

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTICÂNCER DE
DERIVADOS DE LAPACHOL E UMBELIFERONA

TALLITA MARQUES MACHADO

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TALLITA MARQUES MACHADO

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTICÂNCER DE
DERIVADOS DE LAPACHOL E UMBELIFERONA

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

Orientadora: Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

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

M149p Machado, Tallita Marques
Planejamento, síntese e avaliação anticâncer de derivados de lapachol e umbeliferona / Tallita Marques Machado. 2018
135 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos
Coorientadora: Fernanda Guilhon Simplicio
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. ancoragem molecular. 2. topoisomerase. 3. genotoxicidade. 4.
produtos naturais. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

TALLITA MARQUES MACHADO

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTICÂNCER DE
DERIVADOS DE LAPACHOL E UMBELIFERONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de abril de 2018.

BANCA EXAMIDADORA



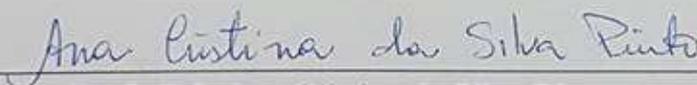
Prof.^a. Dr.^a. Marne Carvalho de Vasconcellos

Orientadora/Presidente



Prof.^a. Dr.^a. Raquel Carvalho Montenegro

Membro externo



Prof.^a. Dr.^a. Ana Cristina da Silva Pinto

Membro externo

RESUMO

O câncer é segunda causa de morte no mundo sendo considerado um problema de saúde pública. Devido a este panorama, a pesquisa por substâncias que possuam potencial anticâncer é crescente, bem como utilização de métodos *in silico* com o intuito de prever propriedades farmacocinéticas, toxicológicas e atividade biológica de moléculas para um planejamento racional de fármacos. Objetivou-se nesta pesquisa, planejar, sintetizar e avaliar o potencial anticâncer de derivados do lapachol e da umbeliferona, associando métodos *in silico* e *in vitro* com o intuito de potencializar a chance de se encontrar compostos bioativos. Foram planejados 25 derivados da umbeliferona e 25 derivados do lapachol, os quais foram avaliados por meio da ancoragem molecular utilizando o *software* Autodock vina® tendo as enzimas topoisomerase I e II como alvos biológicos, bem como tiveram suas propriedades moleculares, toxicológicas e farmacocinéticas avaliadas por meio dos *softwares* Molinspiration®, Osiris® e PreADMET®. Os derivados selecionados foram sintetizados e tiveram sua estrutura confirmada por análise de RMN e espectrometria de massas e avaliados *in vitro* quanto ao seu potencial anticâncer por meio da análise de citotoxicidade pelo método do Alamar Blue, genotoxicidade que foi avaliada pelo ensaio do cometa de pH alcalino, que detecta qualquer dano causado ao DNA, e de pH neutro, específico para quebras da fita dupla e dano causado ao DNA por inibidores da topoisomerase I e II, bem como a avaliação da expressão gênica destas enzimas. Após a realização das análises *in silico*, foram selecionados os derivados LP04, LP017, LP18, LP20, LP23, LP24, LP25, UMB22, UMB24 e UMB25 por apresentarem melhor perfil de complementariedade com o sítio ativo da topoisomerase I e II, bem como interações com resíduos de aminoácidos críticos característicos dos inibidores destas enzimas. Além disso, apresentaram bons perfis moleculares, farmacocinéticos e baixo efeito toxicológico, características desejadas no planejamento de fármacos. Os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 apresentaram atividade citotóxica nas linhagens de câncer de mama (MCF-7) e colorretal (HCT116), exibindo uma CI_{50} em 72 horas para a linhagem MCF7 que variou de 2,41 a 8,20 μM , e de 5,40 a 18,68 μM na linhagem HCT116, apresentando maior atividade quando comparados à molécula de partida. Tanto os derivados da umbeliferona quanto sua molécula de partida apresentou atividade citotóxica maior que 20 μM . Através da análise do índice de dano, observou-se que os derivados apresentaram danos significativos ($p < 0,05$) em pH alcalino, em pH neutro e na análise de indução de dano causado ao DNA por inibidores da topoisomerase, apresentando maior índice de dano no cometa neutro, que variou de $37,6 \pm 0,76$ a $83,0 \pm 3,5$ na linhagem HCT116 e de $40,6 \pm 2,7$ a $105,3 \pm 2,0$ na linhagem MCF7 sugerindo que estes possam atuar como inibidores da topoisomerase II. Na análise da expressão dos genes da topoisomerase, o LP25 apresentou uma redução na expressão dos genes da topoisomerase I, II alfa e II beta na concentração de 7,5 μM e 15 μM . Assim, os derivados apresentaram potencial anticâncer sendo necessária a realização de estudos mais específicos com intuito de avaliar a inibição da topoisomerase de forma direta bem como avaliar outras vias de inibição e de mecanismos de morte destes derivados.

Palavras-chave: ancoragem molecular, topoisomerase, genotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is the second cause of death in the world and is considered a public health problem. Cancer is the second leading cause of death in the world and is considered a public health problem. Due to this scenario, the search for substances that possess anticancer potential from compounds of natural or semi-synthetic origin is increasing, as well as the use of in silico methods in order to predict pharmacokinetic, toxicological and biological activity of molecules for rational planning of drugs. The objective of this research was to plan, synthesize and evaluate the anticancer potential of lapachol and umbelliferone derivatives, associating in silico and in vitro methods in order to potentiate the chance of finding bioactive compounds. 25 umbelliferone derivatives and 25 lapachol derivatives were designed, which were evaluated by molecular anchoring using the Autodock vina® software having topoisomerase I and II enzymes with biological targets, as well as their molecular, toxicological and pharmacokinetic properties evaluated by through Molinspiration®, Osiris® and PreADMET® software. The selected derivatives were synthesized and confirmed by NMR analysis and mass spectrometry and evaluated in vitro for their anticancer potential by cytotoxicity, genotoxicity analysis that was evaluated by the alkaline pH comet assay, which detects any damage caused to the DNA, of neutral pH, specific for breaks of the double tape and damage caused to the DNA by topoisomerase inhibitors I and II, as well as the evaluation of the gene expression of these enzymes. After the in silico analysis, the derivatives LP04, LP017, LP18, LP20, LP23, LP24, LP25, UMB22, UMB24 and UMB25 were selected because they presented a better complementarity profile with the active site of topoisomerase I and II, as well as interactions with critical amino acid residues characteristic of the inhibitors of these enzymes. In addition, they presented good molecular profiles, pharmacokinetics and low toxicological effect, characteristics desired in the planning of drugs. The cytotoxicity evaluation was performed by the Alamar Blue method, the derivatives LP04, LP17, LP18, LP20 and LP25 presented cytotoxic activity in the breast cancer (MCF-7) and colorectal (HCT116) strains, being selected for the subsequent tests, exhibiting an IC₅₀ in 72 hours for the MCF7 strain ranging from 2.41 to 8.20 µM and from 5.40 to 18.68 µM in the HCT116 strain, all derivatives having better activity when compared to the starting molecule. Both the umbelliferone and the starter molecules showed cytotoxic activity greater than 20 µM, and did not present an anticancer potential. Through the analysis of the damage index, it was observed that the derivatives presented significant damage ($p < 0.05$) in alkaline pH, neutral pH and in the analysis of induction of DNA damage by topoisomerase inhibitors, presenting a higher index of neutral comet, which ranged from 37.6 ± 0.76 to 83.0 ± 3.5 in the HCT116 line and from 40.6 ± 2.7 to 105.3 ± 2.0 in the MCF7 strain suggesting that to act as inhibitors of topoisomerase II. In the analysis of topoisomerase gene expression, only the activity of LP25, which showed a reduction in the expression of the topoisomerase I, II alpha and II beta genes at the concentration of 7.5 µM and 15 µM, could be evaluated. Thus, the derivatives showed anticancer potential and more specific studies were necessary to evaluate topoisomerase inhibition directly as well as to evaluate other pathways of inhibition and mechanisms of death of these derivatives.

Keywords: docking molecular, topoisomerase, genotoxicity.

“A felicidade pode ser encontrada até nos momentos mais sombrios, basta se lembrar de acender a luz.”

(J. K. Rowling)

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

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

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

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

Às minhas orientadoras, professora Marne Carvalho de Vasconcellos e professora Fernanda Guilhon Simplicio, que me acompanham desde a graduação, tiveram paciência comigo nos momentos que achei que fosse surtar e me possibilitaram chegar até aqui. Obrigada por tudo!!! Por todo carinho, conselho e dedicação!!! P.S.: Muito obrigada professora Fernanda por aquela ligação!!!!

Ao professor José Pereira que me ajudou na extração do RNA e na transcriptase reversa. Obrigada professor por tudo!!! rrsrrsr que me aguentou até mesmo quando chorei e achava que tudo estava perdido... mas sempre como uma palavra amiga e uma grande positividade!!!

À professora Maria Christina Verdam, a carioca mais legal que conheço, e a toda sua família!!!! Que me acolheram quando estive no Rio e nunca terei palavras suficientes para expressar a minha gratidão!!!

À professora Raquel Montenegro do laboratório FARMAGEN-UNIFAC da UFC que auxiliou na análise da expressão gênica e abriu as portas do laboratório. Muito obrigada por tudo!!!!

À professora Magdalena Rennó, a Daiane Jesus, o Vítor Rabelo, Carulini Pires, Carolina Savedra e Iara Robadey do laboratório LAMCIFAR da UFRJ-Macaé por todo suporte nas análises de ancoragem molecular e por terem me recebido tão bem em Macaé!!!

Aos amigos que o FITOPHAR me deu: Carol, Verônica, Lívia, Janaína, Sâmhara, Gabriel, Clarissa, Marcos e Rodrigo!!! Muito obrigada pelas palavras amigas, pelos sushis, pela companhia até altas horas no laboratório, pelas conversas, pelas alegrias e pelas superações (porque aquela música “que tiro foi esse” foi escrita para esse laboratório rrsrsrs)!!! P.S. obrigada Lívia, Verônica e Janaína (e marido da Janaína) pelas caronas!!!

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

Aos amigos da faculdade: Carol, Maíra, Lorena, Gutemberg e Rafinha por toda amizade, companheirismo e alegria que sinto quando estou com vocês.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas envolvidas na formação do câncer	20
Figura 2. Características biológicas do câncer.	21
Figura 3. Mecanismo de inibição da topoisomerase I e II.....	23
Figura 4. Inibidores da topoisomerase I (A) e da topoisomerase II (B).	26
Figura 5. Produtos naturais de origem vegetal com atividade anticâncer	28
Figura 6. Estrutura química da umbeliferona.	30
Figura 7. Estrutura química do lapachol	32
Figura 8. Planejamento de fármacos baseado em ferramentas computacionais a partir da estrutura do ligante e do receptor.....	33
Figura 9. Delineamento experimental das atividades desenvolvidas.....	38
Figura 10. Esquema da síntese do derivado LP04	43
Figura 11. Esquema da síntese do derivado LP17	44
Figura 12. Esquema da síntese do derivado LP18	44
Figura 13. Esquema da síntese do derivado LP23 e LP24	45
Figura 14. Esquema da síntese do derivado LP20 e LP25	46
Figura 15. Esquema da obtenção do alcino a partir da umbeliferona	47
Figura 16. Esquema da obtenção do alcino a partir do ácido salicílico	47
Figura 17. Esquema da obtenção da azida a partir do 2,4-dinitrofenilhidrazina	48
Figura 18. Esquema da obtenção da azida a partir da umbeliferona.....	48
Figura 19. Esquema da obtenção do triazol por meio de reação click	49
Figura 20. Esquema da síntese do derivado UMB25	49
Figura 21. <i>Redocking</i> dos ligantes cocristalizados com a topoisomerase	64
Figura 22. Representação 2D das interações dos derivados LP04 e LP17 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.....	65

Figura 23. Representação 2D das interações dos derivados LP18, LP23 e LP24 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I	66
Figura 24. Representação 2D das interações dos derivados LP20 e LP25 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.....	67
Figura 25. Representação 2D das interações dos derivados UMB22, UMB24 e UMB25 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I	68
Figura 26. Representação 2D das interações dos derivados LP18, LP20 e LP23 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa	69
Figura 27. Representação 2D das interações dos derivados LP24 e LP25 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa.....	70
Figura 28. Representação 2D das interações dos derivados UMB22 e UMB24 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa	71
Figura 29. Representação 2D das interações dos derivados LP01, LP17 e LP20 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta.....	72
Figura 30. Representação 2D das interações dos derivados LP04 e LP24 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta	73
Figura 31. Representação 2D das interações dos derivados UMB22 e UMB24 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta	74
Figura 32. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP04	77
Figura 33. Espectro de massas do modo positivo [M+H] ⁺	78
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H do derivado LP17.....	79
Figura 35. Espectro de massas no modo positivo [M+H] ⁺ do derivado LP17.....	79
Figura 36. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP18.....	80
Figura 37. Espectro de massas no modo positivo [M+H] ⁺ do derivado LP18.....	80
Figura 38. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP20.....	81
Figura 39. Espectro de massas do derivado LP20 no modo positivo [M+H] ⁺	82
Figura 40. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP23	82

Figura 41. Espectro de massas do derivado LP23 no modo positivo [M+H] ⁺ com formação de adutos de sódio	83
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP24	84
Figura 43. Espectro de massas do derivado LP24 no modo positivo [M+H] ⁺	84
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H do derivado LP25	85
Figura 45. Espectro de massas do derivado LP25 no modo positivo [M+H] ⁺	85
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H do derivado UMB25	86
Figura 47. Espectro de massas do derivado UMB25 no modo positivo [M+H] ⁺	87
Figura 48. Índice de dano ao DNA em células MRC-5 após 3h de tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro.....	92
Figura 49. Índice de dano ao DNA em células MRC-5 após 3h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino.....	93
Figura 50. Índice de dano ao DNA em células MCF7 após 3h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro com e sem adição da proteinase K.....	94
Figura 51. Índice de dano ao DNA em células MCF7 após 3 h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino com e sem adição da proteinase K	95
Figura 52. Índice de dano ao DNA em células HCT116 após 3 h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro com e sem adição da proteinase K....	96
Figura 53. Índice de dano ao DNA em células HCT116 após 3 h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino com e sem adição da proteinase K .	97
Figura 54. Expressão da topoisomerase I, II alfa e II beta após o tratamento com o derivado LP25 .	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS	Taxa de absorção
Akt	Proteína quinase B
AM1	<i>Austin model 1</i>
ATPase	Adenosinatrifosfatases
CADD	<i>Computer-Aided Drug Design</i>
CAIX	Anidrase carbônica IX
CCD	Cromatografia de camada delgada
cDNA	DNA complementar
Da	Dalton
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Doxo	Doxorrubicina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MM	Massa molecular
MMFF	<i>Mechanics Molecular Force Field</i>
NA	Número de átomos
NALH	Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio

NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
NDLH	Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
p53	Proteína tumoral p53
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Rf	Fator de retenção
RM1	<i>Recife Model 1</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
Topo II- α	Topoisomerase II alfa
Topo II- β	Topoisomerase II beta
TopoIcc	Complexo de clivagem topoisomerase I
TPSA	Área Superficial Polar Topológica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Câncer.....	19
2.1.2. Topoisomerases	22
2.2. Produtos naturais e o câncer	26
2.3. Planejamento de fármacos e métodos computacionais.....	32
2.3.1. Ancoragem Molecular	34
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. METODOLOGIA	38
4.1. Delineamento experimental	38
4.2. Planejamento das séries.....	39
4.3. Análise dos parâmetros moleculares, toxicológicos e farmacocinéticos <i>in silico</i>	39
4.4. Seleção dos alvos biológicos	40
4.5. Preparo dos ligantes	40
4.6. Preparo do alvo	41
4.7. Ancoragem molecular	42
4.8. Obtenção dos derivados do lapachol e da umbeliferona	43
4.8.1. Síntese da LP04.....	43
4.8.2. Síntese da LP17.....	43
4.8.3. Síntese da LP18.....	44
4.8.4. Síntese da LP23 e LP24.....	44
4.8.5. Síntese da LP20 e LP25.....	45
4.8.6. Síntese da UMB22 e UMB24	47
4.8.7. Síntese da UMB25	49
4.9. Confirmação estrutural.....	49
4.10. Cultivo celular	50
4.11. Avaliação da citotoxicidade.....	50
4.12. Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa	51
4.13. Detecção do dano no DNA induzido por inibidores da Topoisomerase.....	52

4.14. Expressão gênica da topoisomerase I e II.....	54
4.15. Análise estatística.....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Avaliação das propriedades moleculares	58
5.2. Propriedades Toxicológicas	60
5.3. Ancoragem molecular	63
5.3.1. Triagem virtual.....	64
5.5. Parâmetros farmacocinéticos	75
5.6. Obtenção dos derivados do lapachol e da umbeliferona.....	77
5.6.1. Síntese do LP04.....	77
5.6.2. Síntese do LP17.....	78
5.6.3. Síntese do LP18.....	79
5.6.4. Síntese do LP20.....	81
5.6.5. Síntese do LP23.....	82
5.6.6. Síntese do LP24.....	83
5.6.7. Síntese do LP25.....	84
5.6.8. Síntese do UMB22 e UMB24	86
5.6.9. Síntese do UMB25.....	86
5.7. Avaliação da citotoxicidade.....	87
5.8. Avaliação da genotoxicidade	91
5.8.1. Ensaio do cometa neutro e alcalino	91
5.8.2. Detecção do dano induzido por inibidores da topoisomerase	93
6. DISCUSSÃO	99
7. CONCLUSÃO	110
APÊNDICE 1	111
APÊNDICE 2	112
APÊNDICE 3	113
APÊNDICE 4	116
APÊNDICE 5	120
REFERÊNCIAS	123

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças complexas cuja origem está relacionada com as alterações na homeostase celular com um componente genético associado, que culminam no crescimento desordenado de células anômalas, incapazes de formar uma estrutura funcional, e que possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e órgãos distantes (FLOOR et al., 2012).

Cerca de 8,7 milhões de mortes por ano são ocasionadas pelo câncer, sendo a segunda causa de mortalidade em todo o mundo, devendo superar as doenças cardíacas como principal causa de morte nos próximos anos. Além disso, estima-se que no ano de 2030, cerca de 75 milhões de pessoas serão acometidas desta doença, cujo aumento irá incidir, principalmente, em países emergentes, como o Brasil (FITZMAURICE et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; INCA, 2018). Assim, devido à magnitude e ao impacto desta doença, a procura por medidas preventivas, ferramentas que auxiliem no diagnóstico precoce e a descoberta de novas alternativas terapêuticas são necessárias (THOMA et al., 2014; YANG, 2015).

Os fármacos disponíveis na terapia anticâncer possuem diversos mecanismos de ação. No entanto, a grande maioria é altamente tóxica e age principalmente nas células de rápida divisão celular o que ocasiona diversos efeitos adversos. Além disso, muitos fármacos utilizados atualmente são muitas vezes ineficazes e muitos pacientes já não respondem ao tratamento devido o desenvolvimento de resistência a estes agentes. Assim, a introdução de novas opções na terapia anticâncer é de suma importância (GARRAWAY; JÄNNE, 2012; HOUSMAN et al., 2014).

Planejar e desenvolver um novo fármaco consiste em um complexo, longo e de alto custo, que para maioria dos medicamentos já disponíveis no mercado consumiu entre 15 e 20

anos para ser concluído (LOMBARDINO; LOWE, 2004; DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016).

A evolução da química medicinal tem permitido a descoberta de diversas inovações terapêuticas. Os métodos *in silico* têm se tornado uma ferramenta amplamente empregada nos estágios iniciais de pesquisa e desenvolvimento para a identificação, seleção e otimização de moléculas com potencial terapêutico, com o intuito de reduzir a quantidade de moléculas avaliadas *in vitro* e *in vivo* e aumentar as chances de sucesso na identificação de moléculas bioativas. Além disso, têm sido adotadas estratégias de síntese ou semissíntese orientada pelo alvo, empregando a química combinatória para a produção de um grupo de substâncias bioativas (MODA, 2007; DAMIÃO, 2014; SANGI, 2016).

A diversidade de espécies de plantas, animais, micro-organismos marinhos resultam em uma multiplicidade de metabólitos secundários com grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que possibilitam que estas moléculas se tornem compostos líderes e protótipos para o planejamento e desenvolvimento de fármacos (KOEHN; CARTER, 2005; GUO, 2016).

Diversos compostos isolados de plantas têm sido utilizados com o intuito de avaliar seu potencial anticâncer, entre eles estão as naftoquinonas que possuem propriedades anticancerígenas tanto *in vitro* quanto em *in vivo* (VASCONCELLOS, 2007; INAGAKI et al., 2015; JARDIM et al., 2015; ZHANG; QU; NIU, 2016), bem como as cumarinas, que apresentam potencial citotóxico frente às células de linhagens cancerígenas (YU; HU; ZHANG, 2015; DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017), o que sugere que possuem grande potencial como molécula-base para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer.

Diante da diversidade do potencial químico e biológico de produtos naturais e da necessidade de novos fármacos estarem disponíveis no arsenal terapêutico contra o câncer, o

presente trabalho almejou planejar, realizar modificações químicas e avaliar a atividade anticâncer *in silico* e *in vitro* de derivados de compostos de origem natural, lapachol e umbeliferona, como moléculas líderes com o intuito de colaborar com futuras terapias partindo de um modelo racional de desenho de fármacos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer

O câncer possui origem multicausal, podendo estas causas serem intrínsecas ou extrínsecas ao organismo, ou ainda inter-relacionadas que podem iniciar ou promover a carcinogênese. As causas extrínsecas estão relacionadas ao meio ambiente, hábitos e costumes próprios de um ambiente social e cultural, como radiação ultravioleta e dieta, enquanto que as causas intrínsecas estão associadas a mutações genéticas e condições imunológicas, bem como o acúmulo de danos moleculares com o decorrer da idade (PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016; INCA, 2018).

Cerca de 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, como: o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, medicamentos, fatores ocupacionais e radiação solar. Assim, os fatores de risco ambientais são denominados cancerígenos ou carcinógenos, pois estes fatores atuam alterando a estrutura molecular do DNA das células (ALMEIDA et al., 2005).

No decorrer da vida, as células dividem-se até chegar à fase adulta. Já as células cancerígenas, continuam a crescer e a se dividir, não obedecendo aos mecanismos de controle fisiológicos. Esta proliferação celular anômala está associada a defeitos genéticos que resultam em alterações em etapas críticas da regulação do ciclo celular. Assim, devido à sua rápida divisão, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação de tumores primários com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como metastização, onde as células cancerígenas se disseminam a partir do tumor primário, se instalam e crescem em outras regiões (VASCONCELLOS, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; GUAN, 2015).

As células com mutações proliferam-se devido à presença de oncoproteínas e proteínas supressoras tumorais mutadas, compreendendo três principais etapas: iniciação, promoção e progressão (LOPEZ-CAMARILLO et al., 2012). No estágio de iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam mutações no DNA celular, que mantém o genoma instável. As alterações sequenciais ocorrem principalmente em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Mutações em genes supressores tumorais podem levar a transformação maligna das células quando a função dos genes é perdida, causando uma divisão celular descontrolada, diferenciação anormal e apoptose deficiente (OLIVEIRA et al., 2007; INCA, 2018).

No estágio da promoção, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual, acumulando alterações que permitam vantagens proliferativas e a capacidade de não responder aos mecanismos de controle do organismo. Enquanto que a progressão é o estágio final da transformação neoplásica, compreendendo uma fase entre a lesão pré-maligna e o desenvolvimento da metástase (MACLEOD, 2000; ALMEIDA et al., 2005; AMORIM et al., 2011; CÂNDIDO et al., 2016). As três etapas estão ilustradas na figura 1.

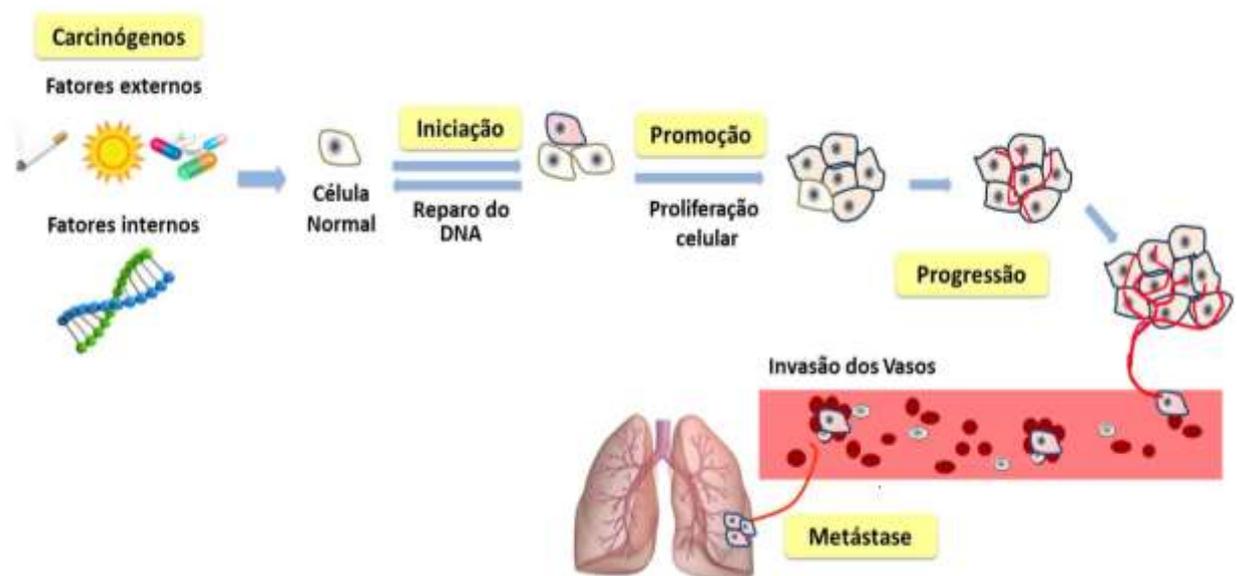


Figura 1. Etapas envolvidas na formação do câncer (Fonte: adaptado de Siddiqui et al., 2015).

O câncer possui características fundamentais que permitam o desenvolvimento da proliferação e um microambiente tumoral, que são: a sustentação de sinais pró-proliferativos, redução dos supressores de crescimento, resistência ao processo de morte celular, capacidade replicativa imortal, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase e outras características ilustradas na figura 2 (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



Figura 2. Características biológicas do câncer (Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

No Brasil, segundo as estimativas do biênio 2016/2017, ocorreram cerca de 600 mil novos casos de câncer, sendo a segunda maior causa de morte após as doenças cardiovasculares (INCA, 2016). E devido ao aumento da incidência e da mortalidade, o câncer tem sido considerado um problema de saúde pública, tanto pela extensão e custo social da doença, como pelo custo financeiro necessário ao seu adequado diagnóstico e tratamento (MARQUES; FIGUEIREDO; GUTIÉRREZ, 2015).

Devido à magnitude desta doença, durante as últimas décadas houve grande avanço na compreensão das causas do câncer, em particular, sobre os genes que afetam o seu desenvolvimento, possibilitando melhorias nas ferramentas para a detecção e tratamento, o

que é imprescindível, uma vez que um fator importante para o êxito da terapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (ALMEIDA et al., 2005; WARDLE et al., 2015).

O panorama da terapia antitumoral se modificou bastante nas últimas décadas. Inicialmente, a cirurgia representa um método muito eficaz de eliminar tumores sólidos e, com o advento da radioterapia e da quimioterapia, as abordagens de tratamento se tornaram métodos complementares, reduzindo a morbimortalidade associada ao câncer (DEVITA; CHU, 2008). Recentemente, a imunoterapia baseada na modulação do sistema imune como tentativa de intervir nos mecanismos evasão de células tumorais, tornou-se uma opção terapêutica bastante utilizada na rotina clínica, bem como a utilização da hormonioterapia (URRUTICOECHEA et al., 2010; GOLDEN; APETOH, 2015; HANNA; COYLE; PRISE, 2015).

