi avaliada pelo método de *Alamar Blue*. A morfologia celular foi analisada por coloração com kit panótico rápido, e o tipo de morte foi verificada pela coloração diferencial com *acridina orange* e *brometo de etídio*. O composto PD01 foi testado em um modelo *in vivo* de melanoma murino, e comparado com o controle positivo (doxorrubicina) para avaliação da inibição do crescimento tumoral. A análise histológica foi realizada para verificar o comprometimento dos órgãos. Na triagem virtual, o PD01 apresentou melhor afinidade de interação (-11,1 kcal/mol) quando comparado com o medicamento de referência, Vemurafenib (-9,204 kcal/mol), além de indicar um perfil de lipofilicidade. As análises de RMN e espectrofotometria IV indicaram que o PD01 possui uma estrutura molecular definida. Os ensaios TGA e DSC mostraram uma perda de massa de 57,72% entre 26 e 600 °C, com picos observados a 60,2 °C e 299,47 °C. A molécula foi citotóxica, com valores de CI_{50} para SK-MEL-28 de $5,07 \pm 1,28 \mu\text{M}$, B16-F10 de $18,85 \pm 3,28 \mu\text{M}$ e MRC-5 de $4,94 \pm 0,72 \mu\text{M}$. As análises morfológicas revelaram que o PD01 induziu morte celular por apoptose, com células em apoptose e necrose observadas, especialmente com a concentração de 10 μM . No modelo *in vivo* de melanoma murino, o PD01 foi menos eficaz que a doxorrubicina, com inibição do crescimento tumoral de 5,96% e 10,16% nas doses de 3 mg e 30 mg, respectivamente, enquanto a doxorrubicina obteve 29,49%. A histologia dos órgãos não mostrou comprometimento significativo, sugerindo que o PD01, com doses otimizadas, poderia apresentar melhores resultados terapêuticos. Em conclusão, o derivado de xanteno PD01 apresentou atividade citotóxica contra células de melanoma, induzindo apoptose, com resultados promissores em estudos iniciais. No entanto, a sua eficácia em modelos *in vivo* foi inferior aos tratamentos convencionais. Futuros estudos devem melhorar sua formulação, solubilidade e biodisponibilidade para potencializar seus efeitos terapêuticos e possibilitar ensaios clínicos.

Palavras-chave: xanteno, caracterização físico-química, citotoxicidade, melanoma.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive and lethal form of skin cancer, characterized by metastatic processes. Despite therapeutic advancements, such as targeted therapy and immunotherapy, challenges related to treatment resistance persist. Recent studies suggest that xanthene derivatives may represent promising therapeutic options for melanoma due to their structure, which allows the incorporation of chemical groups capable of triggering therapeutic activities. This study aimed to evaluate the antimelanoma potential of a novel xanthene derivative, PD01, using *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches. Virtual screening was performed using molecular docking techniques to assess the interaction affinity between PD01 and the reference drug vemurafenib. The pharmacokinetic parameters of PD01 were analyzed through the SwissADME platform. The physicochemical characterization of PD01 was conducted using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Infrared (IR) absorption spectrophotometry. Thermogravimetric (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) assays were performed to investigate the thermal stability of PD01. *In vitro* assays were conducted on three cell lines: human melanoma (SK-MEL-28), murine melanoma (B16-F10), and human fibroblasts (MRC-5), with cytotoxicity evaluated by the Alamar Blue method. Cell morphology was analyzed using a rapid panoptic staining kit, and the type of cell death was assessed by differential staining with acridine orange and ethidium bromide. PD01 was tested in a murine melanoma *in vivo* model and compared to the positive control (doxorubicin) for tumor growth inhibition evaluation. Histological analysis was performed to assess organ integrity. In the virtual screening, PD01 showed better interaction affinity (-11.1 kcal/mol) compared to the reference drug vemurafenib (-9.204 kcal/mol), also indicating a lipophilic profile. NMR and IR spectrophotometry analyses revealed that PD01 possesses a defined molecular structure. TGA and DSC assays showed a mass loss of 57.72% between 26 and 600 °C, with peaks observed at 60.2 °C and 299.47 °C. The molecule was cytotoxic, with IC₅₀ values of 5.07 ± 1.28 μM for SK-MEL-28, 18.85 ± 3.28 μM for B16-F10, and 4.94 ± 0.72 μM for MRC-5. Morphological analyses revealed that PD01 induced cell death through apoptosis, with apoptotic and necrotic cells observed, particularly at the 10 μM concentration. In the murine melanoma *in vivo* model, PD01 was less effective than doxorubicin, with tumor growth inhibition of 5.96% and 10.16% at doses of 3 mg and 30 mg, respectively, while doxorubicin achieved 29.49%. Histology of the organs did not show significant damage, suggesting that PD01, with optimized doses, could yield better therapeutic outcomes. In conclusion, the xanthene derivative PD01 exhibited cytotoxic activity against melanoma cells, inducing apoptosis, with promising results in preliminary studies. However, its efficacy in *in vivo* models was inferior to conventional treatments. Future studies should improve its formulation, solubility, and bioavailability to enhance its therapeutic effects and facilitate clinical trials.

Keywords: xanthene, physicochemical characterization, cytotoxicity, melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento tumoral do melanoma. Estágio I: Tumor restrito à epiderme, com espessura <1mm com ulceração ou <2mm sem ulceração; Estágio II: Tumor pode ultrapassar a epiderme, com espessura entre 1 a 4mm com ulceração ou >4mm sem ulceração; Estágio III: O câncer atinge a derme e pode se espalhar para linfonodos; Estágio IV: O câncer se espalha para outras partes do corpo, atingindo o sistema linfático e a corrente sanguínea. Adaptada de: Instituto de Física de São Carlos, 2016.....	20
Figura 2 – Subtipos de melanoma. A: Melanoma lentigo maligno; B: Melanoma de disseminação superficial; C: Melanoma uveal; D: Melanoma nodular. Adaptada de: Melanoma Brasil, 2024.....	22
Figura 3 – Representação da cascata de sinalização da via MAPK, na qual RAS ativa BRAF, que por sua vez sinaliza para MEK, levando à ativação de ERK que resulta em proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Fonte: Autoral.....	24
Figura 4 – Estrutura química do xanteno. Fonte: Autoral.....	30
Figura 5 – Delineamento experimental dos ensaios realizados.....	32
Figura 6 – Reação de síntese para obtenção da molécula de classe 6H-Dibenzo[b,h]xanteno (PD01).....	33
Figura 7 – Arquivo de configuração utilizado nas simulações de <i>docking</i> molecular.....	40
Figura 8 – Interação do complexo BRAF e o xanteno obtido a partir do <i>docking</i> molecular.....	41
Figura 9 – Alinhamento estrutural no <i>redocking</i> entre a conformação teórica obtida por <i>docking</i> molecular do Vemurafenib e a conformação experimental da cristalografia PDB ID: 5JRQ.....	42
Figura 10 – Visualização tridimensional dos aminoácidos que interagem com o xanteno no sítio de ligação da BRAF.....	43
Figura 11 – Diagrama das interações químicas formadas entre BRAF e o xanteno.....	43
Figura 12 – Espectro 1H RMN para a molécula da classe dos xantenos dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl ₃) juntamente com seus respectivos assinalamentos processados no software Mestrenova.....	45
Figura 13 – Espectro 13C RMN para a molécula da classe dos xantenos dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl ₃) juntamente com seus respectivos assinalamentos processados no software Mestrenova.....	45
Figura 14 – Espectro na região do infravermelho da molécula PD01 utilizando equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 4000 a 650 cm ⁻¹ , na resolução de 4 cm ⁻¹	48
Figura 15 – Sinais TGA analisados a 10 °C/min, desde a temperatura ambiente até 600 °C, para uma amostra de 5,3250 mg de PD01. A derivada da perda de massa é representada pela linha azul.....	50

- Figura 16 – Sinais DSC analisados a 10 °C/min, desde a temperatura ambiente até 600 °C, para uma amostra de 5,3250 mg de PD01. A derivada é representada pela linha vermelha.....51
- Figura 17 – Efeitos na indução de apoptose e necrose em melanoma murino (B16-F10) após tratamento com 2,5; 5 e 10 µM de PD01 por 24 horas. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – células integras com citoplasma e núcleos visíveis; 2 – células apoptóticas; 3 – células necróticas; Coloração: AO/BE. Aumento: 20x.....57
- Figura 18 – Fotografia macroscópica de tumor controle negativo de camundongo C57Bl/6.....59
- Figura 19 – Retenção do PD01 nos tecidos.....60
- Figura 20 – Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – células em apoptose; 2 – degeneração do parênquima renal; 3 – glomérulo sem cápsula de Bowman; 4 – vasos congestos; 5 – macrófagos; 6 – hiperplasticidade de túbulo. Coloração: HE. Aumento: 40x.....63
- Figura 21 – Cortes histológicos de fígados de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – hepatócitos binucleados; 2 – célula apoptótica; 3 – células de Kupffer; 4 – gordura; 5 – veia centrolobular com hemácias. Coloração: HE. Aumento: 40x.....64
- Figura 22 – Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – espessamento do parênquima pulmonar; 2 – congestão vascular; 3 – infiltrado inflamatório; 4 – massa tumoral. Coloração: HE. Aumento: 10x.....65
- Figura 23 – Cortes histológicos dos tumores de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – melanócitos; 2 – produção de melanina; 3 – adipócitos; 4 – tecido conjuntivo; 5 – vascularização; 6 – núcleos picnóticos. Coloração: HE. Aumento: 10x.....67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Padrão de morte celular induzido pelo xanteno PD01 em células B16-F10. Cada barra corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de <i>docking</i> molecular em kcal/mol obtidos com o algoritmo <i>AutoDock Vina</i> v.1.2.5 considerando o receptor totalmente rígido.....	41
Tabela 2 – Sinais de ¹ H RMN a 500,13 MHz para amostra do PD01 dissolvida em CDCl ₃	46
Tabela 3 – Sinais de ¹³ C RMN a 125,76 MHz para amostra do PD01 dissolvida em CDCl ₃	47
Tabela 4 – Espectros infravermelho gerados para a molécula PD01.....	48
Tabela 5 – Sinais TGA correspondentes a perda de massa em função da temperatura.....	50
Tabela 6 – Sinais obtidos durante a análise DSC e o perfil do fluxo de calor injetado na amostra.....	51
Tabela 7 – Atividade citotóxica em linhagens tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28) e melanoma murino (B16-F10) e não tumoral de fibroblasto humano (MRC-5) tratadas com concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µM de PD01 após 72 horas.....	52
Tabela 8 – Efeito do PD01 na morfologia celular de melanoma humano (SK-MEL-28), melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto humano (MRC-5) tratadas com concentrações de 2,5; 5 e 10 µM de PD01 após 48 horas.....	55
Tabela 9 – Efeito do xanteno PD01 sobre o peso final da massa tumoral oriundas de camundongos inoculados com células B16-F10 e tratados por 13 dias consecutivos.....	60
Tabela 10 – Efeito de PD01 nas doses de 3 e 30 mg/kg sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos C57Bl6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO/BE	Laranja de acridina/brometo de etídio (<i>Acridine Orange/Ethidium Bromide</i>)
B16-F10	Linhagem celular de melanoma murino
C57BL/6	Linhagem isogênica de camundongo com pelagem escura
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HE	Hematoxilina e Eosina
IV	Infravermelho
MRC-5	Linhagem celular de fibroblasto humano
PD01	6H-Dibenzo[b,h]xanteno
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Câncer de pele.....	19
3.2 Melanoma.....	20
3.2.1 Epidemiologia.....	22
3.2.2 Fisiopatologia.....	23
3.2.3 Tratamento.....	24
3.2.4 Busca por novas moléculas para o tratamento do melanoma.....	26
3.3 Desenvolvimento de novos fármacos.....	26
3.3.1 Análise <i>in silico</i> e caracterização físico-química na avaliação de novos fármacos.....	27
3.3.2 Ensaios pré-clínicos na avaliação de novos fármacos.....	28
3.4 Xantenos.....	29
3.4.1 Xanteno PD01.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Organograma experimental.....	32
4.2 Obtenção da molécula.....	33
4.3 Estudos <i>in silico</i>	33
4.3.1 <i>SwissADME</i>	33
4.3.2 <i>Docking molecular</i>	33
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1) e Carbono (RMN ^{13}C).....	34
4.3.4 Espectrometria de absorção na região infravermelho (IV).....	34
4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA).....	35
4.4 Cultivo celular.....	35
4.5 Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	35
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método <i>Alamar Blue</i>	35
4.5.2 Análise morfológica pela coloração diferencial por Kit Panótico Rápido.....	36
4.5.3 Avaliação da morte celular pelo método de <i>Acridina Orange</i> e <i>Brometo de Etídio</i> (AO/BE).....	36

4.6 Avaliação do potencial antitumoral <i>in vivo</i>	37
4.6.1 Animais.....	37
4.6.2 Protocolo experimental.....	37
4.6.3 Histopatologia.....	38
4.7 Análise estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Estudos <i>in silico</i>	40
5.1.1 <i>Docking molecular</i>	40
5.1.2 Parâmetros farmacocinéticos.....	44
5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e Carbono (RMN ¹³ C).....	44
5.1.4 Espectrometria de absorção na região infravermelho (IV).....	48
5.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) eb Termogravimetria (TGA).....	49
5.2 Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	52
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método <i>Alamar Blue</i>	52
5.2.2 Análise morfológica.....	54
5.2.3 Avaliação da morte celular pelo método de <i>Acridina Orange</i> e <i>Brometo de Etídio</i> (AO/BE).....	56
5.3 Avaliação do potencial antitumoral <i>in vivo</i>	59
5.3.1 Histopatologia.....	62
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERENCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o mais comum entre todos os tipos de câncer. O principal fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia é a exposição à radiação ultravioleta, que induz a lesões no DNA (Instituto Nacional do Câncer, 2022). De forma geral, o câncer de pele é classificado conforme a origem celular, portanto, existe o câncer de pele do tipo melanoma que se forma nos melanócitos e o câncer de pele do tipo não melanoma que são provenientes dos queratinócitos, este último, podendo ainda ser categorizado em carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (Gruber; Zito, 2023). O melanoma corresponde a aproximadamente 1% de todos os casos de câncer de pele, porém é responsável pela maioria das mortes associadas a essa neoplasia, devido à sua natureza agressiva, alto potencial metastático e prognóstico desfavorável quando não diagnosticado e tratado em estágios iniciais (Guy et al., 2015; Ferlay et al., 2021).

As opções terapêuticas para o melanoma são determinadas pelo estágio e pela localização do tumor. Para os casos iniciais, a cirurgia é o tratamento principal, enquanto nos estágios mais avançados, especialmente na presença de metástases, pode ser necessário recorrer a terapias complementares, como quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou terapia direcionada (American Cancer Society, 2024). O melanoma está associado a um prognóstico geralmente desfavorável e frequentemente requer tratamentos combinados. Embora imunoterapia, terapia direcionada e quimioterapia tenham representado avanços significativos no tratamento dessa neoplasia, esses tratamentos enfrentam desafios consideráveis, incluindo a heterogeneidade do paciente e do tumor, as doses clínicas toleráveis e os mecanismos de resistência (Lugowska et al., 2018; Domingues et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2022), em 2020 o câncer de pele não melanoma foi o quinto câncer mais comumente relatado no mundo, com 1,20 milhões de casos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2022), neste mesmo período, o melanoma resultou em 1.923 óbitos no Brasil. Destes, 1.120 ocorreram em homens, com uma taxa de mortalidade de 1,08 por 100.000 homens, enquanto em mulheres foram registrados 803 óbitos, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 0,91 por 100.000 mulheres. Para cada ano do triênio de 2023 a 2025 são estimados 8.980 novos casos de câncer de pele melanoma, com risco estimado de 4,37 casos novos a cada 100 mil homens e 3,90 a cada 100 mil mulheres, sendo mais incidente na região sul quando comparado as outras regiões, independentemente do sexo.

Embora estatisticamente o câncer de pele não melanoma seja superior no número de casos, o melanoma possui uma maior propensão de disseminação para outras áreas do corpo do que o câncer de pele não melanoma e por isso representa uma das formas mais agressivas da doença. As taxas de sobrevivência de cinco anos para o melanoma em geral é de 94%, variando de >99% para casos diagnosticados em estágio localizado a 32% para doença em estágio distante (American Cancer Society, 2023).

Embora os tratamentos convencionais, como cirurgia, quimioterapia e radiação, sejam amplamente utilizados, sua eficácia é frequentemente prejudicada pela resistência e efeitos colaterais, o que tem impulsionado a busca por terapias alternativas. As abordagens terapêuticas para o melanoma estão avançando rapidamente, mas a eficiência desses tratamentos também pode ser reduzida devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, o que reforça a necessidade de explorar novos alvos terapêuticos (Domingues et al., 2018).

Nas últimas décadas, os xantenos, classe de compostos tricíclicos distribuídos na natureza podendo ser obtidos também por meio de síntese química, receberam atenção especial em virtude de suas diversas atividades biológicas. Modificações na estrutura química desses compostos geram derivados de xanteno que representam compostos bioativos em potencial, exibindo atividade farmacológicas relevantes tais como antibacteriana, antifúngica e inseticida, antidiabética, anti-Alzheimer, anti-inflamatória e antitumoral (Maia et al., 2021; Ghahsare et al., 2019).

Entre as diversas atividades identificadas nesses compostos, a atividade antitumoral destaca-se como uma das principais áreas de interesse na pesquisa. Em 2015, Thompson e seus colaboradores conduziram um estudo multicêntrico de fase II, no qual trataram 80 pacientes com melanoma em estágio III e IV utilizando uma solução à base de um corante xanteno fotossensibilizante denominado PV-10. Esse tratamento proporcionou controle local durável, alcançando uma taxa de resposta global de 51% e uma taxa de resposta completa de 26% para lesões-alvo. Vale ressaltar que o composto investigado neste estudo não é derivado da estrutura do PV-10.

A identificação de novos candidatos a drogas antimelanoma dessa classe de compostos são atraentes tendo em vista os relatos sobre a citotoxicidade e aplicações de xantenos e seus derivados. Portanto, o propósito deste trabalho objetiva caracterizar físico-quimicamente um derivado de xanteno e investigar o potencial antimelanoma dessa molécula em modelos experimentais *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, avaliando os prováveis mecanismos de morte celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimelanoma de um novo derivado de xanteno por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar através de *softwares* parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, lipofilicidade, semelhança com drogas e química medicinal da molécula PD01.
- Confirmar a estrutura da molécula PD01 através de métodos espectroscópicos e sua estabilidade térmica.
- Analisar o potencial citotóxico e o tipo de morte celular induzido *in vitro* pela molécula PD01.
- Avaliar a atividade antitumoral de PD01 em modelo *in vivo* de melanoma murino e seus achados histopatológicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de pele

Os cânceres de pele possuem uma das maiores incidências globais de qualquer forma de câncer. Os tumores são classificados de acordo com a origem celular, seguindo duas categorias principais: câncer de pele não melanoma, o qual surge a partir de queratinócitos, classificado em carcinoma basocelular e espinocelular, sendo mais comum no sexo masculino; e o câncer de pele melanoma, que surge a partir dos melanócitos e possui incidência igual entre os sexos, representando o tipo mais grave entre os cânceres de pele porque são propensos a metástases, sendo responsável por até 90% das mortes (Apalla et al., 2017; Jones et al., 2020).

Os principais fatores de risco para o carcinomas de queratinócitos são pele branca, cabelos ruivos/loiros, olhos azuis/esverdeados, imunossupressão, tabagismo (somente para carcinoma espinocelular) e menos comuns o contato com arsênico e psoralênicos, úlceras crônicas, cicatrizes de queimaduras, albinismo e xeroderma pigmentoso. Para o melanoma, causas associadas ao desenvolvimento desse tipo de câncer de pele incluem pele branca, histórico familiar/pessoal de câncer de pele, número de pintas e imunodeficiência (Jones et al., 2020).

O pigmento da pele é uma condição inerente para a evolução da doença, sendo mais incidente na população branca do que em outros grupos étnicos- raciais. Além disso, a idade também está fortemente associada à incidência do câncer de pele, ocorrendo principalmente em pessoas com 50 anos de idade até aquelas com mais de 75 anos (Jones et al., 2020). Outra característica que os cânceres de pele compartilham, e que é o principal fator de risco para o desenvolvimento da carcinogênese de pele é a radiação ultravioleta solar ou artificial, sendo os raios UVA e UVB as principais bandas de radiação ultravioleta (UV) que atingem a superfície terrestre. Os raios UVA causam danos oxidativos ao DNA através da indução de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), enquanto os raios UVB podem ser absorvidos diretamente pelas moléculas de DNA (Liu-Smith et al., 2017).

Os danos induzidos pelos raios UVB estão relacionados a mecanismos químicos que envolvem a excitação das bases de pirimidina, produzindo principalmente dímeros de ciclobutano pirimidina, sendo essas as lesões mais frequentes no DNA. O UVA, além de induzir a formação direta de dímeros de ciclobutano pirimidina, induzem a formação de EROS responsáveis pela oxidação de bases nitrogenadas como a reação de oxidação de

quimioexcitação em melanócitos que gera oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$). A insurgência do câncer de pele pode ocorrer quando danos ao DNA não são reparados ou quando as células danificadas não são eliminadas por apoptose, o que leva a expressão de propriedades mutagênicas, como ativação de proto-oncogenes ou inativação dos genes de supressão tumoral (Cadet; Douki, 2018).

3.2 Melanoma

O desenvolvimento de neoplasias melanocíticas, as quais podem variar em lesões benignas ou malignas, nomeadas respectivamente como nevos melanocíticos e melanoma, têm origem nos melanócitos, que são as células produtoras de melanina (Mort et al., 2015).

A gravidade do melanoma está relacionada ao grau de envolvimento e disseminação para linfonodos e outros tecidos. No estágio I e II não existe comprometimento linfonodal e metástase, diferentemente do estágio III em que podem ocorrer metástases linfonodais. O estágio IV é caracterizado pela metástase de células malignas do local de origem para órgãos distantes, portanto, considerada a fase mais avançada do câncer de pele. Por essa razão, os índices de cura para o câncer de pele não melanoma são altos se detectados precocemente (Nguyen et al., 2020).

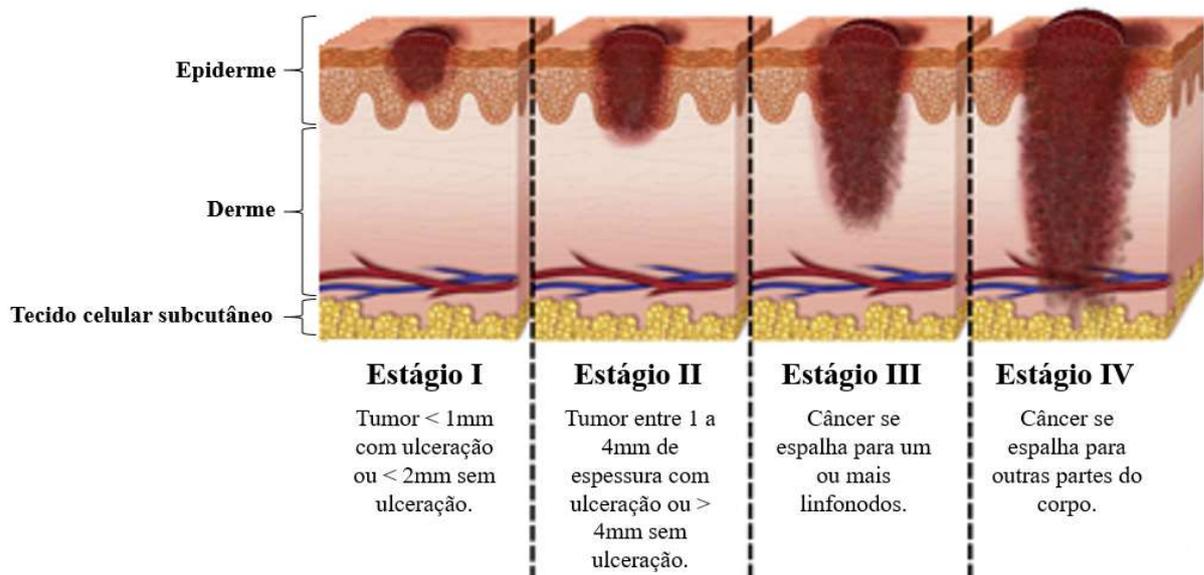


Figura 1. Estágios de desenvolvimento tumoral do melanoma. Estágio I: Tumor restrito à epiderme, com espessura <1mm com ulceração ou <2mm sem ulceração; Estágio II: Tumor pode ultrapassar a epiderme, com espessura entre 1 a 4mm com ulceração ou >4mm sem ulceração; Estágio III: O câncer atinge a derme e pode se espalhar para linfonodos; Estágio IV: O câncer se espalha para outras partes do corpo, atingindo o sistema linfático e a corrente sanguínea. Adaptada de: Instituto de Física de São Carlos, 2016.

O melanoma pode apresentar características clínicas evolutivas e distintivas que auxiliam no diagnóstico inicial, os quais enquadram-se nos critérios da chamada regra “ABCDE”, onde “A” representa assimetria, nesse parâmetro é verificado se uma metade da lesão difere da outra metade na aparência; “B” representa bordas, em geral, lesões de melanoma possuem contornos irregulares; “C” significa cor, nesse critério são verificados se as lesões apresentam mais de uma coloração; “D” significa diâmetro, as lesões de melanoma podem apresentar diâmetro maior que seis milímetros; e “E” representa evolução, onde são avaliados se houve alterações da lesão ao longo do tempo em algum aspecto como forma, cor, tamanho ou espessura (American Cancer Society, 2023; Elder et al., 2018).

Em 2018, a Organização Mundial da Saúde classificou o melanoma em nove subtipos, caracterizando-os de acordo com a exposição ao sol, epidemiologia, mutações e localização anatômica. Entre os melanomas associados ao dano solar cumulativo estão os de *disseminação superficial*, sendo a forma mais comum de melanoma nos países ocidentais, localizado normalmente no dorso em homens e na parte superior das pernas e panturrilhas em mulheres, alguns fatores de risco incluem o número total de nevos, especialmente se são clinicamente atípicos; o *lentigo maligno*, relacionado principalmente a populações que estão fortemente expostas aos raios solares, as manchas tendem a ter uma borda irregular tanto clinicamente quanto histologicamente e a pigmentação pode ser menor, às vezes até completamente amelanóticas; e os *desmoplásicos*, que também está associado a um alto dano solar cumulativo assim como o melanoma lentigo, as lesões são comumente amelanóticas ou pouco pigmentadas, em alguns casos o tumor pode se desenvolver a partir de uma mancha pigmentada preexistente, apresentando um padrão de crescimento desmoplásico com células fusiformes que diferem das demais células (Elder et al., 2018).

Os melanomas que não estão associados ao dano solar cumulativo são de *Spitz*, os quais geralmente apresentam lesões na forma de pápulas ou nódulos amelanóticos, as vezes ulceradas, com bordas elevadas simétricas e uma epiderme esticada cobrindo a lesão; os *acrais*, que ocorrem na pele glabra, sendo os mais frequentes em todo o mundo; os *mucosos*, os quais ocorrem em mucosas, principalmente nas cavidades orais, nasais, conjuntivas e em genitais; em *nevos congênitos*, que podem ocorrer no componente juncional ou dérmico dos nevos congênitos, sendo os nevos gigantes os que possuem maior risco para o surgimento de melanoma; em *nevos azuis*, que são raros e ocorrem como uma nova população de células que geralmente se desenvolvem no fundo de um nevo azul celular, apresentando uma distribuição dispersa de células fusiformes que são manifestadas na forma de lesões expansivas bulbosas

que se estendem até o tecido subcutâneo; e os *uveais*, também um subtipo raro que surge no trato uveal do olho, podendo manifestar alterações na visão ou outros sintomas oculares, alguns fatores de risco para esse subtipo incluem a presença de nevos comuns e atípicos, olhos claros, nevos da íris e propensão a queimaduras solares (Elder et al., 2018; Carvajal et al., 2023).



Figura 2. Subtipos de melanoma. A: Melanoma lentigo maligno; B: Melanoma de disseminação superficial; C: Melanoma uveal; D: Melanoma nodular. Adaptada de: Melanoma Brasil, 2024.

3.2.1 Epidemiologia

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (2020), os países que possuem as maiores proporções em prevalência de casos de melanoma no mundo por 100 mil habitantes em 5 anos a contar de 2020, para ambos os sexos em todas as idades, são Austrália (226.2), Nova Zelândia (203.2) e Dinamarca (177.6). Entre os países da América do Sul que possuem as maiores proporções em prevalência de casos de melanoma, considerando os mesmos parâmetros, estão Uruguai (24.0), França, Martinica (14.9), Chile (14.5), Porto Rico (12.8), Argentina (12.1), Brasil (11.9) e Peru (11.2).

No Brasil, o número de novos casos de câncer de pele melanoma estimados, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 8.980, o que corresponde a um risco de 4,13 por 100 mil habitantes, sendo mais incidente na região sul quando comparado com as demais regiões do país. Desse total de novos casos, 4.640 ocorreriam em homens e 4.340 em mulheres, que correspondem a um risco estimado de 4,37 novos casos a cada 100 mil homens e 3,90 a cada 100 mil mulheres. O estado com maior número de casos estimados é São Paulo (3.120), seguido por Santa Catarina (1.040) e Minas Gerais (900) (INCA, 2022).

A incidência de câncer de pele do tipo melanoma para região norte do Brasil para o ano de 2023, considerando o total de casos para ambos os sexos foi de 190 casos, para o Estado do Amazonas foram estimados 40 novos casos e para Manaus 20 casos (INCA, 2022).

3.2.2 Fisiopatologia

Os melanomas são tumores heterogêneos e seguem vias de evolução distintas que variam de acordo com o subtipo de melanoma, podendo diferenciar quanto a origem da célula, aos níveis cumulativos de exposição à radiação UV, apresentação clínica, padrão de metástase, mutações genéticas entre outras categorias biologicamente distintas. O estabelecimento do melanoma inicia a partir do ganho de função em um dos vários oncogenes que poderão dar origem a um *nevo melanocítico benigno* (Bastian, 2014).

A progressão do melanoma compreende a formação de um *nevo displásico*, que incluirá duas fases de crescimento, a radial, também chamado de *melanoma in situ*, caracterizada pelo crescimento lateral, sem competência para metástase, pois raras células conseguem atingir a derme, e a vertical ou *melanoma invasivo*, onde as células terão capacidade de romper a camada basal da epiderme e invadir a derme, onde são encontrados os vasos sanguíneos. Dessa forma, uma vez que as células tumorais conseguem atingir a circulação sanguínea, estas poderão disseminar para outros órgãos, caracterizando o *melanoma metastático* (Shain; Bastian, 2016).

A classificação genômica do melanoma cutâneo sugere quatro principais mutações genéticas relacionadas à doença, sendo em BRAF e NRAS, ambas envolvidas na ativação da via MAPK, além do NF1, um gene regula negativamente a atividade de RAS, e o tipo selvagem triplo, que representa um grupo caracterizado pela falta de mutações BRAF, N/H/K-RAS ou NF1 (Akbari et al., 2015). As mutações em BRAF são as mais frequentes, sendo encontrada em cerca 50% dos melanomas, principalmente a oncogene BRAF V600E, que resulta da substituição de um aminoácido de valina (V) por um ácido glutâmico (E) na posição 600 (Richtig et al., 2017).

Fisiologicamente, a proteína BRAF presente na via das MAPK é ativada pela ligação entre os sinais extracelulares e o seu receptor de membrana, normalmente tirosina quinase, que sinaliza para a proteína MEK, que ativa ERK atuando na proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Quando ocorre uma mutação no gene BRAF essa sinalização é hiperativada, acarretando no desenvolvimento tumoral (Vanni et al., 2020).



Figura 3. Representação da cascata de sinalização da via MAPK, na qual RAS ativa BRAF, que por sua vez sinaliza para MEK, levando à ativação de ERK que resulta em proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Fonte: Autoral.

O oncogene mais comum nos melanomas de disseminação superficial é o BRAF, principalmente o V600E. O lentigo maligno tem uma carga de mutações genômicas muito alta, incluindo o gene NF1, BRAF V600K, mutações não-V600E, gene NRAS 38 e em menor grau, no gene KIT. O melanoma desmoplásico segue uma trajetória evolutiva distinta da maioria dos outros melanomas devido a oncogenes como BRAF e NRAS estarem geralmente ausentes. Apesar disso, possuem uma carga de mutação muito elevada, dentre estas em genes NF1, NFKBIE e outras diversas mutações ativadoras da via MAPK. As alterações genômicas encontradas em tumores Sptiz são distintas, sendo descritas principalmente mutações nos genes ROS1, NTRK1, NTRK3, ALK, BRAF, MET, RET e HRAS. Os melanomas acrais possuem mutações em BRAF, NRAS e KIT. As principais mutações genômicas descritas para o melanoma mucoso são em KIT e NRAS. E entre as mutações mais comuns em melanomas de nevos congênitos grandes e intermediários estão as NRAS. Já para os melanomas em nevos azuis são os genes GNAQ e GNA11 os mais frequentes encontrados e para os melanomas uveais é mais comumente observado o ongene BAP1 (Elder et al., 2018).

3.2.3 Tratamento

Até início dos anos 2000, a quimioterapia era a base do tratamento para o melanoma metastático, sendo a dacarbazina a primeira medicação aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Ao longo dos anos, estudos demonstraram que as taxas de respostas e os efeitos a longo prazo da dacarbazina eram baixos, o que acarretou na busca pelo desenvolvimento de outros agentes quimioterápicos como temozolomida e fotemustina, os quais, em geral, não apresentaram melhora significativa na sobrevida no tratamento do melanoma (Nguyen et al., 2020).

A resistência aos medicamentos quimioterápicos para o melanoma está provavelmente associada a um mecanismo de resistência à apoptose. Apesar disso, a quimioterapia é até os dias atuais indispensável, sendo principalmente indicado para terapia paliativa de tumores

progressivos e recidivantes. Outra opção terapêutica que associada ao tratamento sistêmico, confere maior benefício é a ressecção cirúrgica, que pode ser utilizada a depender do estágio em que o tumor se encontra, inclusive, podendo ser a primeira escolha de tratamento em estágio I ao III. Normalmente, os procedimentos cirúrgicos incluem excisão da lesão com margens de segurança a depender das características do tumor (Domingues et al., 2018; Nguyen et al., 2020).

A radioterapia normalmente é utilizada em conjunto com outras terapias, sendo principalmente indicada para o tratamento de metástases ósseas, cutâneas e cerebrais. Uma alternativa aos tratamentos convencionais para o tratamento paliativo do melanoma em estágios III ou IV é a terapia fundamentada na luz, denominada terapia fotodinâmica, que baseia-se no estresse oxidativo desencadeado pela ativação de um fármaco fotossensibilizador em determinado comprimento de onda. Esta terapia apresenta alguns inconvenientes para o tratamento do melanoma como mecanismos de proteção por pigmentação e resistência ao estresse oxidativo (Domingues et al., 2018).

Com o advento da medicina de precisão, avanços significativos no entendimento da biologia tumoral e do papel fundamental do sistema imunológico permitiram a criação de terapias personalizadas contra o câncer. Entre as imunoterapias atualmente disponíveis para o melanoma metastático ou irresssecável estão os receptores de morte programada (anti-PD-1), nivolumabe, pembrolizumabe e o anticorpo monoclonal (anti-CTLA-4), ipilimumabe. Entre as terapias direcionadas para o melanoma, destacam-se os inibidores de BRAF como vemurafenibe e dabrafenibe, e os inibidores de MEK cobimetinibe e trametinibe (Lugowska et al., 2018; Domingues et al., 2018).

Apesar das imunoterapias e terapias direcionadas demonstrarem efeitos significativos no tratamento do melanoma, principalmente no que se refere ao aumento da sobrevida dos pacientes, estas terapias também são prejudicadas pela resistência aos medicamentos e reações adversas em pacientes. Dessa forma, combinações entre tratamentos medicamentosos vêm sendo estudadas ao longo dos anos com o intuito de melhorar a resposta terapêutica (Nguyen et al., 2020; Domingues et al., 2018; Ostrowski; Fisher, 2021).

A resistência aos medicamentos inibidores BRAF acontecem após meses de terapia, sendo na maioria das vezes ocasionado pela reativação da via MAPK/ERK ou pela regulação positiva de vias de proliferação e sobrevivência, desencadeados a partir de mecanismos genéticos e epigenéticos, como a metilação do DNA, modificações de histonas, a estabilidade

do RNA, o posicionamento nucleossômico e a remodelação da cromatina (Czarnecka et al., 2020). Na imunoterapia, cerca de 40% dos pacientes com boa resposta as imunoterapias acabam recidivando (resistência adquirida) ou podem, inclusive, não apresentar uma resposta inicial (resistência inata), podendo incluir mecanismos de resistência como a perda da maquinaria de apresentação de antígenos e deficiência na sinalização do interferon (Ostrowski; Fisher, 2021). Além disso, a toxicidade continua sendo um ponto crítico para imunoterapias (Brahmer et al., 2021).

3.2.4 Busca por novas moléculas para o tratamento do melanoma

Nos últimos anos, grandes avanços na terapia do melanoma, principalmente no que se refere às terapias direcionadas e imunoterapias, beneficiaram a sobrevivência de pacientes, com uma diminuição de cerca de 4% nas taxas de mortalidade de melanoma (Ernst; Giubellino, 2022). Apesar das vantagens desses progressos, as imunoterapias e terapias direcionadas continuam enfrentando alguns obstáculos como a resistência aos tratamentos (Ostrowski; Fisher, 2021). A eficácia dessas terapias, mesmo em combinação, atingiram um platô (Huang; Zappasodi, 2022). Portanto, a busca por novas moléculas para o tratamento do melanoma é uma necessidade, dado a gravidade da doença e os mecanismos de resistência.

3.3 Desenvolvimento de novos fármacos

A descoberta de novos fármacos desde a pesquisa até a aprovação para comercialização é um processo complexo, longo e extremamente importante. De maneira geral, os estágios de desenvolvimento de um novo fármaco envolvem a 1) *descoberta do fármaco*, onde as moléculas candidatas são escolhidas com base em suas propriedades farmacológicas, seguido pelo 2) *desenvolvimento pré-clínico*, durante o qual são realizados diversos estudos não humanos, como os testes de toxicidade, análise farmacocinética e formulação, e o 3) *desenvolvimento clínico*, onde são realizados teste de eficácia, efeitos adversos e de potenciais perigos em voluntários (Rang et al., 2016).

Cerca de metade das moléculas candidatas a fármacos falham durante a fase de desenvolvimento pré-clínico, que compreende a etapa que objetiva satisfazer as exigências experimentais antes dos testes em humanos. Dentre as causas que explicam estes fracassos estão problemas derivados da biodisponibilidade e toxicidade, que podem estar relacionados ao

escasso conhecimento acerca da natureza da molécula em estudo (Rang et al., 2016). Dessa forma, o uso de métodos *in silico*, estudos físico-químicos, ensaios em modelos *in vitro* e *in vivo* são úteis na determinação dessas respostas.

3.3.1 Análise *in silico* e caracterização físico-química na avaliação de novos fármacos

Uma alternativa para diminuição dos custos associados ao desenvolvimento de medicamentos, muito utilizado por pesquisadores e pelas indústrias farmacêuticas na triagem de candidatos a fármacos, é a técnica computacional conhecida como *docking molecular*. Esta técnica usa as estruturas 3D de duas moléculas, o ligante e seu alvo, prevendo a orientação preferencial da primeira em relação à segunda para formar um complexo estável, sendo possível estimar através do ligante qual uma maior atividade apresentada frente a um alvo farmacológico conhecido (Crampon et al., 2022).

Na descoberta de medicamentos, o ligante é o princípio ativo e o alvo é uma macromolécula biológica, por exemplo, uma proteína ou DNA. Para obter a estrutura 3D de uma molécula podem ser empregados vários métodos experimentais como os baseados em raios-X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Microscopia Eletrônica (EM). Além disso, existem bancos de dados de estruturas 3D de proteínas, por exemplo, o Banco de Dados de Proteínas (PDB), que incluem quase 90% das estruturas resolvidas com cristalografia de raios-X e quase 8% resolvidos com RMN (Crampon et al., 2022).

Outros aspectos que desempenham papéis cruciais na escolha de moléculas referem-se aos processos farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção) de um fármaco, os quais estão intrinsecamente relacionados à sua capacidade de atravessar membranas e, conseqüentemente, à sua solubilidade relativa em óleo e água, que é definida lipoficidade (Silva, 2012; Andrei et al., 2012). Estes parâmetros podem ser estimados através de softwares como a ferramenta *SwissADME*, os quais auxiliam na investigação de potenciais candidatos a fármacos (Daina et al. 2017).

O desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico requer uma série de estudos que comprovem principalmente sua identidade, pureza, solubilidade e estabilidade em meios biológicos. Para identificação estrutural da molécula, algumas análises espectrométricas como RMN de hidrogênio (^1H) e de carbono (^{13}C) e a espectrometria de absorção na região do

Infravermelho (IV) e do Ultravioleta (UV) são úteis no controle de qualidade de produtos, relacionado a pureza (Andrei et al., 2012).

As substâncias possuem diferentes padrões de absorção, dessa forma, a espectrometria permite identificar substâncias com base no espectro gerado. A RMN de ^1H e de ^{13}C fornecem dados sobre a quantidade, o tipo e o ambiente dos átomos de hidrogênio e carbono, respectivamente, o que auxilia na determinação estrutural e oferece informações sobre a estereoquímica da molécula analisada. O IV e UV oferecem informações sobre os grupos funcionais presentes, tais como grupamentos carbonila, anéis aromáticos, presença de insaturações, hidroxilas, entre outros (Silva, 2012; Andrei et al., 2012).

Uma abordagem amplamente empregada utilizada para avaliar as propriedades físico-químicas de fármacos são os métodos de análise térmica, os quais exigem apenas pequenas quantidades de amostra, com preparação simples e medição rápida (Wesolowski; Leyk, 2023). Entre os principais métodos aplicados a produtos farmacêuticos sólidos estão a Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), as quais determinam os limites de temperatura em que a substância alvo pode ser processada sem que suas propriedades físico-químicas sejam alteradas, indicando, portanto, parâmetros de estabilidade, compatibilidade e pureza (Jendrzejewska et al., 2023; Silva, 2012).

3.3.2 Ensaios pré-clínicos na avaliação de novos fármacos

No desenvolvimento pré-clínico, é iniciado uma série de ensaios que compreendem principalmente testes de segurança e toxicidade do fármaco, os quais estimam o risco associado à exposição do candidato a fármaco no contexto das necessidades terapêuticas e da provável duração de seu uso. De acordo com a proposta de utilização do medicamento, os testes pré-clínicos de toxicidade podem incluir toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica, além do efeito sobre o desempenho reprodutivo, potencial carcinogênico e mutagênico (Katzung; Trevor, 2017).

Em diversos estudos biológicos, a avaliação da atividade citotóxica em cultura de células é importante pois identifica a viabilidade celular de uma determinada população. Dessa forma, os ensaios de citotoxicidade são utilizados como uma triagem inicial que é comumente empregada para avaliar a resposta de células a uma molécula ou agente químico (Adan et al., 2016). O teste da redução de resazurina, também conhecida como ensaio do *Alamar Blue*, é rotineiramente utilizado para medição tanto da citotoxicidade quanto da proliferação celular. O

princípio do teste baseia-se na capacidade oxirredutora da resazurina, que é um corante azul não fluorescente que pode ser reduzida por NADPH, NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido), entre outros, à resorufina, altamente fluorescente de cor rosa. Além da versatilidade, o ensaio da resazurina possui fácil execução, aplicabilidade para células aderentes ou suspensas e é comparativamente econômico (Rampersad, 2012).

Em ensaios pré-clínicos, o uso de modelos animais na pesquisa oferece uma série de contribuições para o entendimento e o avanço da medicina moderna, especialmente na compreensão dos processos de doenças humanas, prevendo respostas e eficácia terapêutica (Robinson et al., 2019). Dessa forma, podem ser determinados parâmetros como dose não tóxica máxima, análises usual de perda de peso, histológicas e bioquímicas, além de testes farmacocinéticos de absorção, metabolismo, distribuição e eliminação (estudos ADME), assim como podem ser feitas correlações entre os efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos e concentração plasmática e exposição ao fármaco (Rang et al., 2016).

Dentro desse contexto, os ensaios *in vivo* assumem um papel central, especialmente no desenvolvimento de terapias anticancerígenas. Em particular, os modelos de xenoenxerto, onde linhagens celulares tumorais são enxertadas em camundongos imunocomprometidos, avaliando a farmacologia, a eficácia e os perfis de segurança do candidato a fármaco. Os tumores singênicos são os modelos pré-clínicos mais utilizados para avaliar a terapia anticancerígena, tendo como exemplo a linhagem de camundongos C57BL/6 para estudos de melanoma (Olson et al., 2018).

Nas últimas décadas, os xantenos ganharam notoriedade dos pesquisadores devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos, incluindo atividades antitumorais contra o melanoma (Maia et al., 2021). Dessa forma, xantenos representam substâncias com potencial para investigação como candidato a fármaco antimelanoma.

3.4 Xantenos

Os xantenos pertencem a uma classe de compostos tricíclicos caracterizados por dois anéis de benzeno ligados a um anel pirano no centro (Figura 4). Podem ser encontrados na natureza, mas são na maioria dos casos sintetizados, sendo mais comumente obtidos através de modificações em xantonas (Maia et al., 2021). A estrutura química básica do xanteno é

considerada versátil porque permite a incorporação de grupos substituintes em seu núcleo, os quais estão intimamente relacionados às diversas propriedades biológicas apresentadas por este composto (Silva et al., 2022).

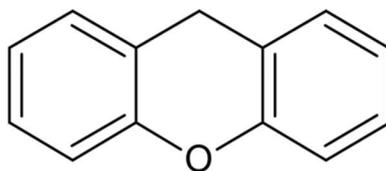


Figura 4. Estrutura química do xanteno.
Fonte: Autoral.

Entre as principais aplicações dos xantenos podem ser destacadas sua ampla funcionalidade como sondas fluorescentes para visualização de biomoléculas, incluindo fluoróforos conhecidos como fluoresceína, rodamina B e eosina (Colas et al., 2021), na utilização do rosa bengala e derivados de xantenos como sensibilizador em terapia fotodinâmica anticâncer (Panzarini et al., 2014; Wang et al., 2020) e como corante em alimentos (Tabara et al., 2011; Sato et al., 2020). Além disso, os xantenos e seus derivados são amplamente associados a uma extensa gama de atividades farmacológicas efetivas como antibacteriana, antifúngica e inseticida, antidiabética, anti-Alzheimer, anti-inflamatória e antitumoral (Ghahsare et al., 2019).

Vários métodos sintéticos podem ser utilizados para obtenção de xantenos, os quais irão depender do derivado de xanteno que se pretende obter (Silva et al., 2022). A incorporação de grupos substituintes em seu núcleo, particularmente na posição 9, demonstram influenciar as propriedades físico-químicas de modo a desencadear compostos bioativos em potencial, são exemplos 9H-Xanteno, 9-hidroxixanteno, xanteno-9-ácido carboxílico e seus derivados, os quais expressam atividades de neuroproteção, antiparasitária, citotóxica, antibacteriana, entre outras (Maia et al., 2021).

A atividade antitumoral é uma das principais áreas de interesse no estudo das atividades biológicas de derivados de xantenos. Diversas pesquisas têm documentado a citotoxicidade desses compostos, principalmente em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano, mama, próstata, pulmão, entre outros (Maia et al., 2021). Um estudo realizado por Wang et al. (2020), demonstrou a atividade fotossensibilizante de um derivado xanteno-indólico, denominado DHX-1, contra células de adenocarcinoma mamário e de fibroblastos, tanto na forma de molécula livre quanto associada a um carreador lipídico nanoestruturado.

Em 2015, Thompson et al., realizaram um estudo multicêntrico de fase II tratando 80 pacientes com melanoma em estágio III e IV com uma solução à base de um corante xanteno fotossensibilizante denominada PV-10, o qual promoveu controle local durável, produzindo uma taxa de resposta global de 51% e uma taxa de resposta completa de 26% para lesões-alvo. Em 2019, uma patente de Singer et al., revelou métodos de tratamento utilizando o PV-10 em tumores sólidos cancerosos pediátricos que provocaram a supressão de células tumorais.

3.4.1 Xanteno PD01

O 9H-Xanteno é uma classe geral de compostos heterocíclicos naturais e sintéticos que possui um amplo espectro de atividades biológicas como antibacteriana, antiviral, antimalárica, antifúngica, anti-inflamatória, anticancerígena, entre outras. Em detrimento a tais propriedades, uma pesquisa realizada por Carneiro e colaboradores (2016) sintetizaram a partir do 9H-Xanteno, 8 novos derivados preparados por diferentes metodologias. Dentre os derivados de xanteno formados, o 6H-dibenzo[b,h]xanteno (PD01) foi escolhido para o presente estudo devido um *screening* realizado no Laboratório de Atividades Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, que avaliou a citotoxicidade de mais de 30 substâncias em linhagem celular de melanoma humano (SK-MEL-28) e demonstrou melhores resultados para o derivado PD01. A crescente evidência da eficácia de xantenos e seus derivados em terapias anticâncer, juntamente com resultados positivos de estudos pré-clínicos e clínicos, ressalta o potencial dessa classe como uma alternativa promissora para o tratamento do melanoma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Organograma experimental

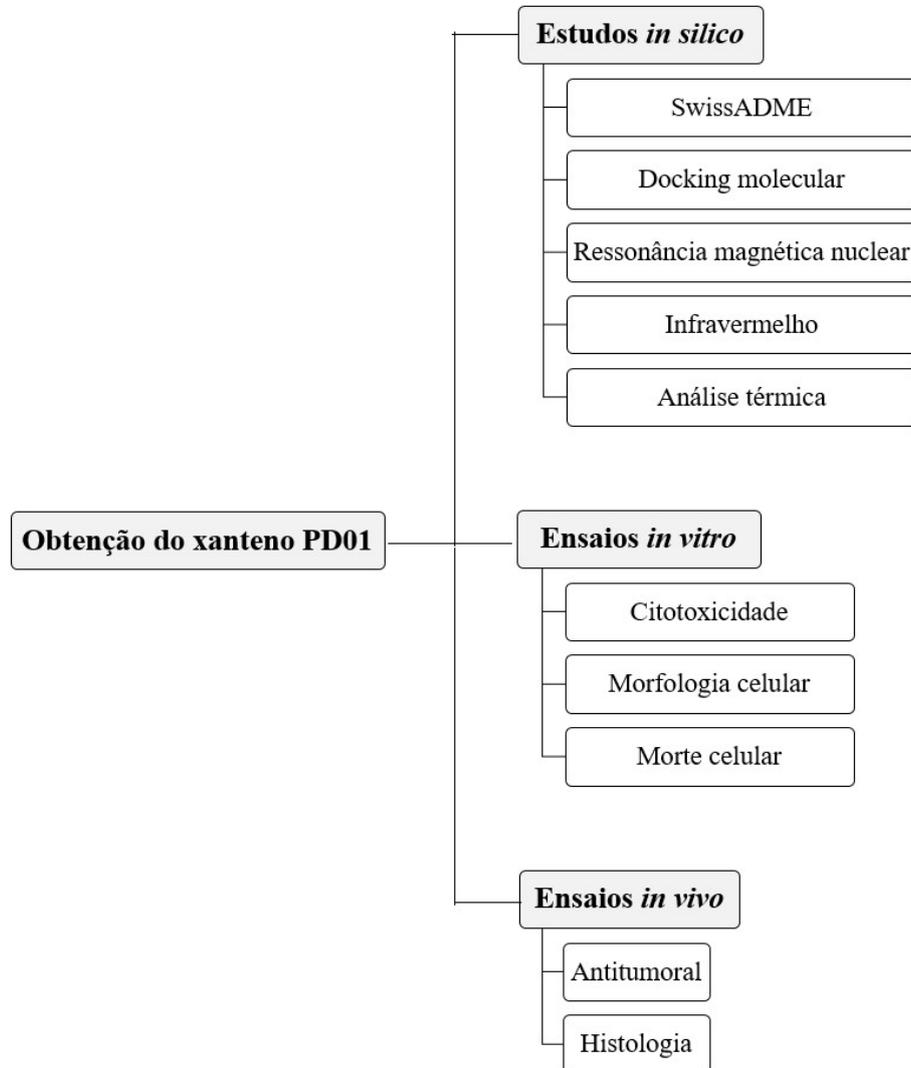


Figura 5. Delineamento experimental dos ensaios realizados.

4.2 Obtenção da molécula

O derivado de xanteno PD01 (6H-dibenzo[b,h]xanteno) foi sintetizado através da reação de lawsona com benzaldeído na presença de uma quantidade catalítica de ácido p-toluenossulfônico a 80 °C, a qual a partir de técnicas espectroscópicas revelaram a estrutura química observada na Figura 6. A molécula foi cedida pelo professor Dr. Vitor Francisco Ferreira para estudos biológicos subsequentes, tendo sido sintetizada no Laboratório de Síntese de Carboidratos e Nucleotídeos do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense.

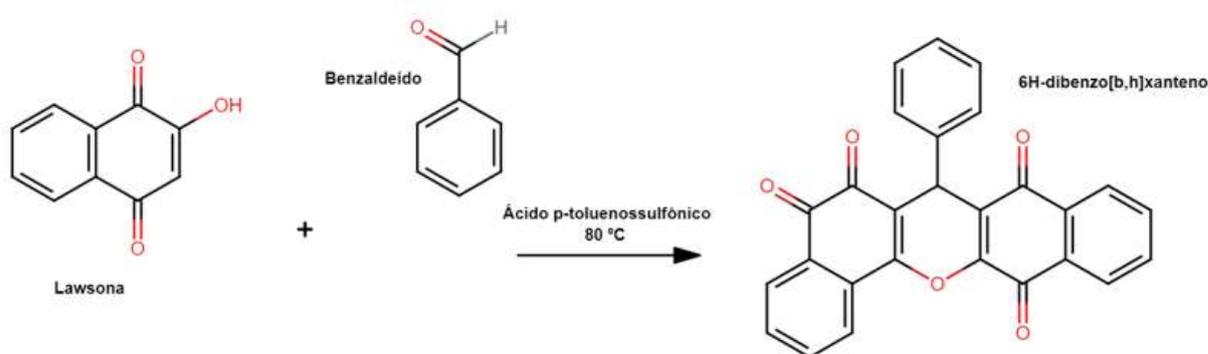


Figura 6. Reação de síntese para obtenção da molécula de classe 6H-Dibenzo[b,h]xanteno (PD01).

4.3 Estudos *in silico*

4.3.1 *SwissADME*

O advento da bioinformática consolidou vários programas que podem ser acessados para prever alguns parâmetros-chave que auxiliam na descoberta de medicamentos, como a ferramenta *SwissADME*, que fornece gratuitamente modelos preditivos rápidos e robustos que estimam propriedades físico-químicas, lipofilicidade, farmacocinética, semelhança com drogas e química medicinal (Daina et al., 2017). Assim, o PD01 foi avaliado através da plataforma *SwissADME* quanto aos parâmetros supracitados.

4.3.2 *Docking molecular*

A estrutura tridimensional da proteína BRAF (PDB ID: 5JRQ) foi obtida na base de dados *Protein Data Bank*, onde foi dado prioridade ao ano mais recente de publicação, e especialmente um ligante cristalizado para validação dos protocolo por *redocking* (Grasso et al., 2016). O receptor foi inicialmente preparado utilizando o software Schrodinger Maestro

2023-4, onde adicionou-se átomos de Hidrogênio à estrutura no $\text{pH} \approx 7,4$, removeu-se moléculas de água, cofatores e ligantes pré-existentes. Quanto ao ligante, um 7-Phenyl-7,13-dihydro-8H-dibenzo[b,h]xanthene-5,6,8,13-tetraone foi desenhado no software *MarvinS-ketch* 23.17 e gerado sua estrutura 3D a partir de uma otimização com o campo de força MMFF94. Em seguida, foi utilizado o software *Gaussian 09W* para otimização estrutural considerando o formalismo quântico de sua estrutura eletrônica por meio da abordagem DFT (Density Functional Theory) com as bases 6-311g (2d,p) e funcional B3LYP. O pacote *AutoDock Tools* v.1.5.7 foi utilizado para conversão dos arquivos do receptor e ligante para .pdbqt, onde foram atribuídos as cargas parciais Gasteiger e definido as ligações rotacionáveis do ligante.

O software de *docking* molecular utilizado foi o *AutoDock Vina* v.1.2.5 (Eberhardt et al., 2021) onde o parâmetro exaustividade foi ajustado para 96, o que aumentou o tempo de busca pelas conformações do ligante. As coordenadas do sítio de ligação foram $\text{center_x} = -11.461952$; $\text{center_y} = -4.338429$; $\text{center_z} = -29.450848$, enquanto as dimensões do gridbox ou caixa de busca foram de 40\AA . No *redocking*, considerou-se como critério de validade um RMSD (raiz quadrada do desvio médio quadrático) inferior a 2\AA para o alinhamento estrutural entre a conformação teórica e experimental da medicação Vemurafenib. A etapa de alinhamento foi realizada com a ferramenta LS-Align (<https://zhanggroup.org/LS-align/>).

4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker Advance III HD, observando os núcleos de ^1H e de ^{13}C a 500,13 e 125,76 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm com gradiente de campo na direção Z, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) para solubilizar a substância. Os dados obtidos das injeções foram processados através do *software* Mestrenova e comparados com os dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias. As análises foram realizadas na Central Analítica no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Amazonas.

4.3.4 Espectrometria de absorção na região infravermelho (IV)

O espectro no infravermelho foi obtido utilizando-se o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do

dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 4000 a 650 cm^{-1} , na resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)

As análises de sensibilidade térmica foram realizadas em um equipamento SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instrument, no Laboratório de Ensaaios Físico-Químicos dos Materiais da Universidade Federal do Amazonas. A amostra foi aferida a 5,325 mg, a taxa de aquecimento foi de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, da temperatura ambiente até a temperatura final de 600 $^{\circ}\text{C}$, com fluxo de gás de Nitrogênio N 5.0 de 30 mL/min. O cadinho utilizado nos testes foi o de alumínio de 90 microlitros sem tampa.

4.4 Cultivo celular

As linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-28), melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto humano (MRC-5) foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco by Life Technologies) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37 $^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 . O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células era alcançado, ou quando houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens, foi utilizada solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para dissociar as células das garrafas de cultura.

4.5 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método *Alamar Blue*

A atividade citotóxica do derivado xanteno PD01 foi realizada através do ensaio de *Alamar Blue*[®], segundo metodologia descrita por Ahmed e seus colaboradores (1994), em três linhagens celulares de SK-MEL-28, B16-F10 e MRC-5. Em microplacas de 96 poços, as células foram semeadas (100 μL) na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço. A fim de determinar os valores de CI_{50} (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50%), as células foram

tratadas com o PD01 nas concentrações crescentes que variaram de 1,25 a 20 μM (triplicata) em tempos de exposição de 72 horas. Após esse tempo, 10 μL da solução de *alamar blue* 0,4% foram adicionados em cada poço da placa, seguindo para incubação de 2 horas para as linhagens de melanoma e 3 horas para a linhagem de fibroblasto. Após o período de incubação, foi realizada a leitura de fluorescência com filtro e excitação de 540 nm e filtro de emissão de 585 nm em equipamento DTX800 Beckman e Coulter. A determinação do valor de concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi realizada por teste de regressão não-linear através do software GraphPad Prism 6.0.

4.5.2 Análise morfológica pela coloração diferencial por Kit Panótico Rápido

O estudo da morfologia celular foi realizada em SK-MEL-28, B16-F10 e MRC-5, segundo metodologia descrita por Wang e seus colaboradores (2009). As células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 7×10^4 células/mL. No dia seguinte, as células foram tratadas com o PD01 nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM . Após o período de incubação de 48 horas as células foram tripsinizadas e uma alíquota (100 μL) de cada amostra foi citocentrifugada a 2000 rpm por 5 min. Após secas, as lâminas foram coradas com kit Panótico Rápido Laborclin (código 620529) com a sequência de 10/10/3 mergulhos em cada corante. As alterações morfológicas foram analisadas por microscopia óptica (Eclipse Nikon) utilizando o software Nis-Elements 4.30.01 (Nikon). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2%) utilizado para diluir a substância testada.