Apesar da vasta quimioterapia anticâncer disponível, alguns agentes quimioterápicos possuem um mecanismo de ação inespecífico, tendo como principal entrave a semelhança entre as células malignas e sadias do organismo, o que leva a lesão de ambas. Além disso, muitos fármacos estão sujeitos à resistência (HOUSMAN et al., 2014). Assim, é necessário a obtenção de novas substâncias que forneçam novas estratégias e opções terapêuticas mais eficazes e seguras. Com isso, vem se buscando o desenvolvimento de fármacos antitumorais por planejamento racional de agentes que atuem em alvos celulares específicos (MAGALHÃES, 2014; BAUDINO, 2015).

2.1.2. Topoisomerases

As topoisomerases constituem uma importante classe de enzimas nucleares responsáveis pela manutenção do estado topológico do DNA e estão envolvidos na reparação do DNA, transcrição, replicação e separação de cromossomos. Existem duas classes de topoisomerases (tipos I e II), ambas caracterizadas por um mecanismo catalítico que envolve

um ataque nucleofílico de uma ligação fosfodiéster do DNA por um resíduo de tirosina da enzima, onde o tipo I cliva uma única cadeia de DNA, enquanto que o tipo II cliva ambas as cadeias (ARNO et al., 2013; SHARMA et al., 2015). Ambos os tipos são críticos para o funcionamento normal celular, sendo expressas em níveis elevados em células em crescimento do que em células quiescentes, com isso, a inibição do complexo das topoisomerases (figura 3) provoca o desencadeamento da apoptose celular. Assim, as topoisomerases são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas anticâncer (SORDET et al., 2003; BARROS et al., 2013).

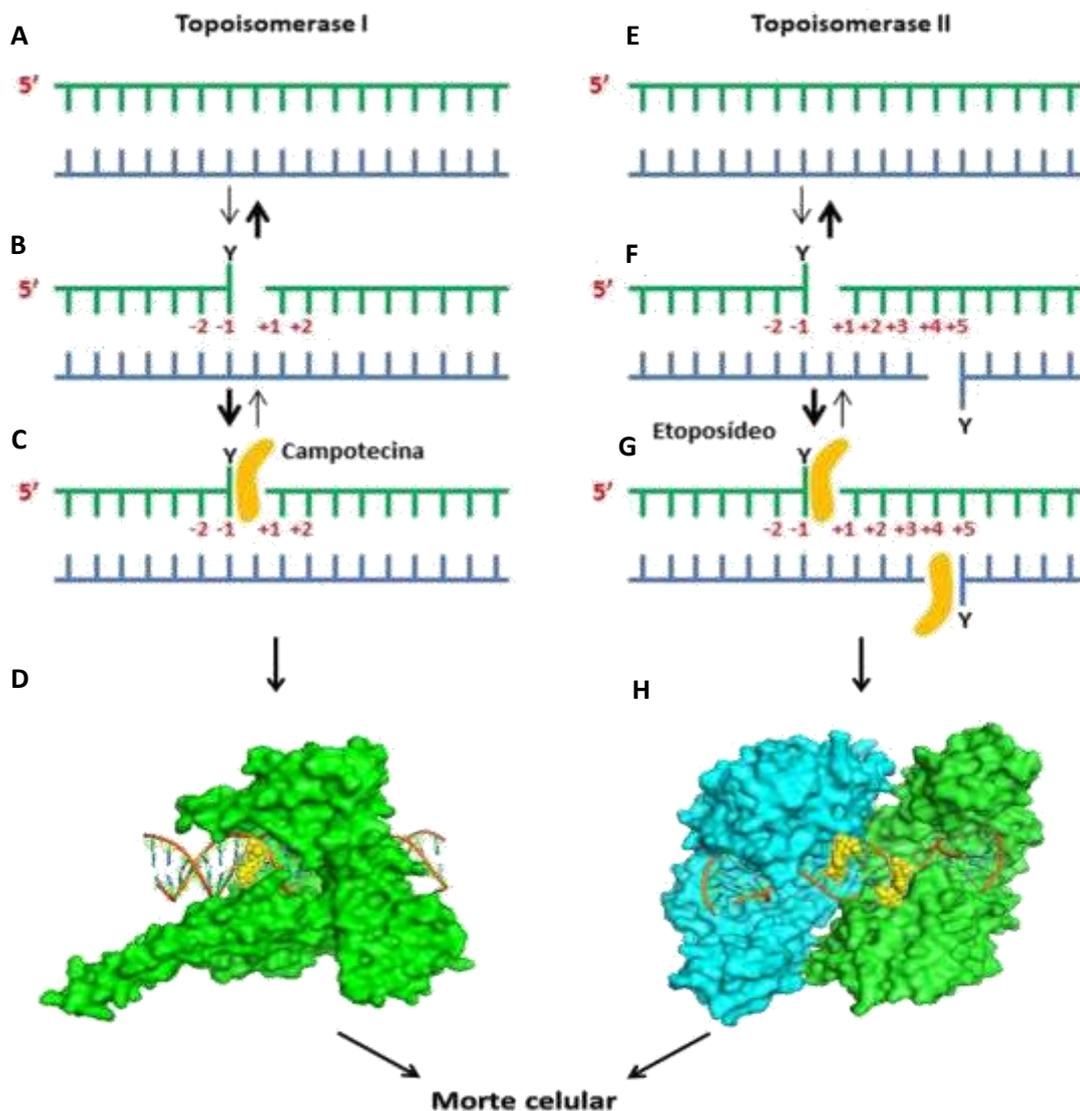


Figura 3. Mecanismo de inibição da topoisomerase I e II. A topoisomerase I (D) e II (H), em condições normais, clivam e religam o DNA rapidamente (A-B e E-F). Porém na presença de inibidores (verde) (C-D e G-

H) se ligam reversivelmente (C e G) na interface do DNA clivado e a enzima pela formação de um complexo promovendo danos ao DNA e ocasionando a morte celular (Fonte: adaptado de Pommier, 2013).

A topoisomerase I (Topo I) é composta por 765 aminoácidos divididos em quatro domínios distintos: o domínio NH₂-terminal altamente carregado que possui 214 aminoácidos, o domínio central que segue o domínio amino e possui 421 aminoácidos, o domínio ligante com 76 aminoácidos que liga o domínio central ao domínio COOH-terminal, que possui 52 aminoácidos. Nesta área encontra-se a tirosina 723 que é crucial para a atividade catalítica da enzima (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009; ARNO et al., 2013;). A Topo I se subdivide em IA e IB, sendo que o tipo encontrado em humanos é o IB, que forma uma ligação covalente com o final da fita 3' e relaxa o DNA por rotação controlada. A tensão do DNA é causada pela replicação, transcrição e remodelagem da cromatina, onde uma das fitas é quebrada pela Topo I e favorece a formação do ponto de giro que habilita a rotação da fita intacta pela fita quebrada. Assim, ocorre a expansão do relaxamento do DNA pelo complexo de clivagem Topo I (Topo Icc), que pode ser estabilizado por fármacos. Grandes quantidades de TOPO1cc favorecem modificações no DNA e apoptose. Durante a religação do Topo Icc ocorre ataque nucleofílico na ligação fosfodiéster-DNA-tirosil pelo final da fita de DNA livre, 5'-hidroxil-DNA, sendo crucial o perfeito alinhamento destes (POMMIER, 2006; BRANDÃO et al., 2010; LI; LIU, 2016).

A topoisomerase II (Topo II), é um dímero de tamanho aproximado de 170 kDa que cliva as duas fitas de DNA durante a catálise, necessitando da presença do Mg²⁺ e a ligação de ATP para exercer sua atividade. O dímero consiste em duas estruturas monoméricas, cada uma constituída por um subfragmento A', subfragmento B' e o domínio ATPase. O subfragmento A' contém no sítio ativo, a tirosina 782, que pode se ligar ao DNA, requerendo a conformação dimérica para ligar covalentemente ambas as cadeias do DNA (CHHATRIWALA; JAFRI; SALGIA, 2006; BRANCO et al., 2008).

A Topo II possui duas isoformas, α e a β , e é responsável pela quebra da fita dupla de DNA levando a eventos como liberação da fita de DNA enovelada, transcrição, condensação dos cromossomos e recombinação (MECZES et al., 2008; WENDORFF et al., 2012). Essas duas isoformas diferem no seu padrão de expressão, sendo que a Topo II- α é altamente expressa em células em proliferação e pluripotentes, enquanto que a Topo II- β é encontrada em células pós-mitóticas e terminalmente diferenciadas, sendo importante para a sobrevivência de algumas células neurais. O nível de expressão de TOPO II- α varia durante a progressão do ciclo celular, tendo níveis mais baixos observados na fase G1, crescimento celular, seguido por um aumento constante tendo o pico nas fases G2 e M, fases de crescimento celular e mitótica, respectivamente. Os níveis de expressão de Topo II- β variam menos do que a Topo II- α ao longo do ciclo celular e permanecem constantes ou diminuem (DRAKE et al., 1989; GOSWAMI; ROTI ROTI; HUNT, 1996; NITISS, 2009; JACOBSEN et al., 2016).

Visto a importância da topoisomerase para a manutenção celular e por apresentarem uma maior expressão em células malignas quando comparadas às normais, estas enzimas tem sido um eficiente alvo na busca de inibidores como estratégia para o tratamento do câncer. Assim, alguns exemplos de inibidores encontram-se ilustrados na figura 4.

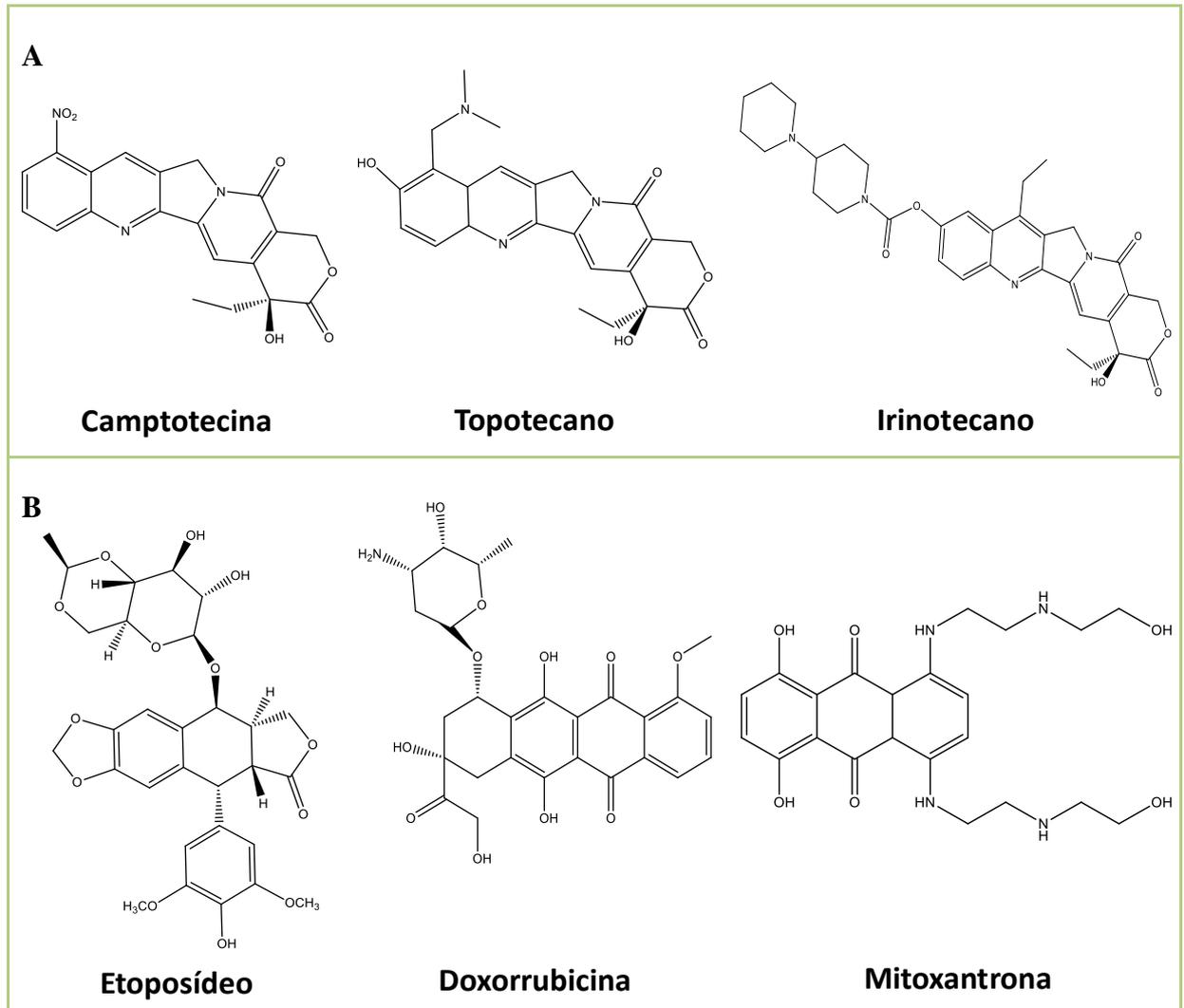


Figura 4. Inibidores da topoisomerase I (A) e da topoisomerase II (B).

2.2. Produtos naturais e o câncer

A utilização de produtos naturais no tratamento e prevenção de doenças data muitos anos e tem sido uma importante área para a descoberta de novos fármacos, sendo fonte para cerca de 60% dos agentes anticâncer (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011; AGBARYA et al., 2014; TAYLOR; JABBARZADEH, 2017).

Diversos compostos extraídos de produtos naturais vêm sendo estudado quanto às suas atividades antitumorais, sendo irrefutável a prevalência de moléculas derivadas de plantas com esta atividade. Mais de 3.000 espécies de plantas já foram utilizadas em

terapêuticas modernas contra o câncer, e cerca de 85 compostos derivados de produtos naturais já foram testados e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos até o ano de 2014 (BUTLER et al., 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016; PALLER; DENMEADE; CARDUCCI, 2016).

Frente a esses dados, a indústria farmacêutica tem reconsiderado o potencial dos produtos naturais em oncologia nos últimos 15 anos e, com isso, diversas abordagens têm sido utilizadas com o intuito de disponibilizar agentes anticâncer naturais e derivados, principalmente em busca de tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que levem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença (BRANDÃO et al., 2010; LEE et al., 2016).

Entre as substâncias de origem natural que fazem parte do arsenal terapêutico contra o câncer, e um dos exemplos mais importantes, são os alcaloides vincristina e vimblastina, principais compostos da *Catharanthus roseus*, conhecida como Vinca, que foram os primeiros compostos de origem vegetal introduzidos na clínica (CRAGG; PEZZUTO, 2016). Outra importante descoberta foi do etoposídeo e o teniposídeo, derivados semissintéticos de uma substância presentes em espécies do gênero *Podophyllum spp.* (podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica), que já era utilizada por povos indígenas para o tratamento de verrugas e câncer de pele, que posteriormente foram inseridos na terapia do câncer após a constatação de sua atividade (MANN, 2002; ARDALANI; AVAN; GHAYOUR-MOBARHAN, 2017).

Assim, estas descobertas encorajaram o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) a realizar o *screening* para agentes anticancerígenos, onde foram avaliados cerca de 35.000 amostras vegetais, permitindo a descoberta do paclitaxel, inicialmente isolado das cascas de *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt, e posteriormente se tornou um *blockbuster* de vendas, com vendas anuais de mais de 1 bilhão de dólares, levando a extensos

estudos sobre a síntese de análogos, como por exemplo o docetaxel e cabazitaxel (NEWMAN; CRAGG, 2016; TAYLOR; JABBARZADEH, 2017).

Muitos produtos naturais, como por exemplo, a genisteína, curcumina, resveratrol e o licopeno podem interferir em vias de sinalização celular, tais como a NF- κ B, Akt, MAPK, Wnt, Notch e p53 (SARKAR et al., 2009). Além disso, podem modular múltiplos alvos moleculares que são frequentemente desregulados no câncer, e assim poderiam auxiliar na redução da resistência de células neoplásicas a fármacos de um único alvo. Embora a apoptose seja o tipo mais conhecido e dominante de morte celular induzida por medicamentos naturais e tradicionais, produtos naturais também podem induzir modos alternativos de morte celular, como a paraptose (AHMAD; SAKR; RAHMAN, 2012; LEE et al., 2016; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Alguns exemplos de substâncias com atividade anticâncer obtidos de origem vegetal estão ilustrados na figura 5.

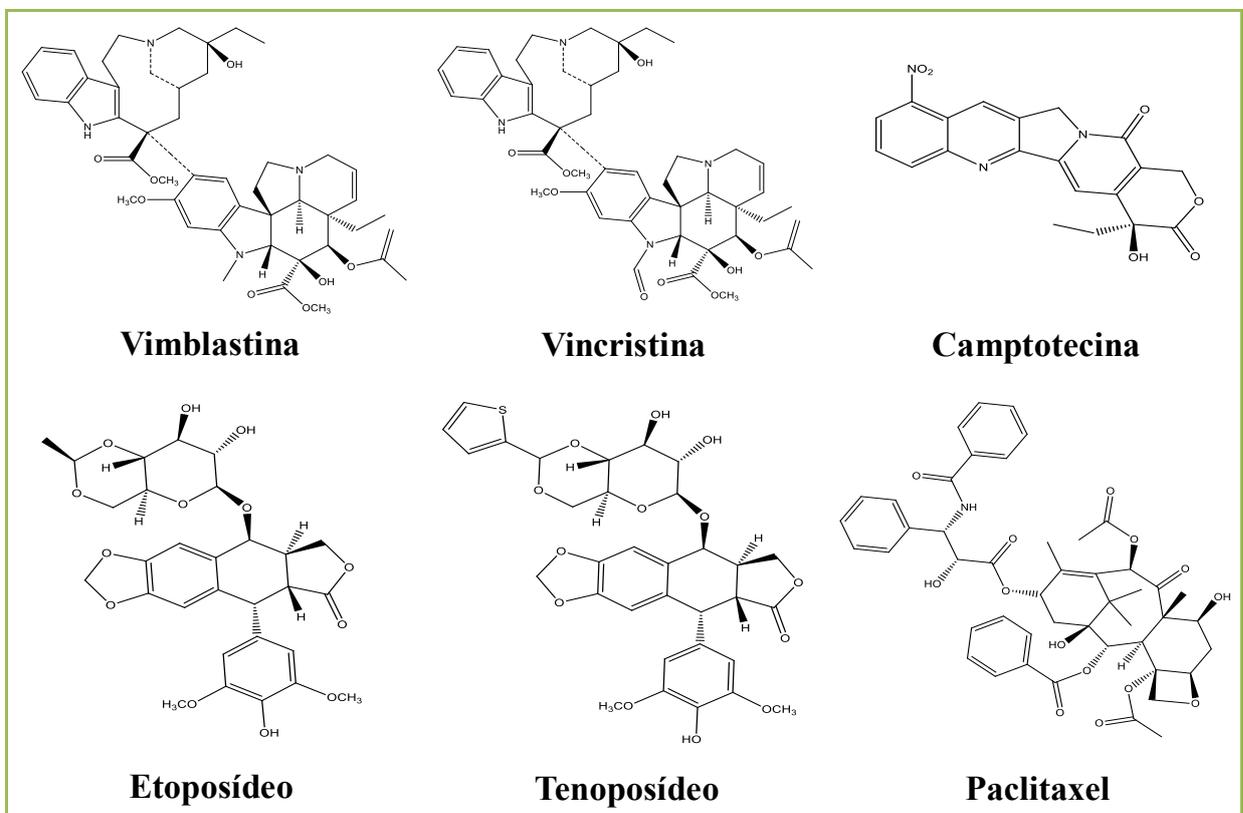


Figura 5. Produtos naturais de origem vegetal com atividade anticâncer.

Além disso, os compostos de origem natural possuem a habilidade de induzir a parada do ciclo celular e podem também reparar os danos no DNA ocasionados por radicais livres. Existe uma gama de metabólitos recentemente descobertos que possuem a capacidade de inibir a ação das enzimas topoisomerases e atuam como agentes anticancerígenos promissores, por exemplo, a eribraedina C, albanol A, lameralina D e a miricetina (JAIN; MAJUMDER; ROYCHOUDHURY, 2017). Estes compostos podem ser obtidos por meio de isolamento biodirecionado a partir do estudo da atividade biológica de extratos vegetais, por meio da modificação estrutural racional baseada na estrutura química de fármacos, bem como por síntese de análogos (DHOLWANI et al., 2008; BAIKAR; MALPATHAK, 2010).

Na busca por compostos de origem vegetal com potencial anticâncer, os compostos fenólicos têm se destacado. Várias atividades biológicas de compostos fenólicos como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimutagênica, contribuem para a indução da apoptose, bloqueando o ciclo celular, regulando o metabolismo carcinogênico, inibindo a ligação e adesão celular, migração, proliferação ou diferenciação e bloqueando as vias de sinalização (HUANG; CAI; ZHANG, 2009; ROSA et al., 2016).

As cumarinas compreendem uma vasta classe de compostos encontrados ao longo do reino vegetal com uma gama de atividades biológicas, possuindo uma estrutura de benzeno fundido ao anel de α -pirano (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017). A umbeliferona (figura 6) é um hidroxycumarina que vem sendo amplamente estudada, apresentando atividade citotóxica frente a diversas linhagens, como linhagens de células de adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma de cólon (LS180), leucemia mieloide crônica (K562) e hepatocarcinoma (HepG2) (MUTHU; SELVARAJ; VAIYAPURI, 2016; YU; HU; ZHANG, 2015).

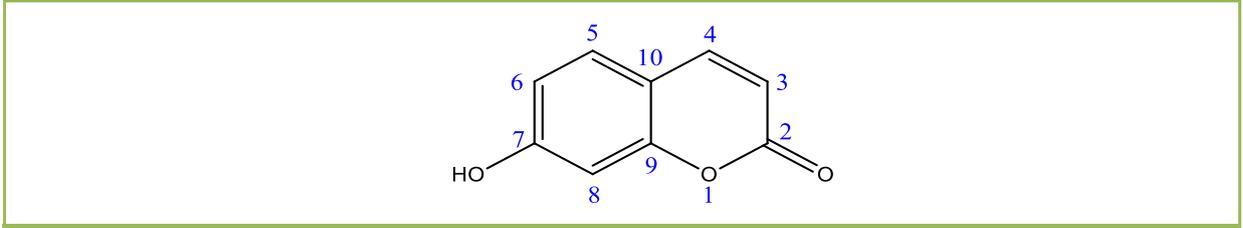


Figura 6. Estrutura química da umbeliferona

Além de induzir a apoptose por meio da interrupção do ciclo celular e da fragmentação do DNA de modo concentração-dependente na linhagem HepG2, a umbeliferona atua modificando o pH intracelular e a funcionalidade do canal CAIX (PUECH et al., 2015). A fim de potencializar seu efeito, derivados foram obtidos e testados quanto a atividade antiproliferativa na linhagem MCF7 (carcinoma de mama humano) e 22Rv1 (carcinoma de próstata humano), onde se obteve uma CI_{50} de 0,47 μM e 0,93 μM , respectivamente, de um derivado mais ativo que a própria umbeliferona (KANDIL; WESTWELL; MCGUIGAN, 2016). Em outro estudo realizado com derivados da umbeliferona, foi observada a inibição da proliferação e migração em células de câncer de laringe (KIELBUS et al., 2013).

Por sua vez, as quinonas, que são estruturas comuns a muitos produtos naturais, estão associadas a atividades anticancerígenas, antibacterianas, antimaláricas, antifúngicas e tripanomicidas (EL-NAJJAR et al., 2011). Seu potencial na terapêutica no câncer conhecido há mais de quatro décadas, desde a publicação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos em 1974 de um teste de avaliação de quinonas sintéticas e naturais onde foi verificada sua atividade antitumoral.

Diversos agentes anticâncer possuem um núcleo quinolínico, o que torna as naftoquinonas compostos de grande interesse nesse contexto (CRUZ, 2013; ESTEVES-SOUZA et al., 2007). A citotoxicidade das naftoquinonas em diversas linhagens sugere que exista uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada com outros

fatores estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003)

O lapachol (figura 7) uma naftoquinona encontrada em várias espécies vegetais, possui atividade antineoplásica amplamente estudada, onde os mecanismos elucidados são a interação com os ácidos nucleicos do DNA e atividade anti-metastática. Assim como o lapachol, seus derivados também tem apresentado potencial anticâncer. Derivados semissintéticos do lapachol demonstraram atividade citotóxica com CI_{50} abaixo de 10 μM frente a várias linhagens, como as de células de leucemia promielocítica (HL-60), leucemia linfoblástica (MOLT-4), carcinoma colorretal (HCT-116), adenocarcinoma de ovário (OVCAR-3 e 8) e melanoma (MDA-MB 435). Também apresentaram atividade antiproliferativa frente a várias linhagens cancerígenas, como as células de câncer de esôfago (WHCO1), glioblastoma (U373), adenocarcinoma alveolar (A549), oligodendroglioma anaplástico (Hs683), melanoma (SKMEL-28), adenocarcinoma de próstata (PC3) e câncer de colorretal (LoVo), além de inibirem a topoisomerase I e II, e induzirem a apoptose (COSTA et al., 2016; FIORITO et al., 2014; HUSSAIN et al., 2007; SUNASSEE et al., 2013; VIEIRA et al., 2015; ZHANG; QU; NIU, 2016).

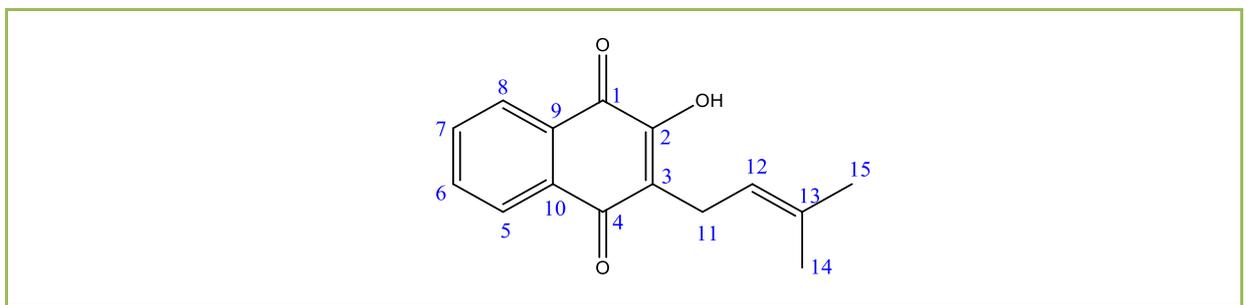


Figura 7. Estrutura química do lapachol

A citotoxicidade das naftoquinonas em diversas linhagens sugere que exista uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada com outros fatores

estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Assim tanto a umbeliferona quanto o lapachol, devido suas atividades comprovadas e particularidades na estrutura química, podem ser utilizados como compostos líderes para a obtenção de derivados por rotas sintéticas.

2.3. Planejamento de fármacos e métodos computacionais

A busca do tratamento e da cura de doenças que afligem o ser humano é tão antiga quanto a sua própria história. No decorrer do tempo, diversas metodologias foram utilizadas com o intuito de atingir este objetivo, mas foi somente no século XIX com os avanços tecnológicos e a síntese do ácido acetilsalicílico que se iniciou uma nova fase na descoberta de fármacos, onde o desenvolvimento da química orgânica sintética possibilitou uma nova forma de obtenção de fármacos (ALMEIDA, 2011; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A chamada química medicinal caracteriza-se por seu relevante caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras, aplicadas à descoberta, ao planejamento, à identificação, à preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

O desenvolvimento de moléculas que possam ser protótipos de fármacos eficientes e seguros, com menores efeitos adversos que os disponíveis no mercado e que possam ser administrados por via oral com custos reduzidos para o tratamento das mais diversas patologias, têm motivado o estudo de novas estruturas químicas por meio de ferramentas da química medicinal, visando a otimização de tempo recurso (NEUENFELDT, 2015). A

introdução de um substituinte pode interferir em várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como a hidrofobicidade, densidade eletrônica e conformação estrutural. Assim, a substituição de um átomo de hidrogênio por halogênios, grupos alquila, nitro, ciano, carboxilato e outros, pode modificar profundamente a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula (MENDON et al., 2007).