4.5.3 Avaliação da morte celular pelo método de *Acridina Orange* e *Brometo de Etídio* (AO/BE)

O ensaio de coloração diferencial usando *acridina orange* e *brometo de etídio* foi utilizado para diferenciar células viáveis, em apoptose ou necrose em B16-F10 (RALPH et al., 2016). As células B16-F10 foram cultivadas em placas de 12 poços a 6×10^4 células/poço e tratadas com o PD01 a 2,5; 5 e 10 μM . O DMSO (0,02%) foi utilizado como controle negativo. Após 24 horas de tratamento, as células foram retiradas da placa com tripsina para obtenção da suspensão celular. A suspensão de células foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min para obtenção do pellet de células, descartado do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 μL de meio de cultura. Uma solução contendo 10 μL desta ressuspensão celular e 15 μL de cada corante AO/BE (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparada e incubada por 5 min. Posteriormente, os 40 μL

desta solução foram transferidos para uma lâmina e recoberta com lamínula, seguindo para análise por microscópio de fluorescência (Eclipse Nikon) utilizando filtros DAPI, EGFP e TRICT (358-461 nm, 460-510nm e 528-590 nm, respectivamente). As células foram fotografadas e posteriormente contadas, diferenciando-as em viáveis (morfologia nuclear uniforme, com núcleo e citoplasma verde brilhante), em apoptose (núcleo condensado ou fragmentado, com coloração verde fluorescente) e em necrose (estrutura celular desorganizada, com núcleo e citoplasma laranja/vermelho).

4.6 Avaliação do potencial antitumoral *in vivo*

4.6.1 Animais

Um total de 40 camundongos C57BL/6 (machos e fêmeas, 25 a 30 g) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animal de Laboratório vinculado a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo luz-escuro de 12:12 horas (luzes acesas às 6:00 da manhã). Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos para experimentação animal da SBCAL (Associação Brasileira de Zootecnia Animal), Brasil. O projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Amazonas, *ad hoc* sob o N. 005/2021.

4.6.2 Protocolo experimental

O efeito antitumoral *in vivo* foi avaliado em camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16-F10 como previamente descrito por Costa et al. (2015). Células tumorais (2×10^6 células por 500 μ L) foram implantadas subcutaneamente na região axilar direita dos camundongos. Os tratamentos com PD01 e os controles foram iniciados um dia após a inoculação das células. Os animais foram tratados intraperitonealmente (200 μ L por animal) uma vez por dia durante 13 dias consecutivos. Os animais foram divididos em quatro grupos diferentes: Grupo 1 - animais que receberam injeções do veículo (2% de DMSO + 2% de kolifor em soro fisiológico, controle negativo, n = 10); Grupo 2 - animais que receberam injeções de doxorubicina (0,5 mg/Kg/dia, controle positivo, n = 10); Grupo 3 - animais que receberam injeções de solução do xanteno (3 mg/Kg/dia, n = 10); Grupo 4 - animais que receberam injeções de solução de xanteno (30 mg/Kg/dia, n = 10). Os animais foram sacrificados por

deslocamento cervical, e os tumores foram excisados e pesados. Os tecidos de pulmões, fígados e rins foram excisados e preservados em formol, juntamente com os tumores, para posterior análise histopatológica. Os efeitos do fármaco foram expressos como percentagem de inibição em relação ao controle.

4.6.3 Histopatologia

O processamento histológico consistiu em uma série de etapas descritas por Nunes e Cinsa (2016) com as adequações necessárias ao estudo. Os tecidos de fígado, rins, pulmão e tumores foram clivados para inclusão em parafina em cortes longitudinais e transversais utilizando pinça e bisturi. Para desidratação, clarificação e impregnação em parafina, os tecidos foram submetidos a soluções de álcoois, xilóis e parafina, com tempos de 30 minutos em cada solução quando órgãos e 1 hora quando tumores, seguindo a bateria: álcool 96%, álcool absoluto, álcool absoluto, xilol absoluto + álcool absoluto, xilol absoluto, e, por fim, na estufa a 60°, dois banhos de parafina para impregnação. Para emblocar as peças em parafina foram utilizados moldes de alumínio para inclusão dos tecidos em parafina na temperatura de 60° C, sendo mantido em placa fria até o endurecimento do bloco e armazenados em geladeira.

O micrótomo Leica RM2245 semiautomatizado e navalhas para micrótomo de alto perfil (Leica 818) foram utilizados inicialmente para fazer o desbaste dos blocos de parafina, fazendo cortes de 15 µm de espessura e posteriormente foram feitos os cortes histológicos das peças em seções de 5 µm de espessura. As fitas histológicas foram colocados em água a temperatura ambiente para captura dos cortes em lâminas, seguido de uma rápida inserção das laminas em banho-maria a 35 – 40 °C para que a fita histológica se distendesse. As lâminas foram mantidas em estufa a 60° por até 24 horas para retirada da parafina residual e melhor fixação dos cortes.

A técnica de coloração utilizada foi a de Hematoxilina e Eosina (HE), a qual iniciou com dois banhos em xilóis absolutos cada um com duração de 5 minutos para desparafinização das lâminas, seguido de uma breve espera para secagem das lâminas em temperatura ambiente. Após esse tempo, as lâminas foram reidratadas seguindo as soluções de álcool absoluto, álcool etílico 95%, álcool etílico 70% e mais dois banhos em água, com 10 mergulhos em cada solução. Na sequência, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 7 minutos tanto para os órgãos quanto para os tecidos tumorais, seguido de três banhos em água, sendo os dois primeiros apenas um mergulho e o último por 5 minutos. Após esse tempo, as lâminas

foram coradas com eosina por 1 minuto quando órgãos e por 50 segundos quando tumores, seguido de banho em álcool etílico 95% e mais dois banhos em álcool absoluto, cada um com 10 mergulhos. Ao final, as lâminas eram levadas a estufa para secagem por cerca de 2 a 5 minutos e depois, com algumas gotas de bálsamo do Canadá, as lamínulas eram fixadas às lâminas para, por fim, serem analisadas em microscópio óptico e os componentes histológicos fotografados.

4.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e/ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (CI 95%) obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos *in silico*

5.1.1 *Docking molecular*

As simulações de *docking* molecular foram realizadas no software o *AutoDock Vina* v.1.2.5 com devidos ajustes na configuração quanto aos parâmetros de exaustividade, coordenadas do sitio de ligação e dimensões da caixa de busca, conforme apresentado na Figura 7.

```
receptor = 5jrq_BRAF_prep_maestro.pdbqt
ligand = molecule_xanthene_6_311G.pdbqt
center_x = -11.461952
center_y = -4.338429
center_z = -29.450848
size_x = 40.000
size_y = 40.000
size_z = 40.000
out = docking1_5jrq_BRAF_xanthene_6_311G.pdbqt
exhaustiveness = 96
```

Figura 7. Arquivo de configuração utilizado nas simulações de *docking* molecular.

Na triagem virtual, a proteína BRAF foi o alvo biológico escolhido para o estudo *in silico* devido sua maior frequência de mutações na doença (Ascierto et al., 2012). A afinidade de interação do PD01 com o receptor BRAF com a mutação V600E (PDB ID: 5JRQ) foi de -11.1 kcal/mol, um valor superior à medicação de referência, Vemurafenib, usada no tratamento de melanoma metastático que apresentou uma afinidade de -9.204 kcal/mol.

O *docking* envolve a avaliação de várias possíveis formas como um composto pode se ligar a um alvo. A energia de ligação associada, ou seja, afinidade de ligação, quantifica a extensão em que o composto se liga ao alvo em comparação com a sua permanência no solvente circundante. A função de pontuação estima qual dessas formas é mais estável e favorável em termos de energia. Dessa forma, quanto menor for a energia de ligação estimada, maior é a probabilidade de o composto se ligar eficazmente ao alvo (Paggi et al., 2024). A Figura 8 mostra a interação do complexo BRAF e xanteno obtido a partir do *docking* molecular.

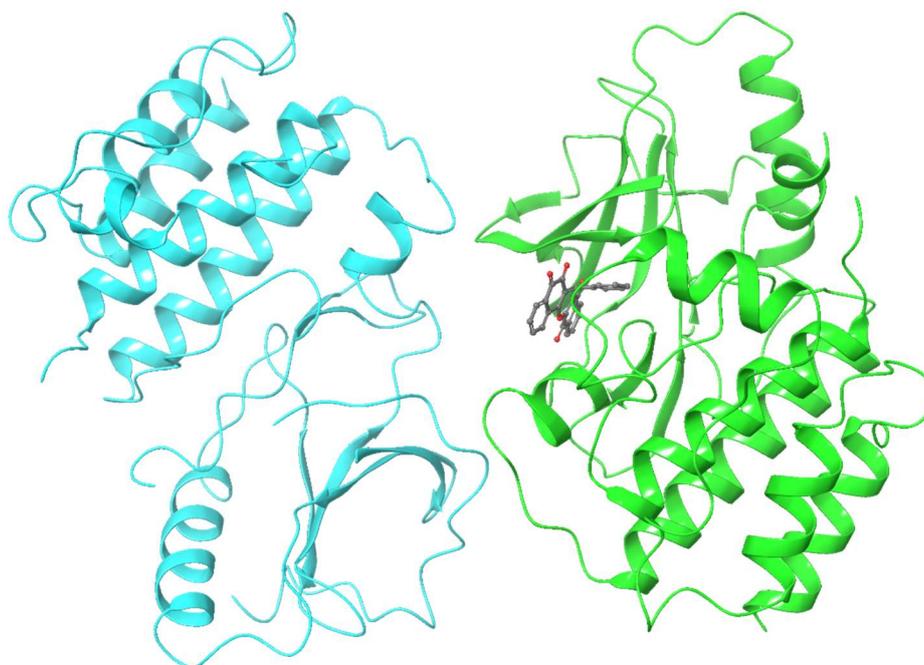


Figura 8. Interação do complexo BRAF e o xanteno obtido a partir do *docking molecular*.

Tabela 1. Resultados de *docking molecular* em kcal/mol obtidos com o algoritmo *AutoDock Vina* v.1.2.5 considerando o receptor totalmente rígido.

Ligante	BRAF (kcal/mol)
Medicamento de referência (Vemurafenib)	-9.204
7-Fenil-7,13-di-hidro-8H-dibenzo[b,h]xanteno-5,6,8,13-tetraona	-11.100

No *redocking*, optou-se pela segunda conformação obtida no *docking* com o Vemurafenib, visto que a primeira obtida, e portanto, a de menor energia livre teve um RMSD superior a 2Å, enquanto a outra conformação foi em torno de 1,6Å.

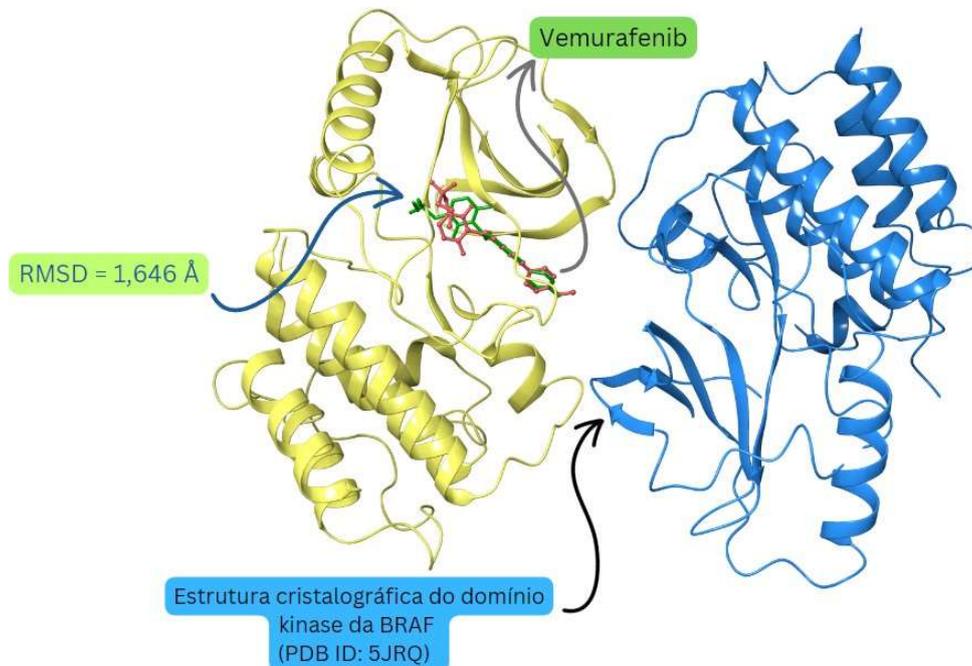


Figura 9. Alinhamento estrutural no *redocking* entre a conformação teórica obtida por *docking* molecular do Vemurafenib e a conformação experimental da cristalografia PDB ID: 5JRQ.

Ao analisar o diagrama de interações químicas, foram formadas duas importantes ligações de Hidrogênio com os aminoácidos Ser536 e Ser465, ambos Serina com o grupo hidroxila –OH, que teve um papel fundamental. Isso pode contribuir para maior estabilidade estrutural na interação fármaco-receptor. Além disso, uma interação do tipo pi-pi empilhamento foi formada pelos aminoácidos Tyr538 (Tirosina) e Trp531 (Triptofano) com a cadeia aromática da molécula. Assim, os resultados de *docking* indicam que o PD01 tem uma interação mais forte com o receptor BRAF mutado, o que pode conferir vantagens terapêuticas em relação ao Vemurafenib.

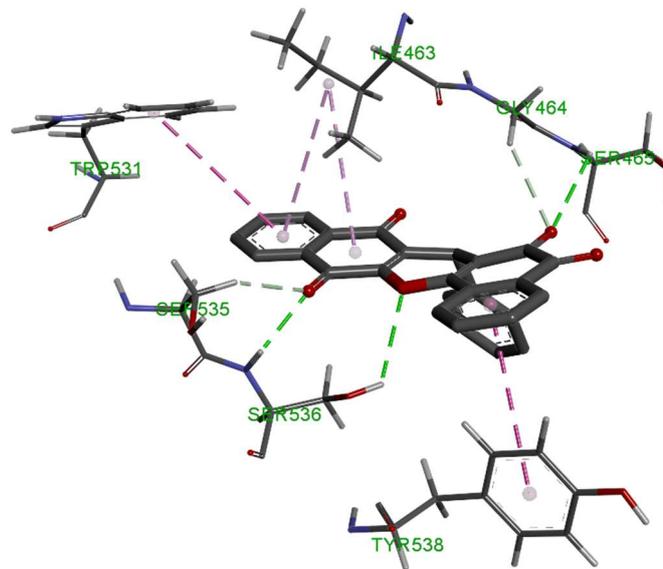


Figura 10. Visualização tridimensional dos aminoácidos que interagem com o xanteno no sítio de ligação da BRAF.

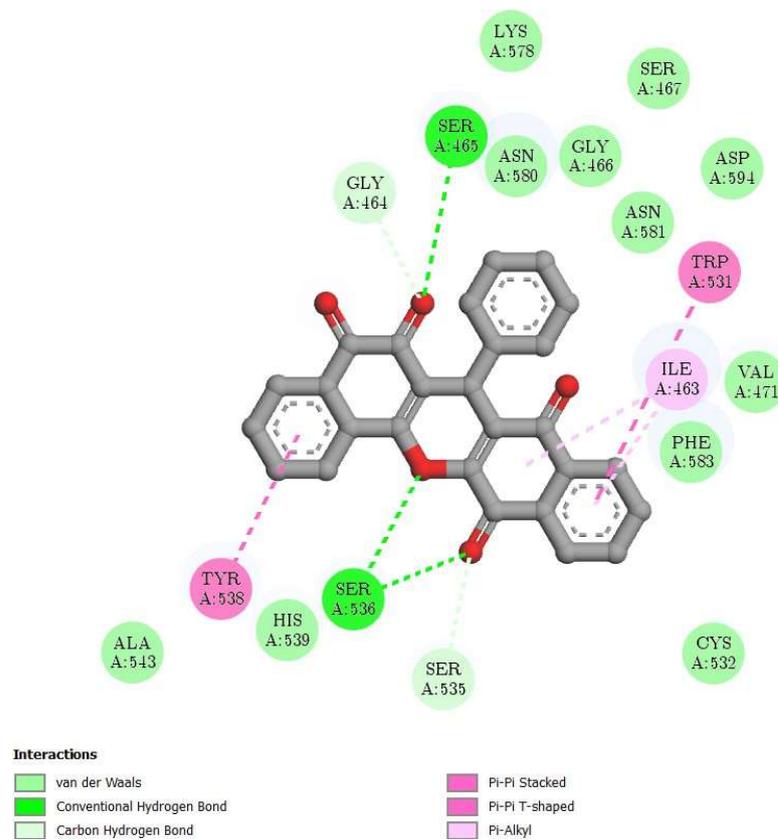


Figura 11. Diagrama das interações químicas formadas entre BRAF e o xanteno.

5.1.2 Parâmetros farmacocinéticos

A plataforma *SwissADME* estimou que o PD01 apresenta alta absorção gastrointestinal e solubilidade moderada a intervalo insolúvel em água, indicando propriedades físico-químicas de lipofilicidade, com um valor médio de Log P aproximado de 4,0. Esse aspecto é relevante a ser considerado, uma vez que os ensaios *in vitro*, e até *in vivo*, muitas vezes assumem uma solubilidade em água. Portanto, pode-se inferir que, para melhorar a utilização da substância nos experimentos, pode ser necessário realizar modificações na estrutura molecular ou adotar estratégias de encapsulamento que promovam uma maior biodisponibilidade e aproveitamento da substância.

A molécula apresentou peso molecular de 418,40 g/mol e Log K_p de -6,05 cm/s. Além disso, foi identificado como um inibidor dos citocromos CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 2C9 e CYP 3A4, o que pode influenciar sua farmacocinética e interações medicamentosas (Gougis et al., 2021). Esses dados reforçam a avaliação do PD01 e apontam um perfil farmacocinético relevante para sua utilização terapêutica.

5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹H de RMN ¹³C gerados foram processados utilizando o *software* Mestrenova, e, com base na estrutura molecular, os sinais dos dados experimentais foram preditos conforme ilustrado nas Figuras 12 e 13, respectivamente, para cada espectro.

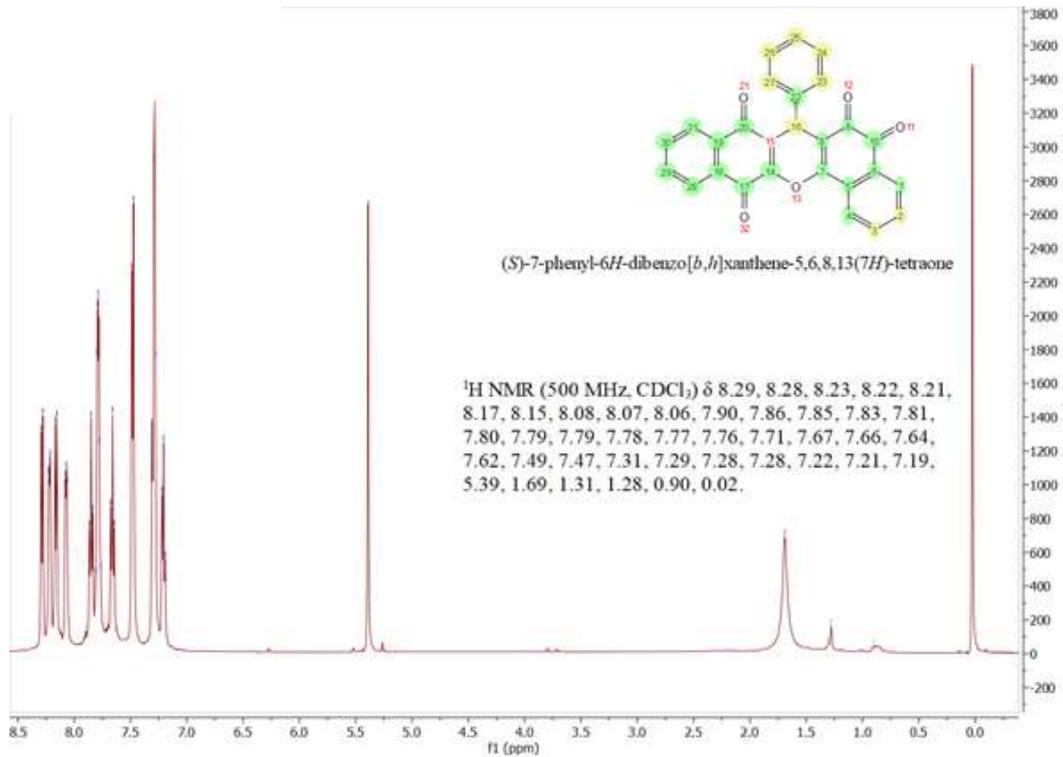


Figura 12. Espectro ^1H RMN para a molécula da classe dos xantenos dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) juntamente com seus respectivos assinalamentos processados no software Mestrenova.

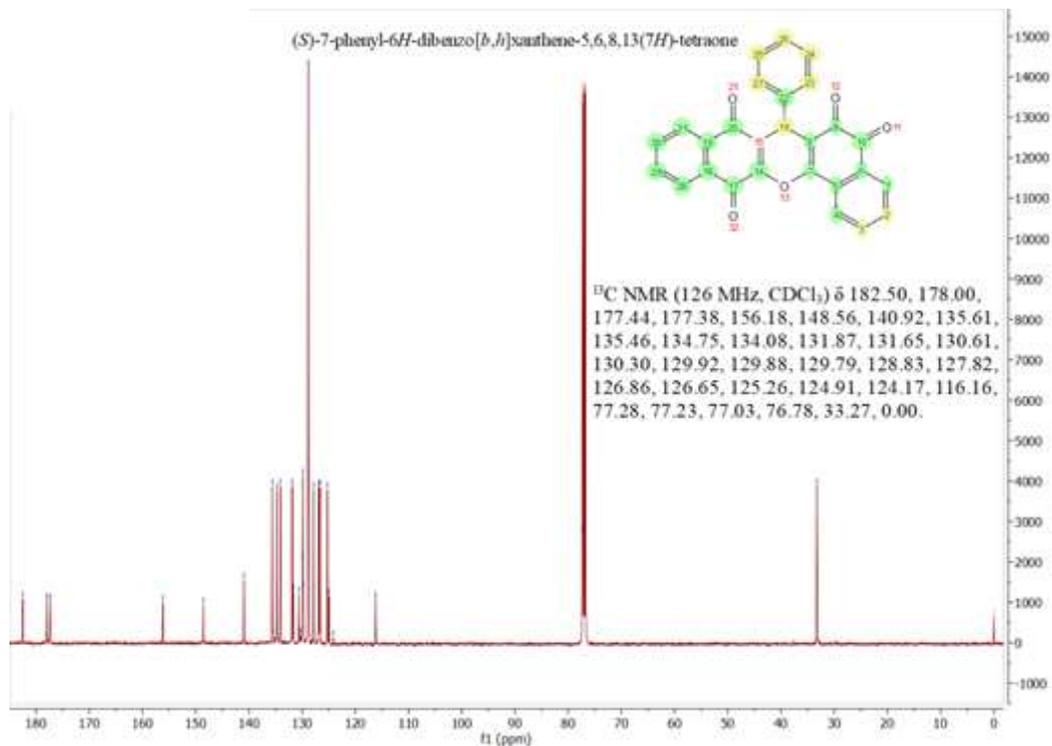


Figura 13. Espectro ^{13}C RMN para a molécula da classe dos xantenos dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) juntamente com seus respectivos assinalamentos processados no software Mestrenova.

A análise espectrométrica de ^1H RMN e ^{13}C RMN foi realizada para validar a estrutura do PD01. Os sinais observados nos espectros de foram comparados com o artigo de síntese do PD01 e mostraram concordância entre os sinais obtidos experimentalmente, com a identificação de poucos picos adicionais ou fora de posição, como mostram as Tabelas 2 e 3, respectivamente. Destacaram-se os sinais simétricos no espectro de ^{13}C RMN, incluindo os sinais 156,1 e 148,5, correspondentes aos carbonos ligados à oxigênio do anel pirano, enquanto o espectro de ^1H RMN exibe sinais assimétricos na região aromática, relacionado aos grupos p-quinona, o-quinona e o anel fenil (Carneiro et al., 2016).

Tabela 2. Sinais de ^1H RMN a 500,13 MHz para amostra do PD01 dissolvida em CDCl_3 .

Artigo ^a	Deslocamento químico	Experimental ^b
8,26	dd, J = 7,8 e 1,0 Hz, ^1H	8,28
8,19-8,21	m, ^1H	8,21
8,14	dd, J = 7,8 e 1,0 Hz, ^1H	8,15
8,06-8,04	m, ^1H	8,06
7,83	dt, J = 7,8 e 1,0 Hz, ^1H	7,83
7,79-7,74	m, ^2H	7,79
7,64	dt, J = 7,8 e 1,0 Hz, ^1H	7,64
7,45-7,46	m, ^2H	7,47
7,25-7,28	m, ^2H	7,28
7,17-7,20	m, ^1H	7,19
5,37	s, ^1H	5,39

^a sinais obtidos no artigo de síntese da molécula.

^b sinais obtidos no espectrômetro Bruker Advance III HD, processado no *software* Mestrenova.

Tabela 3. Sinais de ^{13}C RMN a 125,76 MHz para amostra do PD01 dissolvida em CDCl_3 .

Artigo ^a	Experimental ^b
182.4	182.5
177.9	178.0
177.4	177.4
177.3	177.3
156.1	156.1
148.5	148.5
140.9	140.9
135.6	135,6
134.7	134,7
134.0	134.0
131.8	131.8
131.6	131.6
130.6	130.6
129.9	129.9
129.8	129.8
129.7	129.7
128.8	128.8
127.8	127.8
126.8	126.8
126.6	126.6
125,2	125.2
124,9	124.9
116,1	116.1
33,2	33,2

^a sinais obtidos no artigo de síntese da molécula.

^b sinais obtidos no espectrômetro Bruker Advance III HD, processado no *software* Mestrenova.

5.1.4 Espectrometria de absorção na região infravermelho (IV)

O espectro na região IV do PD01 exibe picos característicos, predominantemente associados às bandas típicas dos anéis aromáticos presentes na molécula, conforme a apresentado na Figura 14. Essas bandas incluem as vibrações de deformação angular 5H adjacentes que absorvem intensamente no comprimento de onda de 719 cm^{-1} , além da deformação angular aguda em $1190,8\text{ cm}^{-1}$ e a absorção do C=C de alceno no comprimento de onda de $1660,5\text{ cm}^{-1}$, também com alta intensidade. Além disso, as bandas de deformação angular fora do plano CH=CH₂ absorvem no comprimento de onda de $946,7\text{ cm}^{-1}$, e o C=C aromático é observado em $1608,3\text{ cm}^{-1}$, ambos com intensidade média.

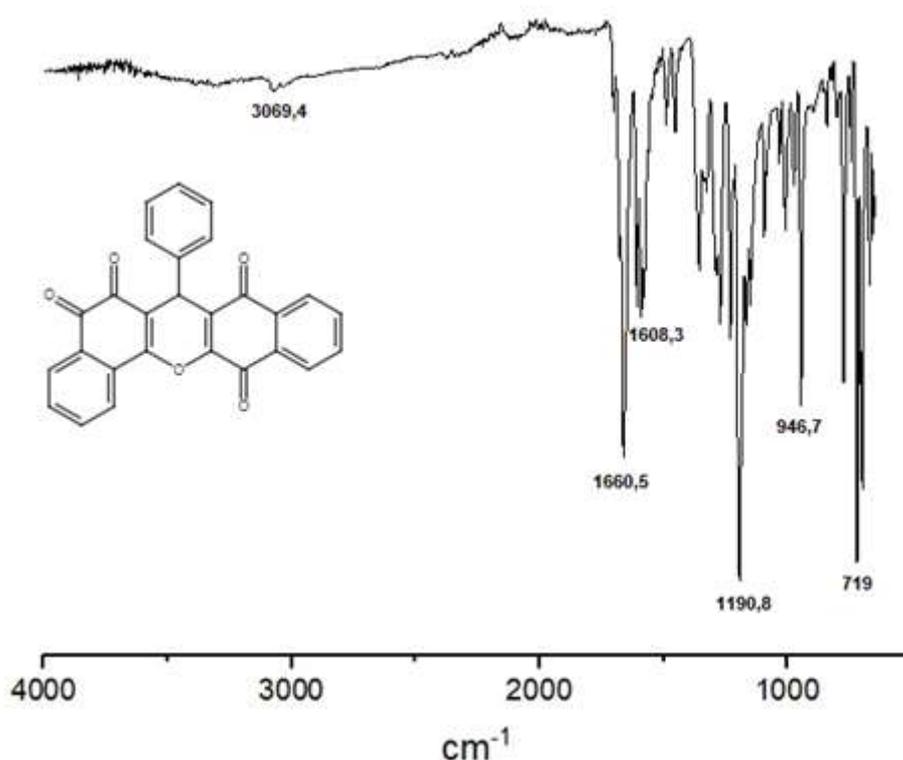


Figura 14. Espectro na região do infravermelho da molécula PD01 utilizando equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$, na resolução de 4 cm^{-1} .

Os espectros de infravermelho gerados para o PD01 foram comparados com os espectros apresentados no artigo de descrição e identificação do xanteno PD01 (Carneiro et al., 2016), demonstrando conformidade nas bandas (Tabela 4). Esses resultados, junto à análise de RMN, confirmam a identidade estrutural do PD01, validando a molécula por diferentes técnicas espectroscópicas.

Tabela 4. Espectros infravermelho gerados para a molécula PD01.

Artigo ^a	Bandas ^b	Intensidade	Grupo funcional
1659 cm ⁻¹	1660,5	Forte	C=C alceno
1590 cm ⁻¹	1608,3	Médio	C=C aromático
1489 cm ⁻¹	1490,9	Fraco	C=C aromático
1456 cm ⁻¹	1449,9	Fraco	C=C aromático
1361 cm ⁻¹	1358,6	Médio	C-H
1191 cm ⁻¹	1190,8	Forte	
944 cm ⁻¹	946,7	Média	RCH=CH ₂ Deformação angular fora do plano
774 cm ⁻¹	773	Média	Anel aromático – Deformação angular 3H adjacentes
720 cm ⁻¹	719	Forte	Anel aromático – Deformação angular 5H adjacentes
699 cm ⁻¹	698	Fraco	Anel aromático – Deformação angular 5H adjacentes

^a bandas obtidas no artigo de síntese da molécula.

^b bandas obtidas na média de 10 varreduras de 4000 a 650 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ no espectrômetro PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de ATR.

5.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)

Para complementar a caracterização do PD01, as análises térmicas por DSC e TGA também forneceram informações relevantes sobre as propriedades do PD01. A Figura 15 contém sinais de TGA. O primeiro sinal indicou uma perda de massa de -7,75% na faixa de 26 a 105 °C, correspondente ao processo de desidratação. Em seguida, observou-se uma perda adicional de -4,46% na faixa de 105 a 186,8 °C. O último sinal apresentou uma perda de massa de -13,06% na faixa de 248,7 a 364,9 °C, resultando em uma perda total de -57,72% ao longo do intervalo de 26 a 600 °C, o que indica que ainda havia uma quantidade significativa de material orgânico a ser convertida em cinzas, ou seja, não ocorreu uma degradação completa do PD01.

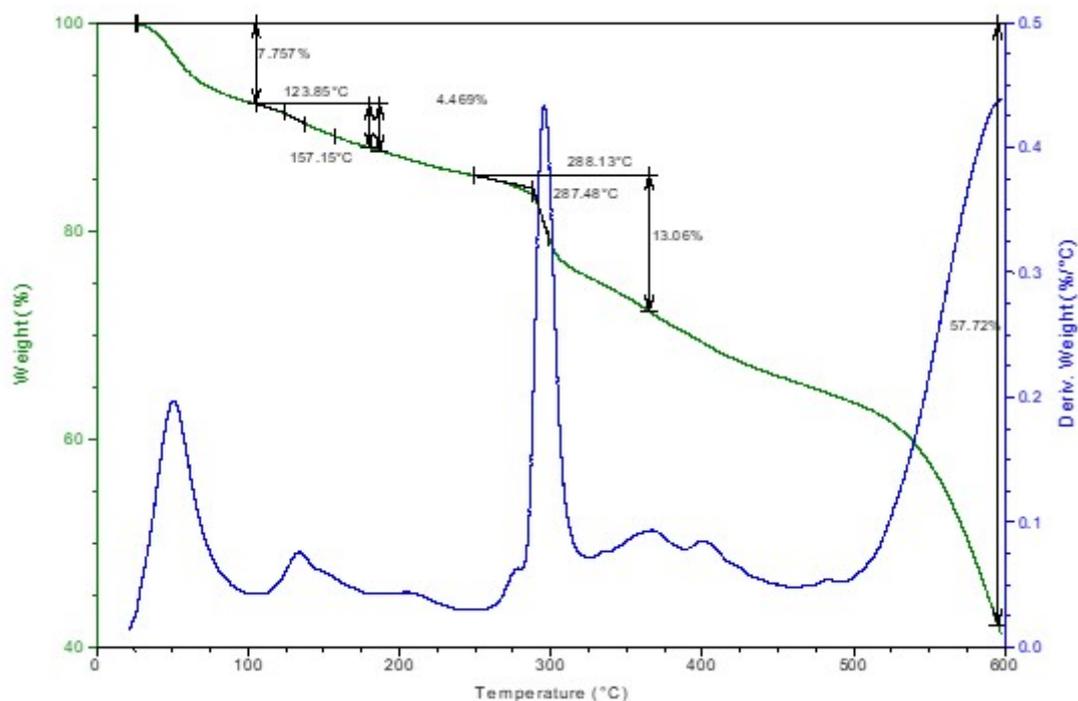


Figura 15. Sinais TGA analisados a 10 °C/min, desde a temperatura ambiente até 600 °C, para uma amostra de 5,3250 mg de PD01. A derivada da perda de massa é representada pela linha azul.

Tabela 5. Sinais TGA correspondentes a perda de massa em função da temperatura.

Intervalo (°C)	Massa (%)	T onset (°C)	T pico (°C)
26 – 105	-7,75	-	-
105 – 186,8	-4,46	123,85	157,15
248,7 – 364,9	-13,06	288,13	287,48

Faixa de temperatura em que houve perda de massa (%). *T onset* corresponde a integração ou interseção em que a temperatura começa a degradar. *T pico* corresponde a temperatura máxima em que a reação acontece mais rápido.

Os eventos TGA estão em concordância com os resultados obtidos no DSC, Figura 16. O primeiro evento no DSC é endotérmico, correspondente à desidratação; o segundo evento, também endotérmico, apresentou um T_{pico} de 60,2 °C, com uma energia envolvida de 58,16 J/g; e o terceiro evento, exotérmico, coincidiu exatamente com a etapa de degradação, apresentando um T_{pico} de 299,47 °C e uma energia envolvida de 191,6 J/g.

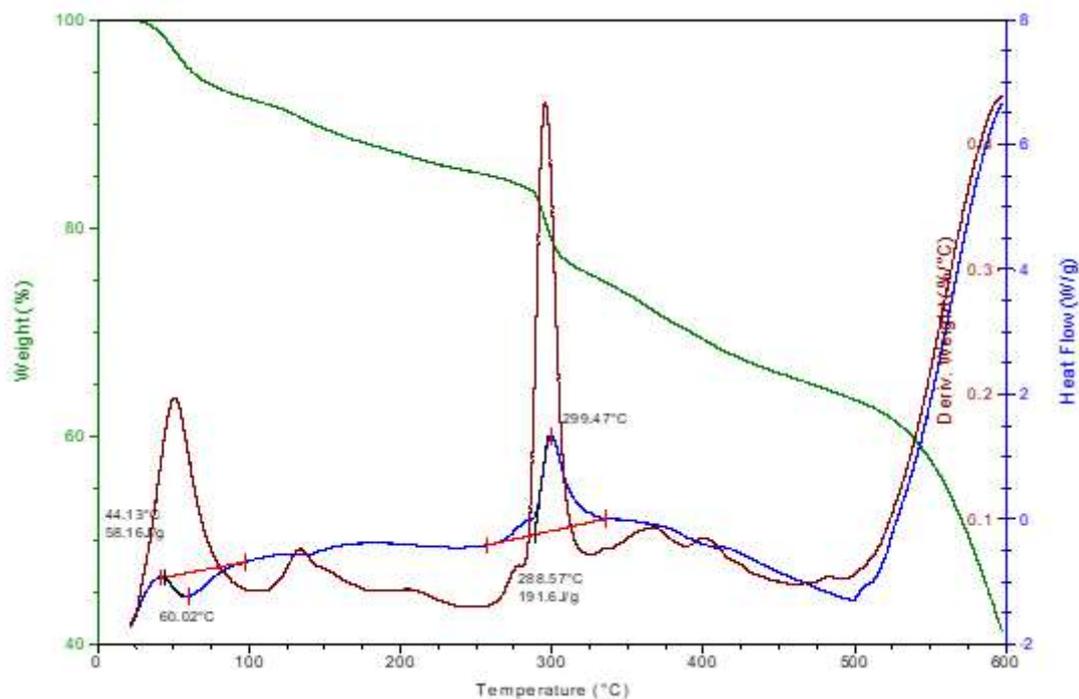


Figura 16. Sinais DSC analisados a 10 °C/min, desde a temperatura ambiente até 600 °C, para uma amostra de 5,3250 mg de PD01. A derivada é representada pela linha vermelha.

Tabela 6. Sinais obtidos durante a análise DSC e o perfil do fluxo de calor injetado na amostra.

Intervalo (°C)	T pico (°C)	Energia (J/g)	Processo
42,2 – 94,4	60,02	58, 16	Endotérmico
257,7 – 335,4	299,47	191,6	Exotérmico

T pico corresponde a temperatura máxima em que a reação acontece mais rápido em determinado intervalo de temperatura e a energia envolvida (J/g) no processo.

As propriedades térmicas demonstradas na análise corroboram com o estudo de Pan e colaboradores (2023), que mostraram que um derivado de xanteno, denominado polixanteno (PX) apresentou alta estabilidade térmica com perda de peso de 95%, que foi relatada como a temperatura de decomposição ($T_{d,95}$), em 361 °C no TGA e a temperatura de transição vítrea (T_g) de 280 °C no DSC, correspondente as características térmicas observadas para o PD01, que apresentou o maior percentual de perda em massa no intervalo de 240 a 365 °C com T_{pico} de 299 °C. Esse comportamento térmico é uma informação adicional da estabilidade e da estrutura do PD01, validando suas propriedades tanto em termos espectroscópicos quanto térmicos. Assim, as análises térmicas e espectroscópicas juntas fornecem informações sobre as propriedades físico-químicas e corroboram a identidade estrutural da molécula PD01.

5.2 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método *Alamar Blue*

A avaliação das propriedades biológicas de PD01 também é crucial para entender seu potencial terapêutico. Nesse contexto, a citotoxicidade do PD01 foi analisada pelo ensaio do *Alamar Blue*, a qual utilizou concentrações crescentes de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM em linhagens de células tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28) e melanoma murino (B16-F10) e uma linhagem de células não tumorais de fibroblasto humano (MRC-5) pelo período de 72 horas. Os valores estão representados como IC_{50} (intervalo de confiança de 95%) ilustrados na Tabela 7, onde PD01 apresentou efeito citotóxico com valores de CI_{50} entre $18,85 \pm 3,28 \mu\text{M}$ (15,57 - 22,13) na SK-MEL-28 e $5,07 \pm 1,28 \mu\text{M}$ (3,79 - 6,35) para B16-F10. Na linhagem MRC-5 também pode ser observada atividade citotóxica de PD01, demonstrando toxicidade na concentração de $4,94 \pm 0,72 \mu\text{M}$ (4,22 - 4,94), sugerindo que PD01 exibe atividade citotóxica também em células não cancerígenas.

Tabela 7. Atividade citotóxica em linhagens tumorais de melanoma humano (SK-MEL-28) e melanoma murino (B16-F10) e não tumoral de fibroblasto humano (MRC-5) tratadas com concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM de PD01 após 72 horas.

IC_{50} (μM) (IC 95%)		
MRC-5	SK-MEL-28	B16-F10
$4,94 \pm 0,72 \mu\text{M}$ (4,22 - 4,94)	$18,85 \pm 3,28 \mu\text{M}$ (15,57 - 22,13)	$5,07 \pm 1,28 \mu\text{M}$ (3,79 - 6,35)

A determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi realizada, representando o índice de citotoxicidade necessário para induzir a morte celular em 50% das células, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

A citotoxicidade é avaliada pela concentração inibitória mínima (IC_{50}), sendo que valores menores indicam maior potência citotóxica e efeito anticancerígeno. A CI_{50} mais baixa na linhagem B16-F10 ($5,07 \pm 1,28 \mu\text{M}$) sugere que PD01 pode ser mais eficaz contra essas células em comparação com as células SK-MEL-28 (CI_{50} de $18,85 \pm 3,28 \mu\text{M}$), indicando que o composto pode ter uma ação citotóxica mais específica para linhagem murina em relação a linhagem de melanoma humano, com uma menor concentração necessária para induzir morte celular. Por outro lado, o fato do PD01 também apresentar atividade citotóxica em células não cancerígenas (MRC-5), com uma CI_{50} de $4,94 \pm 0,72 \mu\text{M}$, sugere que o composto não é seletivo o suficiente para ser utilizado como um agente antitumoral seguro (Femina et al., 2023).