A utilização de métodos computacionais pode otimizar a escolha das modificações a serem aplicadas, e, auxiliando na redução da quantidade de moléculas avaliadas, bem como maximizando as chances de sucesso na identificação de compostos com potencial biológico, pois permitem a racionalização dos mecanismos de ação das novas moléculas. Assim, o planejamento de novos fármacos auxiliado por computador (*Computer-Aided Drug Design*, CADD) pode ser empregado para melhorar a eficiência do processo de descoberta, reduzindo em até 50% o custo e tempo da pesquisa de um novo agente terapêutico (figura 8) (AVILA, 2010; MODA, 2007; MONTANARI, 2000).



Figura 8. Planejamento de fármacos baseado em ferramentas computacionais a partir da estrutura do ligante e do receptor.

2.3.1. Ancoragem Molecular

Muitas são as técnicas de CADD disponíveis, e a escolha de uma delas depende das informações estruturais disponíveis da molécula alvo e do ligante. A ancoragem molecular é uma das metodologias mais utilizadas no desenho de fármacos assistido por computador, tendo sido predominantemente aplicado na identificação de protótipos e predição do modo de ligação (BARREIRO et al., 1997; LILL; DANIELSON, 2011; PASSAMANI, 2009).

A ancoragem molecular, *docking* molecular ou acoplamento molecular é uma técnica de modelagem molecular que objetiva analisar as condições estruturais e energéticas para uma interação favorável levando a formação de um complexo estável entre um determinado alvo biológico e uma molécula, permitindo assim uma estimativa da atividade do ligante (FERREIRA, 2013; RABELLO, 2016).

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

O sucesso na predição da estrutura tridimensional do complexo receptor-ligante por ancoragem molecular possui duas grandes aplicações práticas. A primeira é a identificação de possíveis sítios preferenciais de ligação e a posterior indicação de modificações específicas no ligante, de tal modo a se obter um maior grau de afinidade e/ou especificidade com relação ao receptor. A segunda é a utilização da geometria obtida como ponto de partida para a aplicação de métodos computacionais mais sofisticados, visando quantificar a energia livre de ligação do complexo receptor-ligante. Os programas de ancoragem molecular executam estas tarefas

através de um processo cíclico, no qual a conformação do ligante é avaliada por funções de pontuação específicas. Este processo é realizado recursivamente até convergir para uma solução de energia mínima (FERREIRA et al., 2015; TERAMOTO; FUKUNISHI, 2007).

Para que isso ocorra, os programas de ancoragem molecular são formados essencialmente por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e de uma função de pontuação. O algoritmo de busca é empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, permitindo explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante no sítio receptor da proteína (KITCHEN et al., 2004).

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

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

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

A função de pontuação é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação. As funções de pontuação podem ser divididas em funções de pontuação baseadas em campo de força, empíricas e baseadas no conhecimento, que permitem classificar os melhores modos de ligação (orientação e conformacional) do ligante no sítio receptor (MENG et al., 2011; VERDONK et al., 2003), permitindo uma maior probabilidade de certeza dos resultados obtidos.

Assim, a utilização de ferramentas computacionais acopladas aos estudos de planejamento e triagem de moléculas tem se mostrado uma ferramenta barata e simples, que permite avaliar prováveis moléculas bioativas e aumentar a probabilidade da obtenção de moléculas promissoras. Nesse sentido, o presente trabalho teve o objetivo de planejar e avaliar *in silico* derivados dos compostos naturais lapachol e umbeliferona, com o intuito de se obter moléculas com potencial atividade anticâncer visando a inibição da topoisomerase, sintetizando as moléculas melhor classificadas na análise *in silico* para os testes de citotoxicidade contra células tumorais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar o planejamento estrutural, a síntese e a avaliação do potencial anticâncer *in vitro* de derivados de lapachol e umbeliferona.

3.2. Objetivos específicos

- Planejar compostos derivados da umbeliferona e lapachol;
- Investigar a possível inibição da topoisomerase I, II alfa e II beta pelos derivados *in silico*;
- Predizer as propriedades moleculares e toxicológicas dos derivados *in silico*;
- Sintetizar e purificar os derivados classificados na análise *in silico*;
- Avaliar o potencial citotóxico em células neoplásicas e não neoplásica;
- Determinar a genotoxicidade em linhagem celular neoplásica e não neoplásica;
- Avaliar a expressão gênica da topoisomerase nas linhagens de neoplásicas.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

O desenvolvimento das atividades ocorreu conforme mostrado na figura 9.

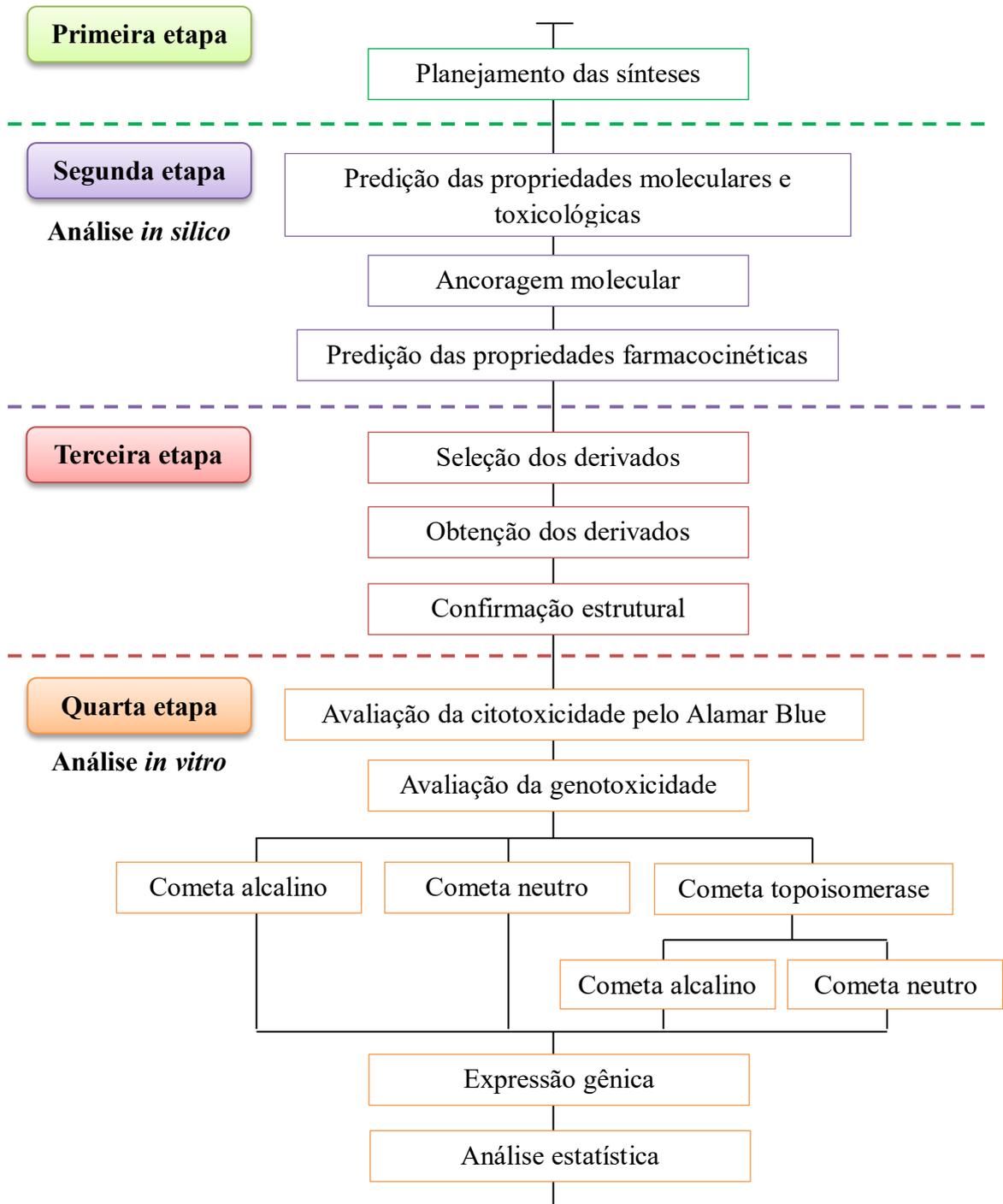


Figura 9. Delineamento experimental das atividades desenvolvidas.

4.2. Planejamento dos derivados

As séries foram planejadas baseadas nas características químicas e estruturais de compostos antineoplásicos já conhecidos e de derivados similares com atividade anticâncer, bem como as características da estrutura tridimensional dos receptores, formação de heterociclos e presença de grupamentos nitrogenados de modo que fossem obtidos compostos de baixa, média e alta polaridade com grande interação com as moléculas alvos. Além disso, foi dada prioridade aos derivados passíveis de serem obtidos por meio de reações químicas com poucas etapas utilizando temperaturas brandas e viáveis para aplicação em larga escala.

4.3. Análise dos parâmetros moleculares, toxicológicos e farmacocinéticos *in silico*

A predição dos parâmetros toxicológicos foi realizada utilizando o *software* Osiris Property Explorer® (Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Suíça) onde foram avaliados os riscos de efeitos mutagênicos, tumorigênicos, efeitos irritantes e efeitos sobre o sistema reprodutor, além de avaliar o perfil *drug-likeness* e *drug-score*.

As propriedades moleculares foram calculadas no *software* Molinspiration Online Property®, onde foi possível calcular os parâmetros: coeficiente de partição (log P), área de superfície polar, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio.

Para a análise das propriedades citadas acima, adotou-se os critérios da regra dos cinco de Lipinski que estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de absorção oral, onde moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas com a absorção (LIPINSKI, 2004). Os parâmetros estão dispostos no quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros avaliados na regra dos cinco de Lipinski.

Propriedade molecular	Parâmetro
Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio	≤ 10
Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio	≤ 5
Massa molecular	≤ 500 Da
Coefficiente de partição	≤ 5
Área de superfície polar	≤ 140 Å ²

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados para os derivados ativos utilizando o *software* PreADMET®, que se baseia em processos de comparação estrutural mistos e modelos de Relação estrutura e atividade (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) utilizando bancos de dados de compostos submetidos a testes pré-clínicos *in vitro* e/ou *in vivo* relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção (LEE et al., 2004).

4.4. Seleção dos alvos biológicos

Os alvos biológicos para o estudo *in silico* foram as topoisomerases humanas I, II alfa e II beta que possuem a estrutura cristalográfica disponível no banco de dados de proteínas (PDB), onde foram utilizadas as estruturas com os códigos 1K4T, 1ZXN e 3QX3, que possuem resolução de 2,1 Å, 2,51 Å e 2,16 Å, respectivamente.

4.5. Preparo dos ligantes

Todas as propostas de derivados do lapachol e umbeliferona tiveram suas estruturas desenhadas no formato bidimensional no *software* Chemdraw ultra® versão 12.0 e salvas no formato (.mol).

No *software* Spartan'10® foi realizado uma busca sistemática pelo método de mecânica molecular utilizando o Campo de Força de Mecânica Molecular (*Mechanics*

Molecular Force Field, MMFF) para a análise conformacional das moléculas para a determinação do conformero mais estável, que posteriormente, foi otimizado geometricamente no vácuo, sem qualquer restrição geométrica, pelo método semiempírico RM1 (*Recife Model 1*).

Em seguida, as estruturas otimizadas foram submetidas ao cálculo de energia pelo método de Hartree-Fock utilizando o conjunto de base 6-31G*, que é um conjunto de base 6-31G com função de polarização para átomos pesados, isto é, átomos diferentes de hidrogênio. Após a conversão das estruturas tridimensionais, as ligações σ dos ligantes foram mantidas como flexíveis e as ligações π foram mantidas fixas.

4.6. Preparo do alvo

As estruturas das proteínas foram obtidas no formato (.pdb) do banco RCSB *Protein Data Bank* (PDB), e estas foram analisadas utilizando o *software* PyMOL® com intuito de permitir a visualização e retirada da água cristalina da estrutura, do ligante nativo e de outros reagentes, como o glicerol, que tenham sido utilizados no processo de cristalização da proteína para que estas fossem utilizadas na análise de ancoragem molecular.

Foram adicionados os hidrogênios e cargas às enzimas, pois estas podem apresentar um número de hidrogênios incompatíveis, e foram admitidas como sendo rígidas, sendo escolhidos as estruturas alvos com um inibidor ou substrato ligado, pois esta é forçada a permanecer em uma conformação que é mais relevante à ligação dos compostos (COSCONATI et al., 2010).

4.7. Ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando o *software* Autodock Vina®. O receptor foi mantido rígido, enquanto que os ligantes foram flexíveis para girar e explorar as poses mais prováveis. Todas as ligações torcionais dos ligantes foram liberadas pelo módulo ligante no *software* AutoDock Tools®. O *Grid*, grade que delimita o sítio ativo, foi posicionado na região ativa do receptor, englobando todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas, ou, que tivessem alguma relação com sua atividade, de modo a proporcionar uma região de busca conformacional adequada para a realização da ancoragem molecular (Quadro 3). Os parâmetros foram salvos e então criado um arquivo de texto contendo os dados do receptor, ligante e a coordenadas e dimensões do *grid* para a realização da ancoragem molecular, mantendo-se o intervalo de busca entre os pontos do *grid* fixados em 1 Å, e aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano para a análise das interações.

Quadro 3. Aminoácidos selecionados para a construção do *grid box*.

Enzima	Aminoácidos	Referências
Topoisomerase I	Asparagina 722, glicina 717, tirosina 729, histidina 632, arginina 364, glicina 363, fenilalanina 361 e arginina 362	Kumar e Bora (2014); Lauria, Ippolito e Almerico (2007); Staker al. (2002)
Topoisomerase II- α	Asparagina 91, serina 148, serina 149, asparagina 150, ácido glutâmico 87, glicina 164, asparagina 120, lisina 168, alanina 167 e lisina 378	Wei et al. (2005)
Topoisomerase II- β	Metionina 782, glutamina 778, arginina 503, leucina 502, glicina 478, aspartato 479 e tirosina 821	Ju et al. (2006); Kumar e Bora (2014)

Os resultados gerados foram visualizados no AutoDock Tools® e as interações foram avaliadas em termos de energia mínima de ligação (Kcal/mol), número de ligações de

hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e ligante. As imagens 2D dos resultados da ancoragem molecular foram geradas utilizando o *software* Discovery Studio Visualizer® 4.0.