Os derivados do xanteno são reconhecidos por sua atividade inibitória em linhagens celulares neoplásicas, evidenciando propriedades anticancerígenas promissoras em comparação ao próprio xanteno. Esses efeitos podem ser atribuídos à natureza e à posição dos grupos substituintes presentes na estrutura molecular. Um estudo realizado por Giri et al. (2010), avaliou a citotoxicidade de xantenos substituídos em linhagens tumorais de próstata, mama e cervical, e destacou que a adição de substituintes aumentava a atividade dos compostos, especialmente o derivado 9g, que demonstrou inibição do crescimento celular nas três linhagens, com IC_{50} entre 36 e 50 μM podendo ser potencializado com a incorporação de um substituinte 7-fluoro neste derivado.

Outras investigações demonstram a citotoxicidade de derivados de xanteno em linhagens tumorais. Um estudo conduzido por Song et al. (2017) avaliou a citotoxicidade de uma série de derivados de xanteno sintetizados em linhagens de carcinoma hepatocelular humano e células de leucemia promielocítica aguda. Os derivados 6c – 6e mostraram-se agentes citotóxicos potentes em comparação com outras linhagens cancerígenas, especialmente em relação às células de leucemia promielocítica aguda, apresentando valores de IC_{50} de 0,52 μM e 0,76 μM , respectivamente, significativamente inferiores ao valor de 5,31 μM do trióxido de arsênio, utilizado como controle positivo.

Neste estudo, a maioria dos derivados xantenos apresentaram forte atividade inibitória nas linhagens testadas, que foram atribuídas a múltiplos fatores, incluindo as cadeias laterais nas posições C-3 e C-11, as quais exercem forte efeito na atividade antitumoral; a natureza do substituinte no grupo 14-fenil, que mostrou melhor atividade inibitória do que as outras posições e as características específicas das linhagens celulares testadas, que apresentaram maior seletividade de inibição para determinadas células tumorais enquanto outras não (Song et al., 2017).

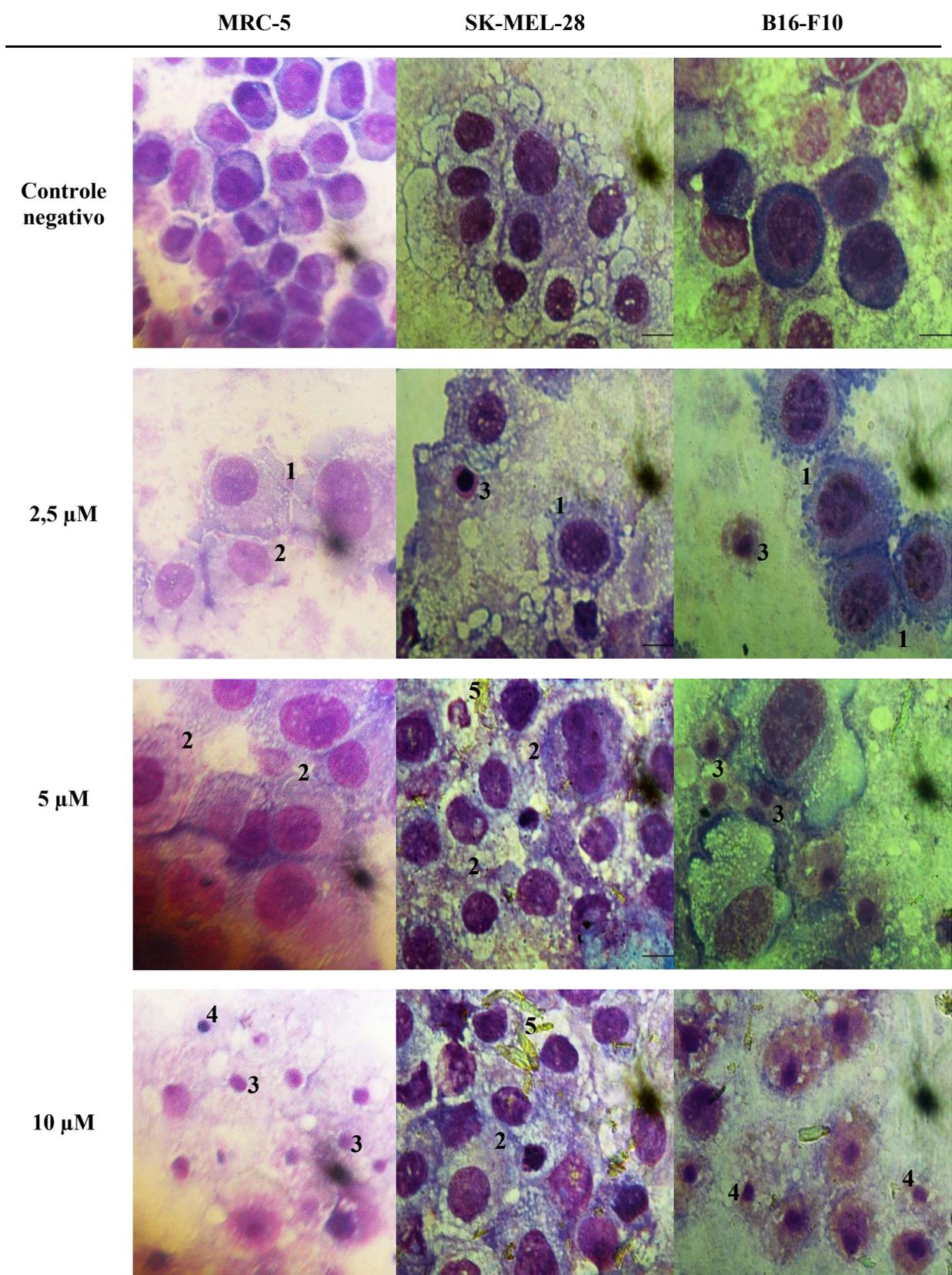
Embora o PD01 tenha demonstrado citotoxicidade nas linhagens celulares no ensaio do *Alamar Blue*, é importante destacar que esse resultado não reflete exclusivamente o seu mecanismo de ação. Além da citotoxicidade, a molécula pode interferir em processos celulares como a proliferação e o ciclo celular, que também podem contribuir para seus efeitos biológicos. Do mesmo modo, a falta de seletividade de PD01 entre células cancerígenas e normais é um ponto crucial a ser abordado no desenvolvimento de um medicamento antitumoral. Portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar completamente os mecanismos subjacentes à sua atividade.

5.2.2 Análise morfológica

Para verificar as alterações morfológicas desencadeadas pelo PD01, as linhagens celulares B16-F10, SK-MEL-28 e MRC-5 foram tratadas com o xanteno nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM durante 48 horas, coradas com kit Panótico Rápido Laborclin (código 620529). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para diluir a substância testada. A Tabela 8 apresenta os resultados observados na análise das células por microscópio Nikon Ti Eclipse com ampliação de 20x.

As células apresentaram irregularidades citoplasmáticas e nucleares, com retração de volume à medida que a concentração de PD01 aumentava, intensa condensação e marginalização da cromatina (picnose), além de perda da integridade da membrana plasmática. Também foi identificada a presença de corpos apoptóticos, especialmente nos tratamentos com 10 μM nas células MRC-5 e B16-F10. No entanto, é importante ressaltar que a solubilidade da substância deve ser levada em consideração, o que já era previsto nos ensaios *in silico*, pois foi possível observar a presença de cristais de PD01 no tratamento das células SK-MEL, o que pode influenciar os resultados observados. Todas as alterações morfológicas observadas foram sugestivas de um processo apoptótico (Khalil et al., 2023) e indicam que o mecanismo de ação desse composto pode envolver o comprometimento estrutural das células tumorais.

Tabela 8. Efeito do PD01 na morfologia celular de melanoma humano (SK-MEL-28), melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto humano (MRC-5) tratadas com concentrações de 2,5; 5 e 10 μM de PD01 após 48 horas.



O controle negativo recebeu o veículo (DMSO) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – perda da integridade de membrana; 2 – degeneração citoplasmática; 3 – núcleos picnóticos; 4 – corpos apoptóticos; 5 – cristais de PD01. Coloração: panótico. Aumento: 20x.

5.2.3 Avaliação da morte celular pelo método de *Acridina Orange* e *Brometo de Etídio* (AO/BE)

As células B16-F10 foram tratadas com diferentes concentrações de PD01 por 24 horas para distinguir através da coloração diferencial por AO/BE células viáveis, em apoptose ou necrose, induzido pelo derivado xanteno. As alterações morfológicas observadas no ensaio com kit Panótico Rápido Laborclin (código 620529), coincidem com os padrões de apoptose e necrose detectados neste ensaio. Estes dois padrões de morte celular foram demonstrados após o tratamento com PD01 nas concentrações de 2,5 μM , 5 μM e 10 μM , conforme ilustrado na Figura 17.

No controle negativo, foram observadas exclusivamente células viáveis, caracterizadas por núcleos e citoplasmas visíveis, íntegros e bem definidos. A partir da menor concentração (2,5 μM), notou-se a presença de células com dupla marcação, indicando a ocorrência de apoptose, evidenciada pela fluorescência verde, e de necrose, marcada em laranja quase vermelho. Na concentração mais elevada (10 μM), o padrão de necrose tornou-se claramente aparente, com células picnóticas apresentando coloração vermelha, sem visualização do citoplasma, refletindo as alterações morfológicas observadas, como a condensação nuclear e a perda de estrutura celular.

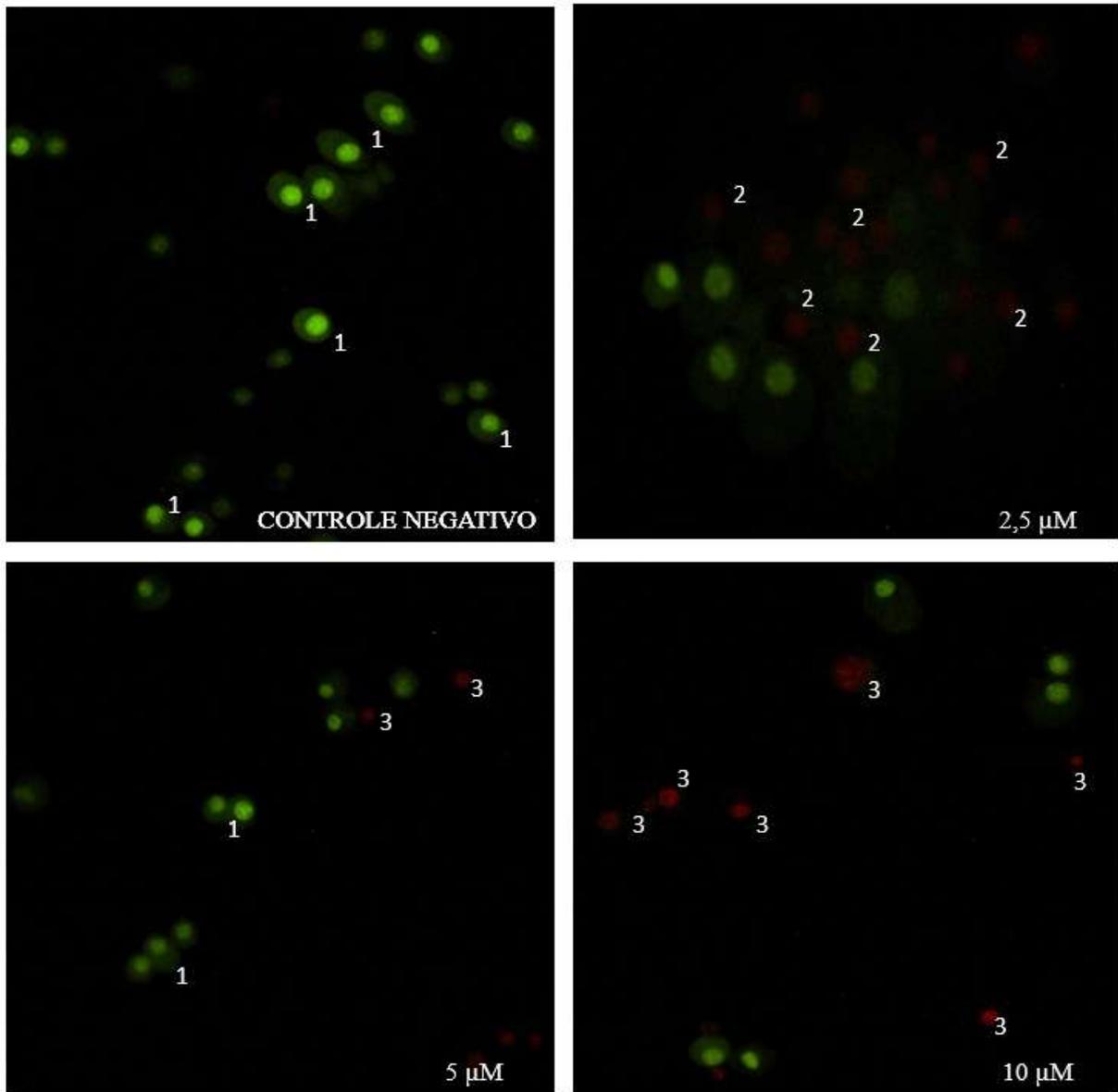


Figura 17. Efeitos na indução de apoptose e necrose em melanoma murino (B16-F10) após tratamento com 2,5; 5 e 10 μM de PD01 por 24 horas. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – células integras com citoplasma e núcleos visíveis; 2 – células apoptóticas; 3 – células necróticas; Coloração: AO/BE. Aumento: 20x.

A análise quantitativa do padrão de morte celular também corrobora esses achados. Os resultados obtidos neste estudo, conforme demonstrado no Gráfico 1, revelam que a análise da previsão celular após o tratamento com o xanteno PD01 em relação à apoptose inicial apresentou uma diferença estatisticamente significativa na concentração de 10 μM , com um percentual de 61,18% em comparação ao controle negativo. Em contrapartida, na avaliação da apoptose tardia, foram encontradas diferenças significativas em todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo. Além disso, o padrão de necrose foi identificado, apresentando diferenças significativas nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM , com valores de 29,22% e 38,2%, respectivamente.

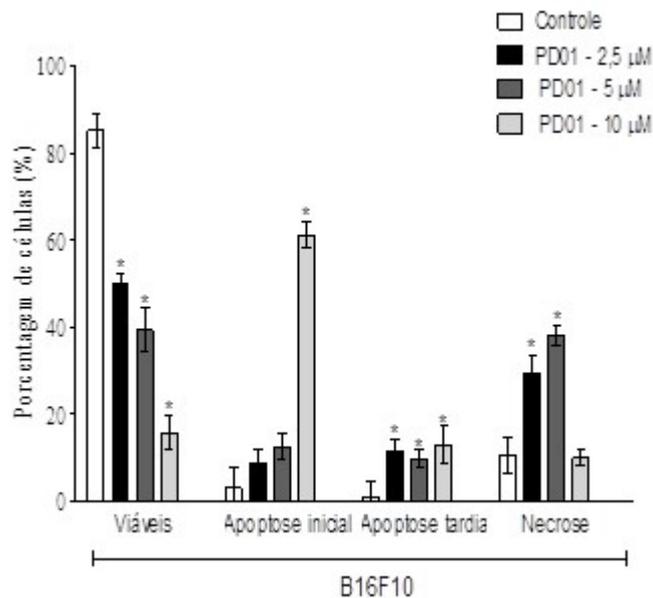


Gráfico 1. Padrão de morte celular induzido pelo xanteno PD01 em células B16-F10. Cada barra corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Esses dados sugerem que o PD01 induz tanto a apoptose quanto a necrose, com o aumento da concentração exacerbando a resposta celular, conforme evidenciado pelos dois métodos de análise, corroborando com o estudo de Hahnvajjanawong e colaboradores (2010), que demonstrou a indução de apoptose por xantonas em células de colangiocarcinoma no ensaio de AO/BE, resultando em encolhimento celular, formação de bolhas na membrana, além de evidenciar alterações morfológicas como condensação da cromatina e fragmentação nuclear, que são características típicas de células apoptóticas. Neste estudo, também foi observado que o número de células em apoptose aumentava conforme o tempo de exposição.

5.3 Avaliação do potencial antitumoral *in vivo*

Os testes *in vitro* realizados com o xanteno PD01 demonstraram que o composto poderia ter potencial antitumoral em condições mais complexas, como as observadas no modelo murino *in vivo*. Nesse contexto, as células B16-F10 e a linhagem murina C57Bl/6 foram escolhidas por serem singênicas e, portanto, representarem o modelo murino melhor estabelecido para o melanoma (Fidler, 1975; Liu et al., 2017), proporcionando uma plataforma adequada para avaliar a eficácia do composto em um ambiente biológico mais próximo da realidade clínica.

A inoculação das células B16-F10 em camundongos C57Bl/6 resultou em crescimento tumoral característico do melanoma, havendo perda de apenas dois animais. Contudo, todos os animais inoculados com as células apresentaram desenvolvimento tumoral caracterizado por nódulos macroscopicamente multinodulares, encapsulados, com aspecto gelatinoso e um padrão de crescimento uniforme, conforme ilustrado na Figura 18.

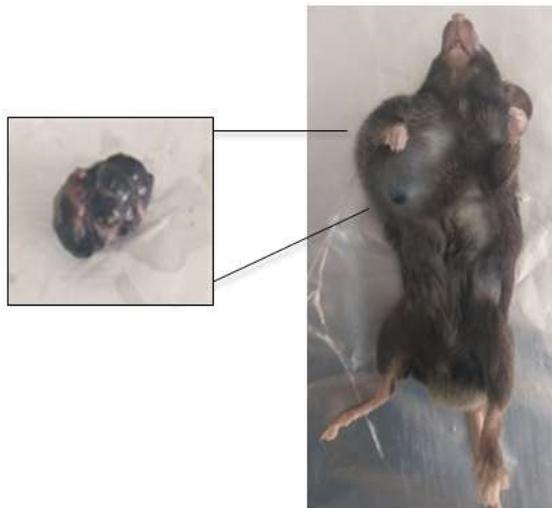


Figura 18. Fotografia macroscópica de tumor controle negativo de camundongo C57Bl/6.

A Tabela 9 apresenta o peso dos tumores e o percentual de inibição observado após o tratamento com xanteno PD01. Pode-se observar que o crescimento tumoral *in vivo* apresentou inibição de 5,96% e 10,16% nas doses de 3 e 30 mg/Kg/dia, respectivamente. O controle positivo da doxorrubicina na dose de 0,5 mg/kg/dia inibiu o crescimento tumoral em 29,49%.

Tabela 9. Efeito do xanteno PD01 sobre o peso final da massa tumoral oriundas de camundongos inoculados com células B16-F10 e tratados por 13 dias consecutivos.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Controle	-	10	4,86±1,37	-
Doxorrubicina	0,5	9	3,42±0,80*	29,49%
PD01	3	9	4,57±1,64	5,96%
PD01	30	9	4,36±1,38	10,16%

Os valores do tamanho tumoral correspondem a média \pm erro. O grupo controle (não tratado) recebeu o veículo (20 μ L Kolifor + 20 μ L DMSO + 1.960 μ L salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 1way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento versus controle negativo (DMSO).

A doxorrubicina, usada como controle positivo, demonstrou uma inibição significativamente maior do crescimento tumoral (29,49%) em comparação ao PD01, embora em uma dose inferior (0,5 mg/kg/dia). Esse contraste entre a eficácia do PD01 e da doxorrubicina é esperado, pois a doxorrubicina é uma quimioterapia amplamente utilizada e bem estabelecida, enquanto o PD01 ainda está em parâmetros iniciais de avaliação. A diferença de eficácia também pode estar relacionada ao perfil farmacocinético e à distribuição do PD01 no organismo, além de outros fatores, como a solubilidade.

A análise realizada na plataforma *SwissADME*, indicou que o PD01 possui uma solubilidade em água moderada e um perfil lipofílico, com Log P de aproximadamente 4,0, o que poderia indicar dificuldade de absorção em sistemas biológicos aquoso. Essas configurações físico-químicas podem ter influenciado na biodisponibilidade do composto *in vivo*, pois foi observado uma retenção do PD01 em alguns tecidos, conforme demonstrado na Figura 19, particularmente próximo ao local de administração da droga, o que levou à diminuição da sua absorção sistêmica e, conseqüentemente, à redução da sua eficácia antitumoral.