4.8. Obtenção dos derivados do lapachol e da umbeliferona

4.8.1. Síntese da LP04

O derivado LP04 foi obtido por meio da utilização da metodologia desenvolvida por Hecker (1985), onde a mistura contendo 2 mmol de lapachol, 1 mmol de cloreto de paládio, 1 mmol de cloreto de cobre e 10 mL de metanol foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por 48 horas. O derivado foi extraído com acetato de etila e purificado em coluna cromatográfica usando acetato de etila e hexano como fase móvel (figura 10).

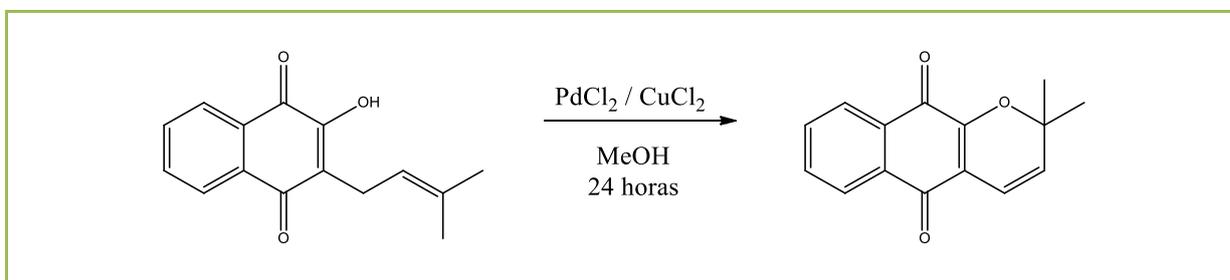


Figura 10. Esquema da síntese do derivado LP04.

4.8.2. Síntese da LP17

O derivado LP17 foi obtido conforme a metodologia de Pires e colaboradores (2011), onde se utilizou 1 mmol de lapachol, 2,5 equivalente de ácido metacloroperbenzoico (*m*-CPBA) e 5 mL diclorometano. A mistura reacional foi mantida em agitação por 48 horas a 20° C. Após este período, lavou-se com 20 mL de água basificada e o derivado LP17 foi

purificado por cromatografia em coluna utilizando-se diclorometano e hexano como fase móvel (figura 11).

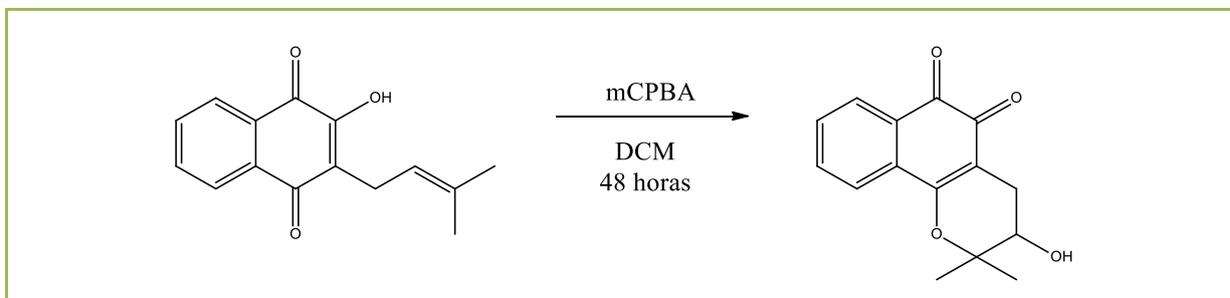


Figura 11. Esquema da síntese do derivado LP17.

4.8.3. Síntese da LP18

O derivado LP18 foi obtido conforme metodologia de com Souza e colaboradores (2008), onde se utilizou 2 mmol de lapachol, 5 mL de anidrido acético e foi adicionado gota-a-gota 1 mL de ácido sulfúrico, mantendo a reação a 30° C por 2 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com éter etílico (figura 12).

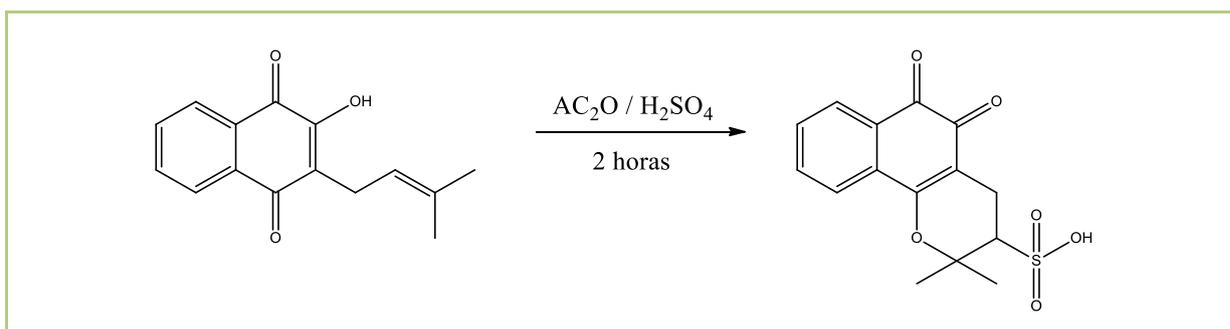


Figura 12. Esquema da síntese do derivado LP18.

4.8.4. Síntese da LP23 e LP24

Os derivados LP23 e LP24 foram obtidos por meio de reação de esterificação conforme metodologia de Farshori e colaboradores (2010), onde a mistura reacional contendo 1 mmol de lapachol, 1 mmol do ácido orgânico correspondente, ácido 3,5-dinitrobenzoico

(LP23) e ácido salicílico (LP24), 1 mmol de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), uma ponta de espátula do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e 10 mL de diclorometano foi mantida em temperatura ambiente por 48 horas. Após este tempo, lavou-se com água destilada (20 mL), ácido acético 5% (20 mL) e novamente com água destilada (20 mL). Os derivados obtidos foram purificados por meio de coluna cromatográfica utilizando acetato de etila e hexano como fase móvel (figura 13).

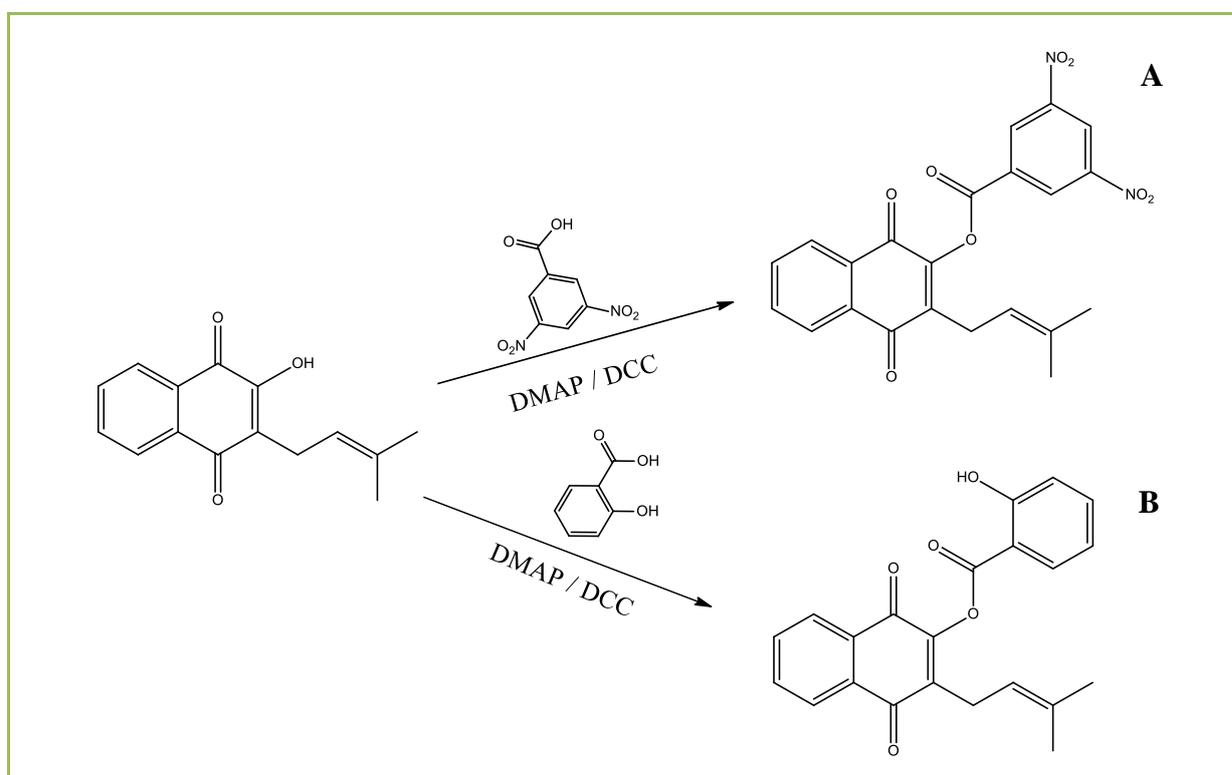


Figura 13. Esquema da síntese do derivado LP23 (A) e LP24 (B).

4.8.5. Síntese da LP20 e LP25

A obtenção do derivado LP20 foi realizada a partir da β -lapachona, sendo obtida por meio da metodologia de Barbosa e Diniz Neto (2013). Onde 2 mmol de lapachol foi mantida em agitação a 0° C com 5 mL de ácido sulfúrico por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 50 mL de água e houve a precipitação da β -lapachona, que foi recristalizada com etanol.

A obtenção da α -lapachona foi de acordo com Souza e colaboradores (2008), onde a mistura contendo 2 mmol de lapachol, 1 mL de ácido acético e 5 mL de ácido clorídrico foi mantido em refluxo a 100° C por 2 horas. Após este período, foi adicionado 50 mL de água gelada e houve a precipitação da α -lapachona, que foi recristalizada com etanol.

Para obter a LP20, utilizou-se a metodologia de Fukumoto e colaboradores (2002), onde a mistura contendo 100 mg da β -lapachona, 1 mL de água, 1 mL de ácido clorídrico, 200 mg de aminoguanidina e 10 mL de etanol foram mantidas em agitação em refluxo por 18 horas. Para a síntese da LP25, utilizou o mesmo protocolo e 100 mg da α -lapachona.

Após o tempo reacional, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em água e lavado com acetato de etila (2 x 20 mL). À solução foi adicionada solução de bicarbonato de sódio e extraído com acetato de etila (2x20 mL), em seguida o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em etanol e lavou-se com 10 mL de solução de HCl 1N e o solvente foi evaporado (figura 14).

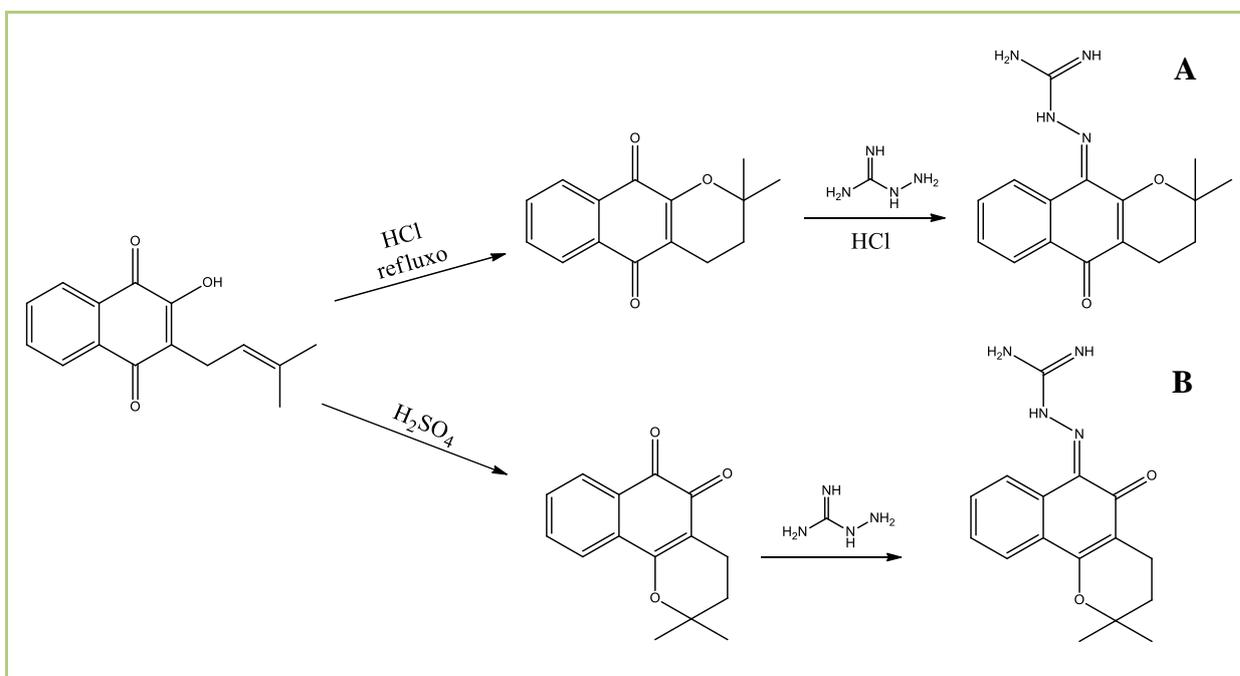


Figura 14. Esquema da síntese do derivado LP20 (B) e LP25 (A).

4.8.6. Síntese da UMB22 e UMB24

Para a realização da síntese dos derivados UMB22 e UMB24 utilizou-se a metodologia de Pingaew e colaboradores (2014). Para a obtenção do alcino, na síntese da UMB22 utilizou-se 1 mmol da umbeliferona, 1,5 mmol de brometo de propargila e 1,5 mmol do carbonato de potássio anidro solubilizados em 10 mL de acetona seca. A mistura foi mantida em refluxo por 24 horas e após este período, o solvente foi removido e ressuspensionado em clorofórmio (15 mL), em seguida, lavou-se com 25 mL de água destilada, 25 mL de solução saturada de cloreto de sódio e secou-se com sulfato de sódio anidro (figura 15).