Figura 19. Retenção do PD01 nos tecidos.

Os dados referentes à massa corporal e à massa úmida dos órgãos apontam a segurança do uso do composto PD01, pois não houve diferença significativa entre os resultados do grupo controle não tratado e dos grupos tratados (Tabela 10), com exceção ao fígado onde foi observado um leve aumento deste órgão no grupo tratado com PD01 a 3 mg/Kg. Foi realizada uma correlação entre os dados e a análise histopatológica para investigar possíveis efeitos hepatotóxicos. No entanto, a hipótese de hepatotoxicidade foi considerada pouco provável, uma vez que o grupo tratado com a concentração mais alta (30 mg/kg) não apresentou alterações significativas.

Tabela 10. Efeito de PD01 nas doses de 3 e 30 mg/kg sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos C57Bl6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Fígado	Rins	Pulmão	Peso corporal inicial	Peso corporal final
			(g/100g de massa corpórea)	(g/100g de massa corpórea)	(g/100g de massa corpórea)	(g)	(g)
Não tratado	-	10	3,87±0,27	0,43±0,02	0,54±0,04	22,20±1,46	26,90±1,82
Doxorrubicina	0,5	9	4,64±0,31	0,50±0,03	0,58±0,05	22,89±1,07	24,78±1,29
PD01	3	9	5,07±0,38*	0,49±0,02	0,58±0,05	22,89±0,63	24,00±1,28
PD01	30	9	4,32±0,22	0,53±0,02	0,59±0,04	19,67±0,52	22,76±0,70

Resultados expressos em média ± erro. Doxorrubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. Não houve diferenças significativas entre animais do grupo controle (não tratado) e animais tratados.

Um estudo realizado por Xu e colaboradores (2016) apresentou potência antitumoral *in vivo* de produtos naturais semelhantes a xantonas em modelos de xenoinxerto de hepatoblastoma quando comparada ao medicamento antitumoral 5-fluorouracil, utilizado como controle positivo. Nesse estudo, foi feito o melhoramento da solubilidade em água e permeabilidade do composto DDO-6101 gerando o denominado 8n, o qual exibiu efeito inibitório significativo e dependente da dose, com diminuição do volume do tumor de 27,97%, 38,50% e 48,36%, nas doses, 2 vezes ao dia, de 2,5, 5 e 10 mg/kg respectivamente, em comparação com o controle positivo que teve uma redução de 50,95%, enquanto que o DDO-6101 teve uma redução de 36,81%.

A atividade *in vivo* do 8n também foi avaliada após administração oral com a dosagem de 50 mg/kg e apresentou redução do crescimento tumoral de 30,12%, indicando uma boa biodisponibilidade. Portanto, pode-se concluir que as propriedades físico-químicas melhoradas do 8n em comparação com DDO-6101 foram determinantes para a inibição do crescimento tumoral *in vivo* (Xu et al., 2016), reforçando que o melhoramento da solubilidade é fator crucial para observação da atividade biológica.

5.3.1 Histopatologia

A análise histológica foi realizada em tecidos hepáticos, renais e pulmonares de grupos de animais que receberam anteriormente a administração de células B16-F10. Os grupos experimentais foram classificados da seguinte forma: o grupo controle negativo consistiu em animais que não receberam nenhum tratamento; o grupo controle positivo foi composto pelos animais que receberam o tratamento com 0,5 mg/Kg/dia de doxorrubicina; o grupo tratado com PD01 foi subdividido em dois subgrupos, um dos quais recebeu a dose de 3 mg/Kg/dia e o outro, a dose de 30 mg/Kg/dia de PD01.

Na análise histológica dos órgãos, observou-se uma considerável variação entre os animais, de modo que, em alguns indivíduos, foi identificado comprometimento de determinados órgãos, enquanto em outros, os mesmos órgãos se apresentaram preservados. A exceção foi o pulmão, no qual foram observadas alterações evidentes em todos os animais analisados.

A Figura 20 apresenta a histologia renal dos animais, da qual foi observado que para o grupo controle negativo, os rins apresentaram desorganização do parênquima renal, com glomérulos comprometidos, variação no espaço de Bowman, além de células em apoptose e degeneração tubular com diminuição da luz dos túbulos. No controle positivo, também foi observada comprometimento do parênquima renal e glomérulos, e, presença mais intensa de macrófagos. Nos grupos tratados com o PD01, observou-se um padrão semelhante de comprometimento tecidual, incluindo presença de vasos congestos, túbulos edemaciados e hiperplasticidade nos glomérulos e túbulos. Esses achados histológicos sugerem que, embora o PD01 tenha apresentado uma menor eficácia *in vivo* comparado à doxorrubicina, ele pode induzir efeitos adversos nos rins semelhantes aos de quimioterápicos como a doxorrubicina.

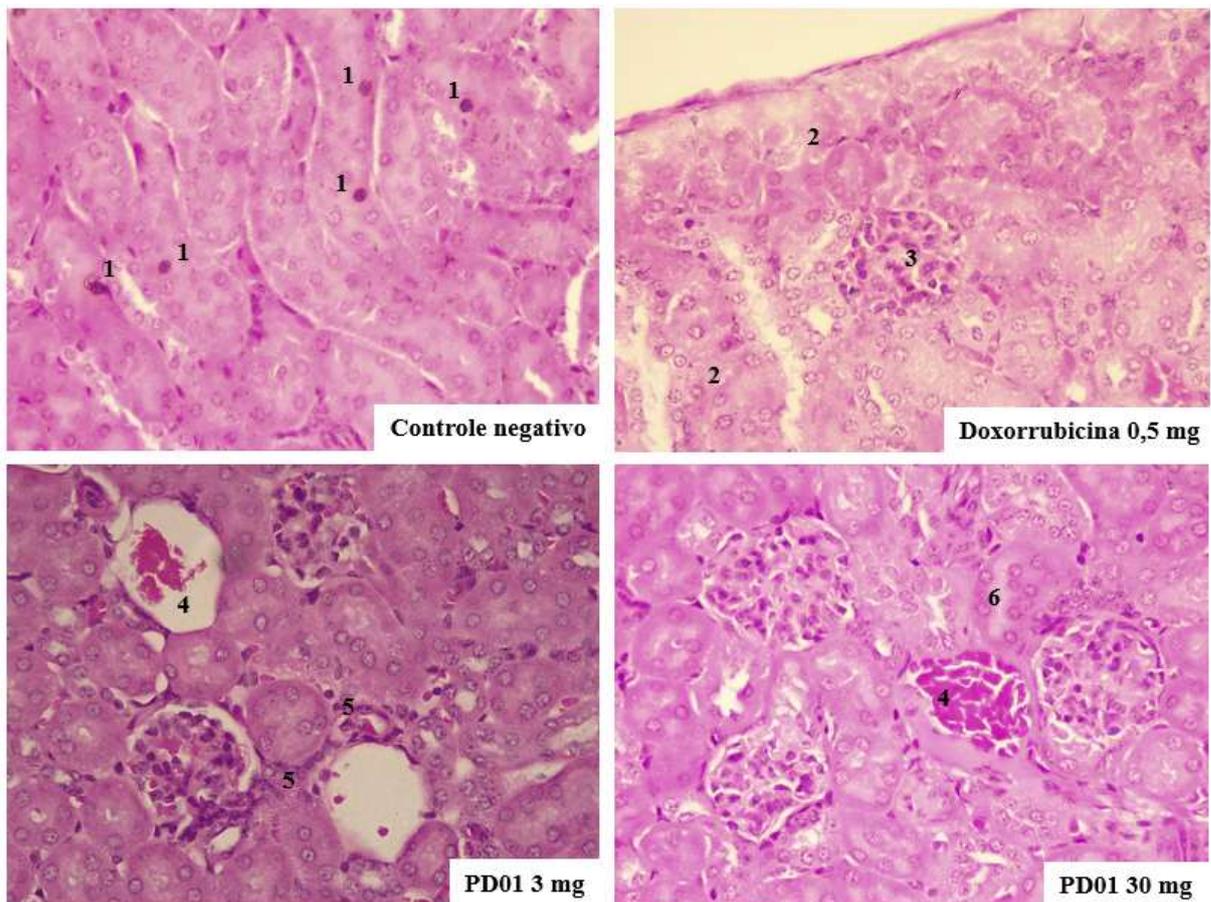


Figura 20. Cortes histológicos de rins de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorrubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 μ L Kolifor + 20 μ L DMSO + 1.960 μ L salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – células em apoptose; 2 – degeneração do parênquima renal; 3 – glomérulo sem cápsula de Bowman; 4 – vasos congestos; 5 – macrófagos; 6 – hiperplasticidade de túbulo. Coloração: HE. Aumento: 40x.

O fígado não apresentou variações significativas entre os grupos avaliados, que exibiram padrões semelhantes. Observou-se a presença de hepatócitos binucleados, células de Kupffer mais evidentes, acúmulo discreto de gordura, grânulos de glicogênio, áreas com coloração mais intensas em comparação com outras, presença de algumas células em apoptose e leve congestão de vasos, como ilustra a Figura 21. Apesar de ter sido observada um leve aumento no fígado de alguns animais tratados com uma dose de 3 mg/kg no ensaio antitumoral anterior, não foram observadas variações significativas entre os grupos tratados com PD01 e o controle negativo. Dessa forma, em termos de toxicidade geral, o PD01 não induziu efeitos hepáticos graves, o que é um aspecto positivo, pois sugere que o composto pode apresentar um perfil de toxicidade mais controlado.

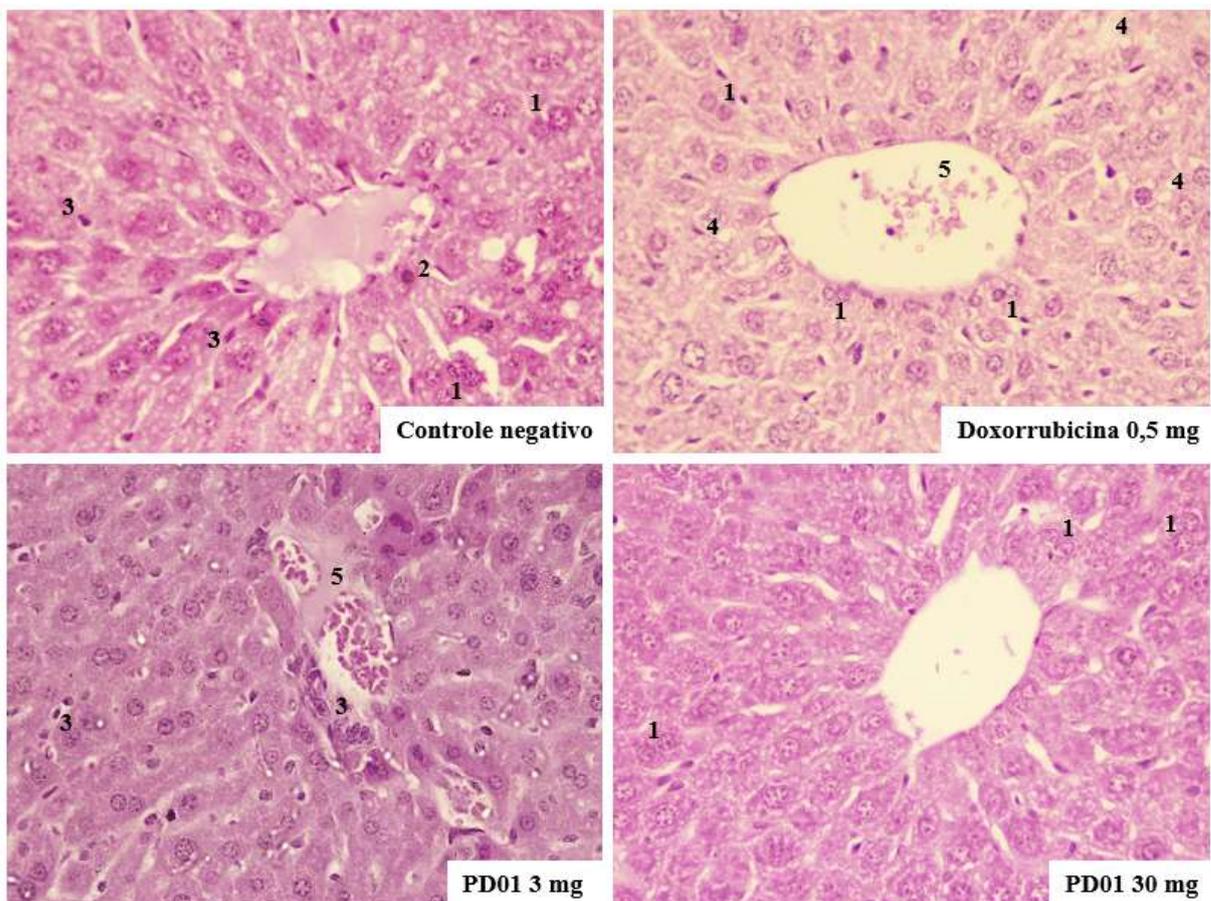


Figura 21. Cortes histológicos de fígados de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 μ L Kolifor + 20 μ L DMSO + 1.960 μ L salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – hepatócitos binucleados; 2 – célula apoptótica; 3 – células de Kupffer; 4 – gordura; 5 – veia centrolobular com hemácias. Coloração: HE. Aumento: 40x.

Os pulmões apresentaram musculatura bem desenvolvida, como é possível observar na Figura 22. No grupo controle negativo foi exibido parênquima pulmonar e bronquíolos espessados, com maior comprometimento das regiões peribronquiolares, vasos congestionados e infiltrados inflamatórios. Nos grupos tratados tanto com doxorrubicina quanto com o PD01 foram identificados os mesmos padrões de comprometimento tecidual e desorganização estrutural observados no controle negativo, com a adição da presença de ninhos e massas tumorais estabelecidas.

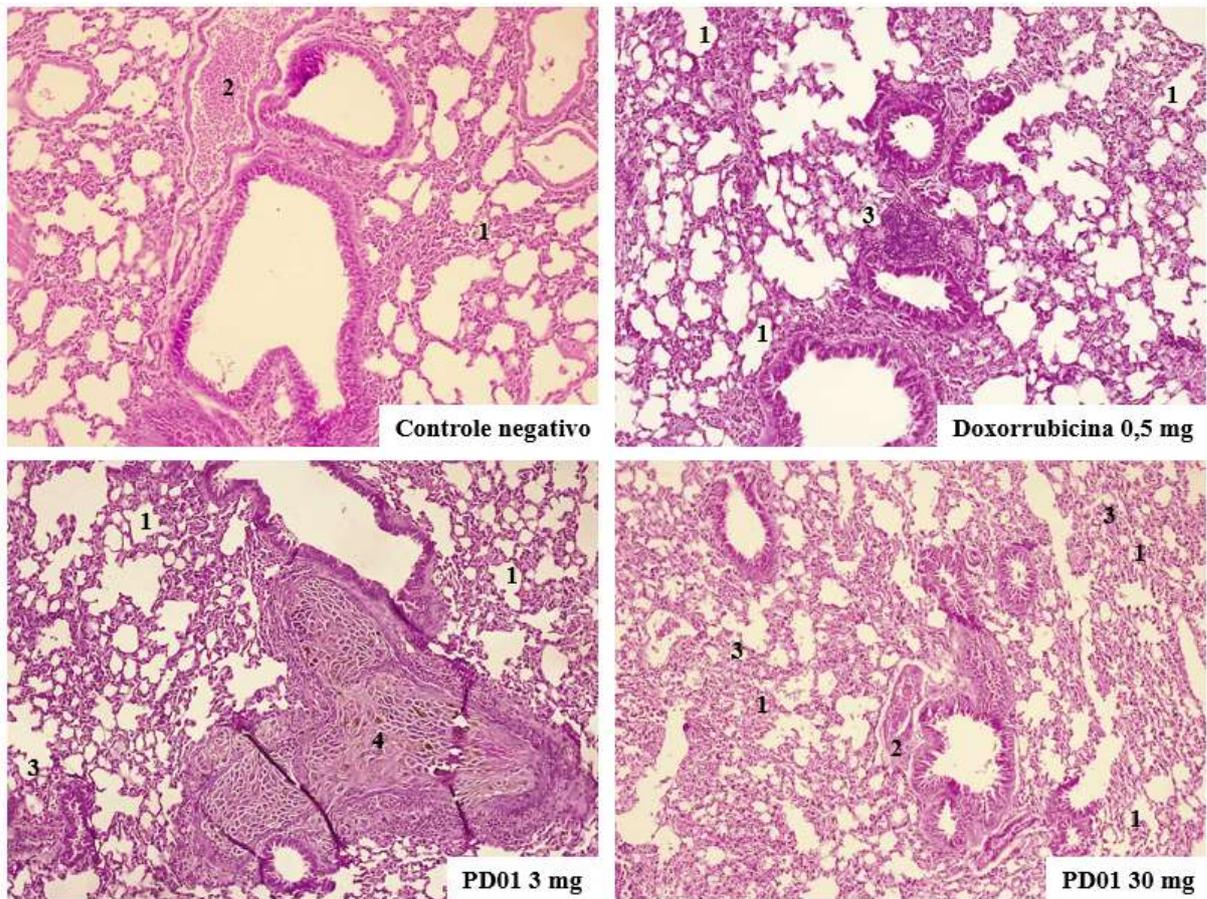


Figura 22. Cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorrubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 μ L Kolifor + 20 μ L DMSO + 1.960 μ L salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – espessamento do parênquima pulmonar; 2 – congestão vascular; 3 – infiltrado inflamatório; 4 – massa tumoral. Coloração: HE. Aumento: 10x.

A linhagem B16-F10 tem uma afinidade particular pelos pulmões, o que é bem documentado na literatura. Fidler e Nicolson (1976) observaram que as células B16-F10 têm uma alta capacidade de formar metástases pulmonares, seja a partir de uma inoculação subcutânea primária ou de uma injeção intravenosa. A afinidade da linhagem B16-F10 pelo

ambiente micropulmonar foi desenvolvida por Fidler em 1973, ao selecionar variantes de melanoma murino com maior capacidade de metástase pulmonar (Fidler, 1973; Nicolson et al., 1978). Esse fenômeno foi amplamente observado nos grupos tratados com PD01 e doxorrubicina, com a presença de nódulos e massas tumorais evidentes no pulmão, indicando que ambos os tratamentos, embora com alguma atividade antitumoral *in vivo*, não impediram completamente a formação de metástases pulmonares.

Os tumores apresentaram um padrão tumoral consistente entre os grupos avaliados (Figura 23). Estes apresentavam melanócitos de morfologia poliédrica, caracterizados por atipia celular com núcleos evidentes e também presença de células neoplásicas malignas binucleadas. Em algumas regiões, foram identificados melanócitos expressando melanina. Observou-se capacidade angiogênica significativa, além da presença de adipócitos e tecido conjuntivo. Todos os tumores exibiram, macroscopicamente, uma estrutura capsular que envolvia uma massa tumoral, que era predominantemente composta por tecido conjuntivo.