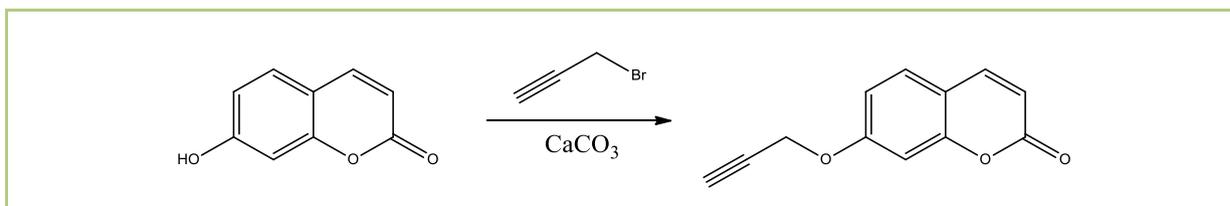


Figura 15. Esquema da obtenção do alcino a partir da umbeliferona.

Para a obtenção do alcino a partir do ácido salicílico para a síntese da UMB24, utilizou-se a mesma metodologia descrita acima (figura 16).

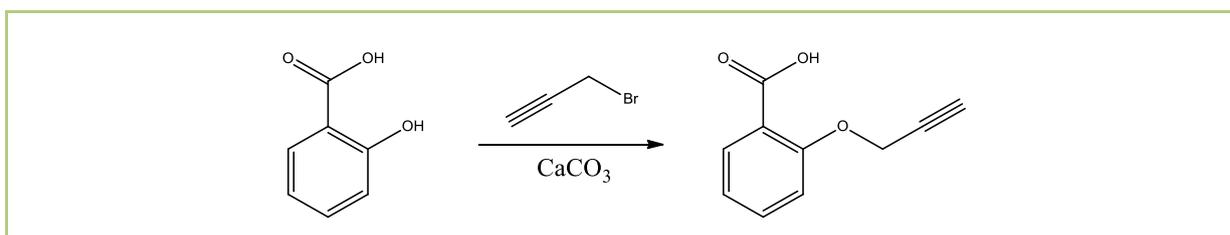


Figura 16. Esquema da obtenção do alcino a partir do ácido salicílico.

A obtenção da azida para a síntese da UMB24, utilizou-se 3 mmol da 2,4-dinitrofenilhidrazina em 3 mL de ácido acético e 3 mL de ácido clorídrico a 0 °C, em seguida adicionou-se 5 mL da solução aquosa contendo 9 mmol de nitrito de sódio. Após 15 minutos, sob agitação, adicionou-se, gota-a-gota, 5 mL da solução aquosa contendo 9 mmol da azida de

sódio. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida o precipitado foi filtrado e lavou-se com água gelada e recristalizou-se em metanol (figura 17).

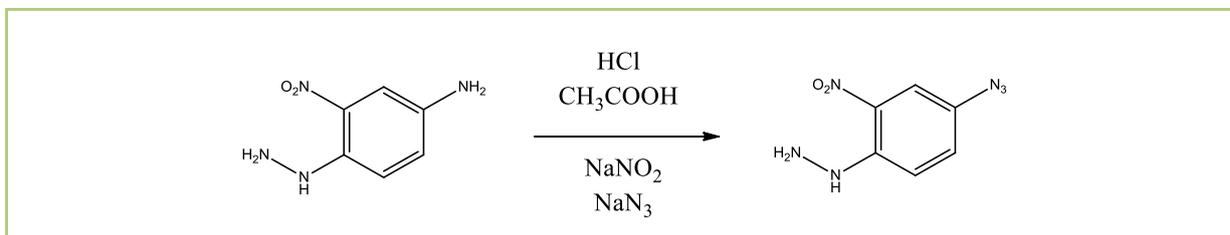


Figura 17. Esquema da obtenção da azida a partir do 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Para a síntese da UMB22, foi necessário introduzir e reduzir o grupo nitro para amina, a nitração da umbeliferona foi realizada conforme metodologia de Imamura e Baptistella (2000), utilizando-se 1,5 mmol da umbeliferona. Após o processo de nitração, procedeu-se a redução do grupo nitro utilizando-se 1 mmol do produto anterior solubilizado em 10 mL de etanol e 0,5 mL de água, 3 mmol de ferro metálico e 1 mmol de cloreto de cálcio, mantendo-se a reação a 60° C por 30 minutos. Após o término da reação, a mesma foi extraída com acetato de etila (20 mL), lavada com água (10 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Em seguida, utilizou-se a mesma metodologia para a obtenção da azida citada acima (figura 18).

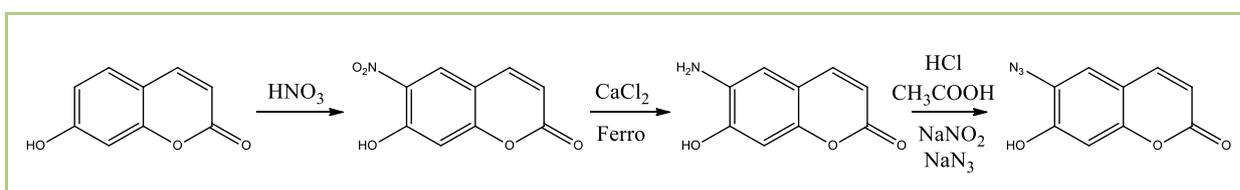


Figura 18. Esquema da obtenção da azida a partir da umbeliferona.

Para a obtenção do triazol, utilizou-se 0,2 mmol da azida e 0,22 mmol do alcino em terc-butanol: água (3:3), 0,22 mmol de sulfato de cobre e 0,5 mmol de ascorbato de sódio. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 2 horas e extraídas com diclorometano

(figura 19). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com 20 mL de água e seca com sulfato de sódio anidro.

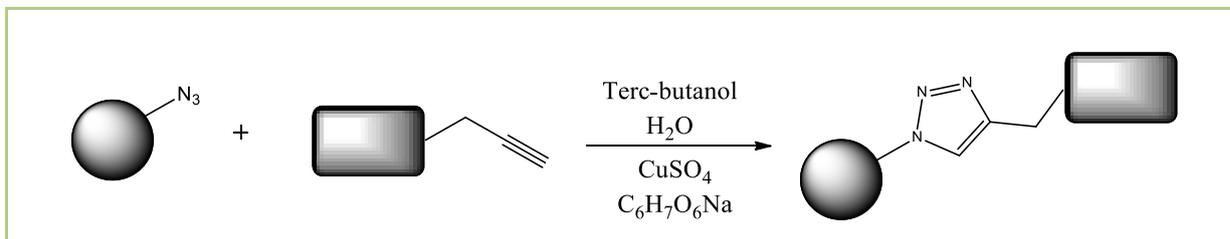


Figura 19. Esquema da obtenção do triazol por meio de reação click.

4.8.7. Síntese da UMB25

A UMB25 foi obtida por meio da reação de fluoração entre o dietilamino trifluoreto de enxofre (DAST) e a umbeliferona conforme metodologia de Boechat, Pinto e Bastos (2015). Onde 1 mmol da umbeliferona reagiu com 1 mmol de DAST solubilizadas em 10 mL de diclorometano por 24 horas em temperatura ambiente (figura 20).

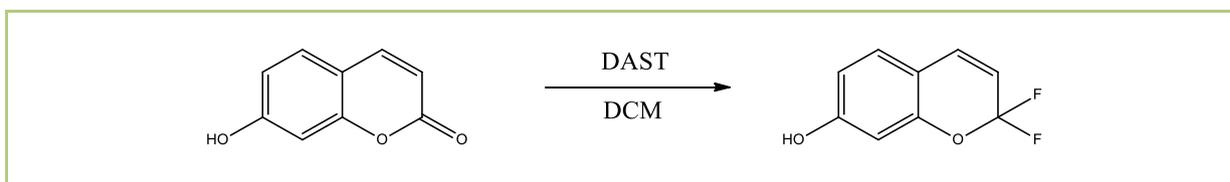


Figura 20. Esquema da síntese do derivado UMB25.

4.9. Confirmação estrutural

A identificação da estrutura química dos derivados de lapachol e umbeliferona foi realizada por meio da espectrometria de massas (ESI-MS/MS-MS) e da ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio nos Laboratórios de espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas.

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), operando com fonte de elétron spray (ESI). Já os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no equipamento modelo *Bruker Ascend* (500 MHz). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.10. Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas em garrafas de polipropileno conforme os critérios estabelecidos pelos guias de cultura celular, que indicam o uso de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) acrescido de bicarbonato de sódio (5,6%), HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico) (25 mM), estreptomicina (0,005 mg/L), penicilina (0,001 U/L) e soro fetal bovino (10-20%) também estéril, além de incubação a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 e outros reagentes complementares, como tripsina e tampão fosfato (FRESHNEY; STACEY; AUERBACH, 2007; PROTEOMICS, 2007).

O cultivo celular e as análises *in vitro* foram realizadas no laboratório BIOPHAR (UFAM), onde se seguiu as orientações estabelecidas neste laboratório para o cultivo das linhagens celulares, que indica a observação diária do crescimento celular em microscópio invertido, além de realização de repiques sempre que necessário para meio de cultura novo em uma concentração de $0,5 - 1,0 \times 10^4/\text{mL}$ (LEAL et al, 2009).

4.11. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada pelo ensaio do Alamar Blue® conforme metodologia descrita por Ahmed e seus colaboradores (1994) para a triagem

citotóxica das substâncias sintetizadas em diferentes linhagens: melanoma humano (SK-MEL 19, 28 e 103), carcinoma colorretal humano (HCT 116), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), sarcoma uterino humano resistente a doxorrubicina (MESA/DX5) e fibroblastos humanos (MRC-5).

As células foram semeadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços, onde foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células foram tratadas com as substâncias na concentração de $20 \mu\text{M}$. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) (0,1%), e como controle positivo a Doxorrubicina na concentração de $5,0 \mu\text{M}$. Após o período de 72 horas, foi adicionado $10 \mu\text{L}$ do Alamar blue (0,02%) e posteriormente foi realizada a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm.

As substâncias que apresentaram uma atividade citotóxica em 72 horas, foram submetidas a análise nos tempos de 24, 48 e 72 horas com concentrações que variaram de $0,675$ a $20 \mu\text{M}$ (triplicata).

4.12. Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa

O teste do cometa alcalino foi realizado de acordo com Singh e colaboradores (1988). Neste teste foram utilizados as linhagens celulares MRC-5, HCT 116 e MCF-7 na densidade celular 6×10^4 em placa de 24 poços. A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 24h. Após esse tempo, as células foram tratadas com os compostos nas concentrações de 7,5, 15 e $30 \mu\text{M}$ e Doxorrubicina ($5 \mu\text{M}$) como controle positivo, durante 3 horas.

A partir de cada tratamento, foi retirado o volume celular de $10 \mu\text{L}$ e adicionado a $110 \mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão, e então colocadas em lâminas de microscopia, pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram mantidas por 5

minutos a 4°C, para solidificação da agarose e em seguida incubadas em solução de lise a 4°C.

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20 V e com corrente de 300 mA. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização por 5 minutos, para retirar a alcalinidade, secas e fixadas em etanol. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Syber Green 10000x (SIGMA) diluído 1:10000 em tampão borato de EDTA 1x (TBE), sobre as lâminas.

Os procedimentos para o ensaio do cometa em pH neutro foram iguais aos realizados para o cometa alcalino, com exceção da solução de eletroforese, a qual foi preparada com acetado de sódio a 300 mM e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 e a corrida foi conduzida na ausência de luz por 20 min, a 25 V e corrente de 300 mA (WOJEWÓDZKA, BURACZEWSKA e KRUSZEWSKI, 2002).

A análise dos cometas foi realizada de acordo com tamanho e intensidade da cauda, seguindo os seguintes padrões: classe 0: sem dano, sem a cauda; classe 1: com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); classe 2: com o comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com a cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça e classe 4: desintegrado, cometa sem a cabeça definida. Para cada lamina foram contados 50 cometas.

O índice de dano (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre os números de cometa de cada classe e grau de cada cometa.

4.13. Detecção do dano no DNA induzido por inibidores da Topoisomerase

O teste do cometa foi realizado de acordo com Hazlehurst (2009). Neste teste foram plaqueadas 5×10^4 células em placa de 24 poços. A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após esse tempo, as células foram tratadas com os compostos nas

concentrações de 7,5, 15 e 30 μM e Doxorubicina (5 μM) como controle positivo, durante 3 horas.

Após o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e todo o conteúdo foi transferido para um microtubo, onde foi centrifugado a 4° C durante 5 minutos a 1200 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 μL de PBS e 1,5 mL de agarose de baixo ponto de fusão, e então depositado 100 μL da suspensão de células em lâminas de microscopia, pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal e cobertas com lamínulas, para distribuição homogênea das amostras. As lâminas foram mantidas por 3 minutos a 4°C, para solidificação da agarose.

Após a solidificação, as lâminas foram incubadas em solução de lise contendo 0,25 mg/mL de proteinase K durante 1 hora na ausência de luz. Após esse período, as lâminas foram incubadas a 37° C por um tempo adicional 16 horas. As lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese, e adicionada à solução de eletroforese, permanecendo por 1 hora, sendo renovada a solução a cada 15 minutos para permitir o desempacotamento do DNA.

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 25 V e com corrente de 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Brometo de Etídio (20g/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência.

A análise dos cometas foi realizada de acordo com tamanho e intensidade da cauda, seguindo os seguintes padrões: classe 0: sem dano, sem a cauda; classe 1: com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); classe 2: com o comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com a cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça e classe 4: desintegrado, cometa sem a cabeça definida. Sendo que para cada lâmina foram contados 50 cometas.

4.14. Expressão gênica da topoisomerase I e II

O RNA das culturas celulares foi extraído a partir de 15×10^4 células, tratadas no tempo de 18 horas com os derivados LP17, LP20 e LP25, com o reagente TRIzol Reagent®, de acordo com instruções do fabricante. A partir do RNA obtido, foi sintetizado o cDNA de acordo com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA) para converter o RNA extraído e purificado em cDNA, sendo armazenadas em freezer -20°C até sua utilização para análise.

As sequências dos genes da topoisomerase: TOP1M, TOP2A, TOP2B e o gene GAPDH, que foi usado como controle endógeno, foram enviados à empresa ThermoFisher Scientific, para o desenho e síntese dos primers. O método de detecção foi o sistema TaqMan® Gene expression assays (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) (Quadro 4).

Quadro 4. Ensaio com sonda de hidrólise TaqMan® para análise de expressão dos genes selecionados.

Gene	Ensaio TaqMan®
TOP1MT	Hs01080056_m1
TOP2A	Hs01032137_m1
TOP2B	Hs00172259_m1
GAPDH	Hs02786624_g1

A detecção da expressão dos genes por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando o aparelho ABI 7500 e kit TaqMan® Expression Master Mix, ambos da Applied Biosystems. O protocolo da reação utilizou as quantidades de reagentes descritas no quadro 5, totalizando uma reação de $25\mu\text{L}$. O protocolo de amplificação da reação constituiu-se da seguinte ciclagem: $50^\circ\text{C}/2$ minutos, $95^\circ\text{C}/10$ minuto e 50 ciclos de $95^\circ\text{C}/15$ segundos e $60^\circ\text{C}/1$ minuto.

Quadro 5. Reagentes utilizados na qPCR em tempo real.

Reagentes	Volume (μL)
Água deionizada	9,25
Tampão (TaqMan® gene expression master Mix)	12,5
TaqMan® Gene expression assay	1,25
<i>cDNA</i>	2

Após a amplificação, os fragmentos foram quantificados pela análise dos dados fluorescentes por meio do equipamento QuantStudio® 5 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

Para estabelecer o grau de expressão de cada um dos genes foi utilizado como referência o nível de expressão do gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gene de expressão constitutiva e que se presta como referência de expressão entre as diferentes amostras.

Na análise de PCR em tempo real, a quantificação foi baseada no *Cicle threshold* (CT), que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI et al., 1998). O CT é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis. Para determinar a linha de corte para a expressão gênica alterada em tecidos tumorais, o valor CT é determinado também em tecido normal.

Estabelecidos os CT de cada amostra, o cálculo do nível de expressão foi realizado através do método CT comparativo ou método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, dessa forma, o nível de expressão do gene de interesse foi relatado em relação ao do gene de referência para cada amostra:

$$\text{Expressão do Gene de Interesse} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Onde $\Delta\text{CT} = (\text{CT gene interesse}) - (\text{CT endógeno})$ para cada amostra em triplicata

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\Delta\text{CTLMC}) - (\Delta\text{CTcontrole})$$

Para que o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ fosse validado, assumiu-se que a eficiência de amplificação do gene alvo e a eficiência de amplificação do controle interno deviam ser aproximadamente iguais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Cada amostra em análise foi realizada em triplicata para a validação da técnica e dos valores de CT, de acordo com os *guidelines* internacionais para avaliação de expressão gênica por PCR em Tempo real (BUSTIN et al., 2009).

4.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism® versão 6.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear.

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) *one-way*, e *two-way* para comparação entre os grupos. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Neste trabalho, optou-se por utilizar o estudo *in silico* com o intuito de selecionar possíveis inibidores potenciais da topoisomerase, permitindo uma modificação estrutural direcionada e o aumento da probabilidade de obtenção de moléculas com potencial biológico.

Foram planejados 50 protótipos de sínteses de acordo com os reagentes disponíveis no laboratório FITOPHAR (UFAM), sendo 25 derivados do lapachol, codificados de LP01 a LP25, e 25 derivados da umbeliferona, codificados de UMB01 a UMB25. Onde se priorizou sínteses com no máximo 4 etapas de obtenção.

As estruturas foram desenhadas utilizando o *software* ChemDraw® Ultra 12.0 e posteriormente, suas estruturas tiveram a energia minimizada e geometria molecular otimizada utilizando o *software* Spartan'10®, visto que as moléculas desenhadas de forma tridimensional não estão, necessariamente, na conformação mais estável. E durante a geração de sua estrutura, ocorrem distorções na molécula, com formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos, além disso, átomos não-ligados também interagem em uma mesma região do espaço e provocam repulsão estérica e eletrostática, e para que estas distorções nas moléculas sejam corrigidas, a mesma deve ser otimizada (CARVALHO et al., 2003; NAMBA; SILVA; DA SILVA, 2008).

As estruturas bidimensionais dos derivados do lapachol estão ilustradas no Apêndice 1 e dos derivados da umbeliferona no Apêndice 2.

Com o intuito de avaliar a série de derivados do lapachol e da umbeliferona, utilizou-se tanto a ancoragem molecular quanto as análises *in silico* de propriedades moleculares, toxicológicas e farmacocinéticas, visto que para uma molécula ser um potencial candidato a fármaco, além de possuir uma boa atividade, tem de possuir boas propriedades

farmacocinéticas no sistema biológico humano e uma baixa toxicidade (MABKHOT et al., 2016).

5.1. Avaliação das propriedades moleculares

As propriedades moleculares das séries propostas foram determinadas utilizando o *software* online Molinspiration® e encontram-se dispostas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades moleculares dos derivados de lapachol e umbeliferona.

Molécula	Log <i>P</i>	TPSA	NA	MM	Volume	NALH	NDLH	ABS
Lapachol	3,16	54,37	18	242,27	223,94	3	1	90,24
LP01	2,95	43,38	18	242,27	219,96	3	0	94,03
LP02	2,95	43,38	18	242,27	219,96	3	0	94,03
LP03	1,71	63,60	19	260,29	234,24	4	1	87,05
LP04	2,80	43,38	18	240,26	213,77	3	0	94,03
LP05	2,54	43,38	17	226,23	197,51	3	0	94,03
LP06	1,78	63,60	19	258,27	228,00	4	1	87,05
LP07	5,97	26,03	21	279,38	276,94	2	0	100,01
LP08	5,45	52,34	25	337,42	321,47	4	0	90,94
LP09	5,32	35,27	22	293,37	274,79	3	0	96,83
LP10	5,68	46,26	22	295,38	284,96	3	1	93,04
LP11	6,30	46,26	25	329,40	306,21	3	1	93,04
LP12	5,94	35,27	25	327,38	296,03	3	0	96,83
LP13	5,97	38,67	24	321,42	308,02	3	0	95,65
LP14	2,18	74,60	19	260,29	237,85	4	2	83,26
LP15	3,42	54,37	19	278,74	243,37	3	1	90,24
LP16	3,62	47,28	18	240,26	214,09	3	0	92,68
LP17	1,78	63,60	19	258,27	228,00	4	1	87,05
LP18	-0,50	97,75	22	322,34	259,43	6	1	75,27
LP19	6,54	43,38	26	356,51	356,51	3	0	94,03
LP20	2,50	100,57	22	298,35	270,22	6	4	74,30
LP21	3,54	34,14	18	244,26	220,86	2	0	97,22
LP22	4,32	86,47	27	361,40	326,59	5	2	79,17
LP23	5,09	152,09	32	436,38	361,97	10	0	54,53
LP24	5,27	80,67	27	362,38	323,32	5	1	81,17
LP25	2,35	100,57	22	296,33	264,04	6	4	74,30

Umbeliferona	1,51	50,44	12	162,14	136,60	3	1	91,59
UMB01	2,92	56,52	19	260,29	239,54	4	0	89,50
UMB02	4,21	67,26	28	372,42	334,27	5	2	85,79
UMB03	3,92	45,73	18	237,26	212,29	3	1	93,22
UMB04	0,91	100,10	22	317,32	251,74	6	2	74,46
UMB05	4,80	47,28	21	286,37	281,74	3	0	92,68
UMB06	2,21	56,52	16	218,21	189,92	4	0	89,50
UMB07	2,05	39,45	13	176,17	154,13	3	0	95,38
UMB08	3,88	76,74	21	282,25	235,98	5	1	82,52
UMB09	2,05	39,45	13	176,17	154,13	3	0	95,38
UMB10	1,66	96,26	15	207,14	159,94	6	1	75,79
UMB11	0,95	82,54	16	219,20	184,40	5	2	80,52
UMB12	0,69	85,61	19	261,23	221,06	6	1	79,46
UMB13	1,02	70,67	13	178,14	144,62	4	2	84,61
UMB14	1,88	48,68	14	190,15	152,52	4	0	92,20
UMB15	0,38	59,06	13	178,14	140,99	4	1	88,62
UMB16	-0,87	86,99	14	196,16	158,88	5	3	78,98
UMB17	0,35	65,00	15	208,17	166,77	5	1	86,57
UMB18	1,06	107,63	16	218,22	186,87	6	5	71,86
UMB19	3,47	57,76	21	296,35	252,55	4	2	89,07
UMB20	2,86	117,69	28	394,41	319,22	8	2	68,39
UMB21	2,21	39,45	15	200,19	176,63	3	0	107,38
UMB22	2,41	154,04	29	394,35	321,27	11	3	55,85
UMB23	1,64	48,68	15	206,20	179,68	4	0	92,20
UMB24	3,14	127,69	28	379,33	309,26	9	2	64,94
UMB25	2,48	29,46	13	184,14	143,99	2	1	98,83
Doxorrubicina	0,57	206,0	39	543,52	459,18	12	3	37,90
Topotecano	0,43	104,90	31	421,45	368,14	8	2	72,81
Etoposídeo	0,70	160,86	42	588,56	493,51	13	3	53,50

Legenda: TPSA - área superficial polar topológica; NA - número de átomos; MM - massa molecular; NALH - número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; NDLH - número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; ABS - taxa de absorção.

Dentre todas as moléculas propostas, as substâncias LP07, LP08, LP09, LP10, LP11, LP12, LP13, LP19, LP23 e LP24 apresentaram $\log P$ acima de 5, sendo classificadas como altamente hidrofóbicas além de violarem uma regra de Lipinski, que recomenda que este valor

seja abaixo de 5 para que se tenha um perfil farmacocinético adequado (LIPINSKI, 2004). Enquanto que os derivados LP18 e UMB16 apresentaram valores de $\log P$ abaixo de zero, -0,5 e -0,87, respectivamente, indicando um caráter hidrofílico.

Os derivados LP04, LP17, LP20 e LP25 apresentaram um perfil menos lipofílico que o lapachol, e os derivados da umbeliferona, UMB22, UMB24 e UMB25, apresentaram-se mais lipofílicos que sua molécula de partida, onde a grande maioria das moléculas propostas apresentaram valor de $\log P$ entre 0 e 3 indicando um perfil molecular com melhor balanço entre a solubilidade e a permeabilidade. Quando comparados ao topotecano, doxorrubicina e etoposídeo, fármacos antineoplásicos e inibidores da topoisomerase I e II, respectivamente, todas as substâncias propostas apresentaram um comportamento mais lipofílico, visto que a doxorrubicina, o etoposídeo e o topotecano apresentam uma natureza mais polar com $\log P$ de 0,57, 0,60 e 0,50 valores estes, que corroboram com dados encontrados na literatura (AMIJI, 2007; ZHAO et al, 2013).

Em relação ao peso molecular, todos os derivados apresentaram peso molecular abaixo de 500 Da, o que indica que podem ser facilmente transportados, difundidos e absorvidos. E já em relação à área de superfície polar topológica (TPSA), observou-se que todos os derivados apresentaram uma área abaixo de 110 Å².

A partir dos valores obtidos da TPSA foi possível calcular a porcentagem de absorção (%ABS) pelo método relatado por Zhao e colaboradores (2002) usando a seguinte fórmula: $\% \text{ ABS} = 109 - (0,345 \times \text{TPSA})$. Aqui, observou-se que todos os derivados apresentaram uma taxa de absorção que variou de 54 a 100%.

5.2. Propriedades Toxicológicas

Os riscos de toxicidade (mutagenicidade, tumorigenicidade, irritação e reprodução) e propriedades físico-químicas (solubilidade, similaridade com fármaco e classificação de

fármaco) foram calculados pela metodologia desenvolvida por Osiris® e estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Predição dos riscos toxicológicos dos derivados de lapachol e umbeliferona.

Molécula	Mutagênico	Tumorigênico	Irritante	Efeito no sistema reprodutivo	DrugL	DrugS
Lapachol	N	N	N	A	-2,02	0,28
LP01	A	N	N	A	-7,69	0,16
LP02	N	N	N	N	-4,63	0,42
LP03	N	N	N	N	-3,07	0,46
LP04	N	N	N	N	-3,57	0,44
LP05	N	N	N	N	-2,05	0,49
LP06	N	N	N	N	-2,08	0,48
LP07	A	A	M	A	-2,98	0,04
LP08	A	A	M	A	-2,69	0,04
LP09	A	A	M	A	-4,0	0,04
LP10	A	A	M	A	-2,91	0,05
LP11	A	A	M	A	0,41	0,05
LP12	A	A	M	A	-0,73	0,04
LP13	N	N	N	N	-5,06	0,26
LP14	N	N	N	N	-3,04	0,45
LP15	A	A	M	M	-5,42	0,09
LP16	N	N	N	N	-1,85	0,36
LP17	N	N	N	A	-5,71	0,27
LP18	N	N	N	A	-6,64	0,27
LP19	N	N	N	A	-22,54	0,18
LP20	N	N	N	A	-0,38	0,37
LP21	N	N	N	N	-8,82	0,37
LP22	N	N	N	N	-0,73	0,39
LP23	N	N	N	N	-15,82	0,24
LP24	N	N	A	N	-1,66	0,19
LP25	N	N	N	N	0,7	0,7
Umbeliferona	A	N	N	N	-4,4	0,29
UMB01	N	N	N	N	-8,99	0,44
UMB02	N	N	N	A	0,72	0,35
UMB03	N	N	N	N	-1,68	0,5
UMB04	A	N	A	N	-3,91	0,17
UMB05	N	N	N	A	-29,17	0,2

UMB06	N	N	N	N	-2,46	0,29
UMB07	N	N	N	N	-