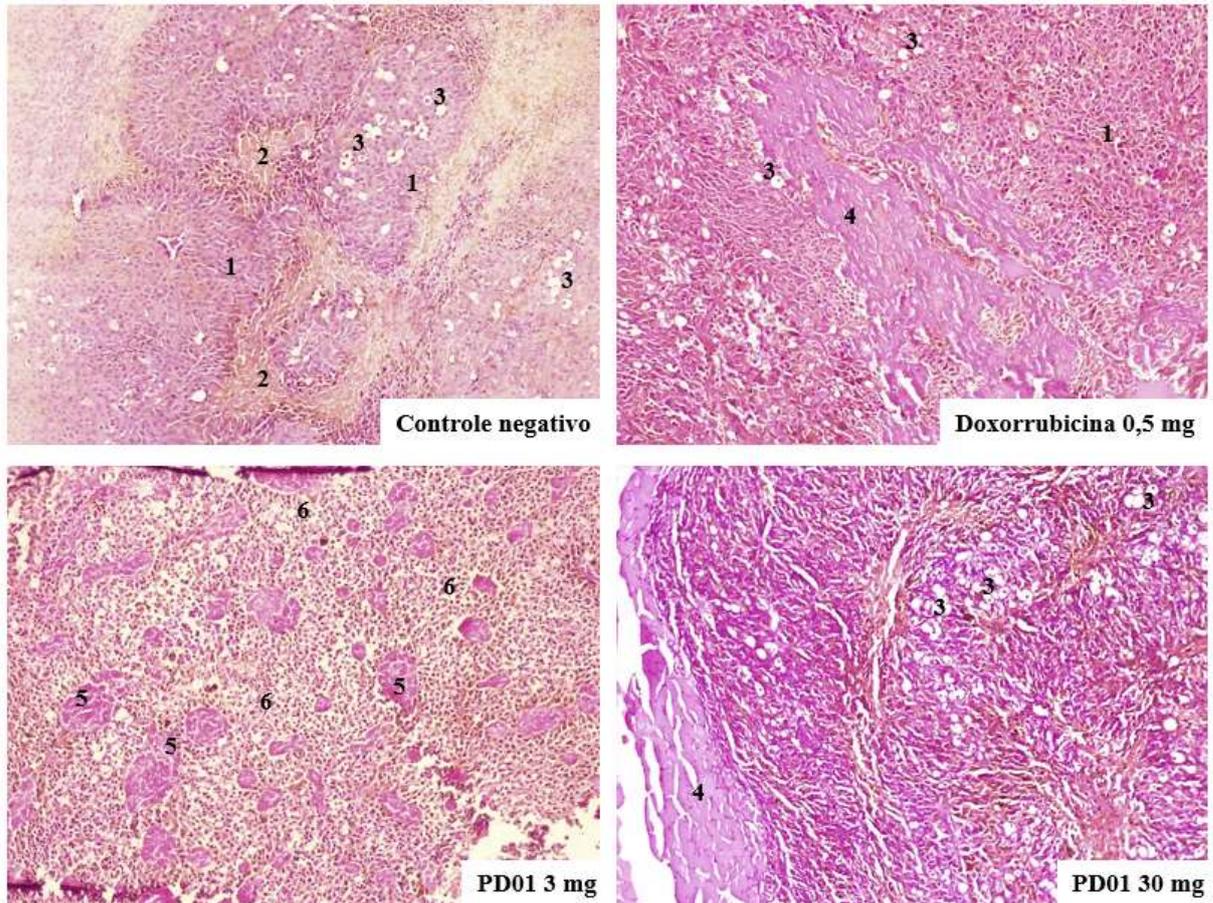


Figura 23. Cortes histológicos dos tumores de camundongos C57BL/6 inoculados com células de melanoma murino (B16-F10) tratados por 13 dias com doses de 3 e 30 mg/Kg/dia de PD01. A doxorubicina 0,5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. 1 – melanócitos; 2 – produção de melanina; 3 – adipócitos; 4 – tecido conjuntivo; 5 – vascularização; 6 – núcleos picnóticos. Coloração: HE. Aumento: 10x.

A integração dos resultados *in vivo* e histológicos sugere que o PD01 possui alguma atividade antitumoral, mas com uma eficácia limitada em comparação à doxorubicina. Embora tenha demonstrado algum efeito sobre o crescimento tumoral primário, a presença de metástases pulmonares em todos os grupos, incluindo os tratados com PD01, indica que a linhagem B16-F10 tem uma forte tendência a se disseminar para os pulmões, independentemente do tratamento. Além disso, os efeitos adversos observados em órgãos como os rins, embora menos pronunciados no grupo PD01, indicam que o composto pode ter efeitos tóxicos locais, o que reforça a importância de otimizar a dosagem e a formulação do PD01 para reduzir esses danos e melhorar sua eficácia.

6. CONCLUSÃO

As simulações computacionais demonstraram que o PD01 possui uma interação mais forte com o receptor BRAF mutado (V600E) do que o medicamento de referência, o Vemurafenib. Esse achado indica um potencial mais promissor do PD01 em combater tumores relacionados a essa mutação, o que é um ponto fundamental para o desenvolvimento de tratamentos direcionados e personalizados.

As análises espectroscópicas confirmaram a estrutura química da molécula PD01, que juntamente com as análises térmicas forneceram dados importantes sobre suas propriedades físico-químicas. Esses dados corroboram a identidade estrutural da molécula, fornecendo segurança quanto à pureza e estabilidade do composto, aspectos essenciais para a formulação de medicamentos.

Os resultados *in vitro* demonstraram a atividade citotóxica significativa do PD01 contra as linhagens de melanoma avaliadas, SK-MEL-28 e B16-F10, além da linhagem não tumoral MRC-5. Esses ensaios também evidenciaram a morte celular por apoptose e necrose, confirmando o potencial anticâncer do composto.

Embora os ensaios *in vitro* tenham mostrado resultados promissores, os testes em modelo murino *in vivo* revelaram que o PD01 tem um efeito antitumoral limitado, especialmente quando comparado à doxorrubicina, um medicamento conhecido e eficaz. Esse dado é crucial, pois destaca a diferença entre os resultados *in vitro* e a eficácia no organismo vivo, indicando que o PD01 ainda enfrenta desafios, como a farmacocinética e biodisponibilidade.

Para maximizar a eficácia antitumoral do PD01 e minimizar efeitos adversos, são necessárias pesquisas adicionais, com foco na otimização da formulação e das dosagens do composto. A compreensão da seletividade do PD01 e dos mecanismos subjacentes ao seu efeito citotóxico são pontos cruciais para a viabilidade clínica do composto.

7. REFERENCIAS

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AKBANI, R.; AKDEMIR, K. C.; AKSOY, B. A.; ALBERT, M.; ALLY, A.; AMIN, S. B.; et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681-1696, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2023**. Atlanta: American Cancer Society, 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>>. Acesso em 10 de dezembro de 2024.

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FILHO, E. R.; PRADO, M. A. F.; FACCIONE, M.; SANTOS, R. M. G.; FERRARINI, S. R.; SILVA, T. H. A.; FARIA, T. J.; EIFLER-LIMA, V. L. **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: um curso prático**. 2ª Edição, Editora Manole, Barueri, São Paulo, 2012.

APALLA, Z.; LALLAS, A.; SOTIRIOU, E.; LAZARIDOU, E.; IOANNIDES, D. Epidemiological trends in skin cancer. **Dermatology practical & conceptual**, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2017.

ASCIERTO, P.A.; KIRKWOOD, J.M.; GROB, J.-J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A.M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F.M.; MOZZILLO, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, p. 10, v. 85, 2012.

BASTIAN, B. C. The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. **Annual Review of Pathology**, v. 9, n. 1, p. 239-271, 2014.

BRAHMER, J. R.; ABU-SBEIH, H.; ASCIERTO, P. A.; BRUFISKY, J.; CAPPELLI, L. C.; CORTAZAR, F. B.; GERBER, D. E.; HAMAD, L.; HANSEN, E.; JOHNSON, D. B.; LACOUTURE, M. E.; MASTERS, G. A.; NAIDOO, J.; NANNI, M.; PERALES, M. A.; PUZANOV, I.; SANTOMASSO, B. D.; SHANBHAG, S. P.; SHARMA, R.; SKONDRA, D.; SOSMAN, J. A.; TURNER, M.; ERNSTOFF, M. S. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immune checkpoint inhibitor-related adverse events. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 9, n. 6, 2021.

CADET, J.; DOUKI, T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. **Photochemical & Photobiological Sciences**, n. 17, p. 1816-1841, 2018.

CARVAJAL, R. D.; SACCO, J. J.; JAGER, M. J.; ESCHELMAN, D. J.; BAGGE, R. O.; HARBOUR, J. W.; CHIENG, N. D.; PATEL, S. P.; JOSHUA, A. M.; NEUMANN, S. P. Advances in the clinical management of uveal melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, p. 99-115, 2023.

- COLAS, K.; DOLOCZKI, S.; URRUTIA, M. P.; DYRAGER, C. Prevalent Bioimaging Scaffolds: Synthesis, Photophysical Properties and Applications. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2021, ed. 15, p. 2133-2144, 2021.
- COLLINS, A. R.; DUŠINSKÁ, M.; HORSKÁ, A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 611-614, 2001.
- COSTA, E. V.; MENEZES, L. R.; ROCHA, S. L.; BALIZA, I. R.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A.; SOARES, M. B. BEZERRA, D. P. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 7, p. 563-567, 2015.
- CRAMPON, K.; GIORKALLOS, A.; DELDOSSI, M.; BAUD, S.; STEFFENEL, L. A. Machine-learning methods for ligand-protein molecular docking. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 151-164, 2022.
- CZARNECKA, A. M.; BARTNIK, E.; FIEDOROWICZ, M.; RUTKOWSKI, P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, 4576, p. 1-21, 2020.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, 7, 42717 (2017).
- DOMINGUES, B.; LOPES, J. M.; SOARES, P.; PÓPULO, H. Melanoma Treatment in Review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 2018, n. 7, p. 35-49, 2018.
- EBERHARDT, J.; SANTOS-MARTINS, D.; TILLACK, A. F.; FORLI, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021.
- ELDER, D. E.; BASTIAN, B. C.; CREE, I. A.; MASSI, D.; SCOLYER, R. A. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 144, n. 4, p. 500-522, 2020.
- ERNST, M. GIUBELLINO, A. The Current State of Treatment and Future Directions in Cutaneous Malignant Melanoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 4, 822, p. 2-30, 2022.
- ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 594, p. 57-72, 2010.
- FEMINA, T. A.; BARGHAVI, V.; ARCHANA, K.; SWETHAA, N. G.; MADDALY, R. Non-uniformity in in vitro drug-induced cytotoxicity as evidenced by differences in IC50 values – implications and way forward. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 119, p. 107238, 2023.
- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.
- FIDLER, I. J. Selection of Successive Tumor Lines for Metastasis. *Nature*. **New Biololy**, v. 242, p. 148-149, 1973.

FIDLER, I. J.; NICOLSON, G. L. Organ selectivity for implantation survival and growth of b16 melanoma variant tumor lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 5, p. 1199-1202, 1976.

FIRNHABER, J. M. Basal Cell and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 102, n. 6, p. 339-346, 2020.

GHAHSARE, A. G.; NAZIFI, Z. S.; NAZIFI, S. M. R. Structure-Bioactivity Relationship Study of Xanthene Derivatives: A Brief Review. **Current Organic Synthesis**, v. 16 n. 8, p. 1071-1077, 2019.

GIRI, R.; GOODELL, J. R.; XING, C.; BENOIT, A.; KAUR, H.; HIASA, H.; FERGUSON, D. M. Synthesis and cancer cell cytotoxicity of substituted xanthenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1456-1463, 2010.

GOUGIS, P.; HILMI, M.; GERAUD, A.; MIR, O.; FUNCK-BRENTANO, C. Potential cytochrome P450-mediated pharmacokinetic interactions between herbs, food, and dietary supplements and cancer treatments. **Critical Reviews Oncology/Hematology**, v. 166, p. 103342, 2021.

GRASSO, M.; ESTRADA, M. A.; VENTOCILLA, C.; SAMANTA, M.; MAKSIMOSKA, J.; VILLANUEVA, J.; WINKLER, J. D.; MARMORSTEIN, R. Chemically Linked Vemurafenib Inhibitors Promote an Inactive BRAFV600E Conformation. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 10, p. 2876-2888, 2016.

GRUBER, P.; ZITO P. M. Skin Cancer. **StatPearls**, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441949/>>. Acesso em: 21 de abril de 2023.

GUY, G. P. J.; THOMAS, C. C.; THOMPSON, T.; WATSON, M.; MASSETTI, G. M.; RICHARDSON, L. C. Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections – United States, 1982-2030. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 21, p. 591-596, 2015.

HAHNVAJANAWONG, C.; BOONYANUGOMOL, W.; NASOMYON, T.; LOILOME, W.; NAMWAT, N.; ANANTACHOKE, N.; TASSANEYAKUL, W.; SRIPA, B.; NAMWAT, W.; REUTRAKUL, V. Apoptotic activity of caged xanthenes from *Garcinia hanburyi* in cholangiocarcinoma cell lines. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2235-2243, 2010.

HART, I. R. The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. **American Journal of Pathology**, v. 97, n. 3, p. 587-600, 1979.

HUANG, A. C.; ZAPPASODI, R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. **Nature Immunology**, v. 23, p. 660-670, 2022.

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS (IFSC). Estudo visto ao tratamento do melanoma através de terapia fotodinâmica. Instituto de Física de São Carlos (IFSC), 2016. Disponível em: <https://www2.ifsc.usp.br/portal-ifsc/estudo-visa-ao-tratamento-do-melanoma-atraves-de-terapia-fotodinamica/>. Acesso em: 2 de dezembro de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em 07 de outubro de 2022.

JENDRZEJEWSKA, I.; GORYCZKA, T.; PIETRASIK, E.; KLIMONTKO, J.; JAMPILEK, J. Identification of Sildenafil Compound in Selected Drugs Using X-ray Study and Thermal Analysis. **Molecules**, v. 28, n. 6, 2632, 2023.

JONES, O. T.; RANMUTHU, C. K. I.; HALL, P. N.; FUNSTON, G.; WALTER, F. M. Recognising Skin Cancer in Primary Care. **Advances in Therapy**, v. 37, p. 603-616, 2020.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13ª Edição, Porto Alegre, editora: McGraw-Hill, 2017.

KHALIL, M. I.; AGAMY, A. F.; ELSHEWEMI, S. S.; SULTAN, A. S.; ABDELMEGUID, N. E. Pterostilbene induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells: Biochemical, pathological, and molecular markers. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 8, p. 103717, 2023.

LIU-SMITH, F.; JIA, J.; ZHENG, Y. UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 27-40, 2017.

LUGOWSKA, I.; TETERYCZ, P.; RUTKOWSKI, P. Immunotherapy of melanoma. **Contemporary Oncology (Pozn)**, v. 22 n. 1A, p. 61-67, 2018.

MAIA, M.; RESENDE, D. I. S. P.; DURÃES, F.; PINTO, M. M. M.; SOUSA, E. Xanthenes in Medicinal Chemistry – Synthetic strategies and biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, 113085, 2021.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, p. 1469-1478, 2018.

MELANOMA BRASIL. Melanoma cutâneo. Melanoma Brasil, 2024. Disponível em: <https://www.melanomabrasil.org/melanoma-cutaneo/>. Acesso em: 2 de dezembro de 2024.

MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, ed. 1, p. 1-7, 2018.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development**, v. 142, n. 4, p. 620-632, 2015.

NGUYEN, K.; HIGNETT, E.; KHACHEMOUNE, A. Current and emerging treatment options for metastatic melanoma: a focused review. **Dermatology Online Journal**, v. 26, n. 7, 2020.

NICOLSON, G. L.; BRUNSON, K. W.; FIDLER, I. J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer Research**, v. 38, p. 4105-4011, 1978.

NUNES, C. S.; CINSA, L. A. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, p. 31-40, 2016.

OLSON, B.; LI, Y.; LIN, Y.; LIU, E. T.; PATNAIK, A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. **Cancer Discovery**, v. 8, n.11, p.1358-1365, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Câncer**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 17 abril de 2023.

OSTROWSKI, S. M.; FISHER, D. E. Biology of Melanoma. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 29-56, 2021.

PAGGI, J. M.; PANDIT, A.; DROR, R. O. The Art and Science of Molecular Docking. **Annual Review of Biochemistry**, v. 93, p. 389-410, 2024.

PAN, D.; CHEN, S.; JANNASCH, P. Alkali-Stable Anion Exchange Membranes Based on Poly(xanthene). **ACS Macro Letters**, v. 12, n. 1, p. 20-25.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V., FIMIA, G. M.; DINI, L. Rose Bengal acetate photodynamic therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human HeLa cells. **PLoS One**, v. 9, n. 8, e105778, 2014.

RALPH, A. C. L.; CALCAGNO, D. Q.; SOUZA, L. G. S.; LEMOS, T. L. G.; MONTENEGRO, R. C.; SMITH, M. A. C.; VASCONCELLOS, M. C. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 237-245, 2016.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. 8ª Edição, Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2016.

RICHTIG, G.; HOELLER, C.; KASHOFER, K.; AIGELSREITER, A; HEINEMANN, A. KWONG, L. N.; PICHLER, M.; RICHTIG, E. Beyond the BRAF(V)(600E) hotspot: biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 4, p. 936-944, 2017.

ROBINSON, N. B.; KRIEGER, K.; KHAN, F. M.; HUFFMAN, W.; CHANG, M.; NAIK, A.; YONGLE, R.; HAMEED, I.; KRIEGER, K.; GIRARDI, L. N.; GAUDINO, M. The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, v. 72, p. 9-13, 2019.

SATO, S.; NOJIRI, T.; OKUYAMA, N.; MAEDA, K.; KIRIGANE, A. Synthesis and evaluation of a new water-soluble fluorescent red dye, xanthene bis-C-glycoside. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, ed. 9, p. 3342-3349, 2020.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345-358, 2016.

SILVA, C. F. M.; PINTO, D. C. G. A.; FERNANDES, P. A.; SILVA, A. M. S. Evolution of Acridines and Xanthenes as a Core Structure for the Development of Antileishmanial Agents. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, 148, 2022.

SILVA, K. E. R. **Caracterização físico-química, desenvolvimento e validação de metodologias analíticas de doseamento da nova entidade química 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4)**. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica), Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2012.

SINGER, J.; WACHTER, E. A.; THAKUR, S.; SWIFT, L.; ZHANG, C.; JAIN, M.; NARENDRAN, A. *In Vitro* and Xenograft Anti-tumor Activity of a Halogenated-Xanthene against Refractory Pediatric Solid Tumors, US20190350893, 2019.

SINGH, N. P.; MC COY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, ed. 1, p. 184–191, 1988.

SONG, Y.; YANG, Y.; WU, L.; DONG, N.; GAO, S.; JI, H.; DU, X.; LIU, B.; CHEN, G. Synthesis and Cytotoxicity of N-Substituted Dibenzo[a,j]xanthene-3,11-dicarboxamide Derivatives. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 517-529, 2017.

TABARA, A.; YAMANE, C.; ABE, M.; SEGUCHI, M. Adsorption of xanthene food additive dyes to cellulose granules. **Cellulose**, 18, p. 45-55, 2011.

THOMPSON, J. F.; AGARWALA, S. S.; SMITHERS, B. M.; ROSS, M. I.; SCOGGINS, C. R.; COVENTRY, B. J.; NEUHAUS, S. J.; MINOR, D. R.; SINGER, J. M.; WACHTER, E. A. Phase 2 Study of Intralesional PV-10 in Refractory Metastatic Melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 7, p. 2135-2142, 2015.

VANNI, I.; TANDA, E. T.; SPAGNOLO, F.; ANDREOTTI, V.; BRUNO, W.; GHIORZO, P. The current state of molecular testing in the BRAF-mutated melanoma landscape. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v.7, 113, 2020.

WANG, F.; GAO, F.; LAN, M.; YUAN, H.; HUANG, Y.; LIU, J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 5, p. 808-815, 2009.

WANG, K.; ZHANG, J.; DE SOUSA JÚNIOR, W. T.; DA SILVA, V. C. M.; RODRIGUES, M. C.; MORAIS, J. A. V.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; MUEHLMANN, L. A. A xanthene derivative, free or associated to nanoparticles, as a new potential agent for anticancer photodynamic therapy, **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 31, n. 15, p. 1977-1993, 2020.

WANG, K.; ZHANG, J.; DE SOUSA JÚNIOR, W. T.; DA SILVA, V. C. M.; RODRIGUES, M. C.; MORAIS, J. A. V.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; MUEHLMANN, L. A. A xanthene derivative, free or associated to nanoparticles, as a new potential agent for anticancer photodynamic therapy. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 31, n. 15, p. 1977-1993, 2020.

Wesolowski, M.; Leyk, E. Coupled and Simultaneous Thermal Analysis Techniques in the Study of Pharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p.1596, 2023.

XU, X.; WU, Y.; HU, M.; LI, X.; BAO, Q.; BIAN, J.; YOU, Q.; ZHANG, X. Novel Natural Product-like Caged Xanthenes Bearing a Carbamate Moiety Exhibit Antitumor Potency and Anti-Angiogenesis Activity *In vivo*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35771, 2016.



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



UFAM

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE COMPOSTOS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICOS EM MODELOS *in vitro* e *in vivo*” sob a responsabilidade dos pesquisadores Emerson Silva Lima e Patricia Danielle Oliveira de Almeida (docentes FCF/UFAM) – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada *ad hoc* sob o N. 005/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Abril a Outubro/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos C57BL6
N. de animais	80
Peso/Idade	2 meses / 25 a 30 g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/Unicamp.

Manaus, 30 de março de 2021.

Profª. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM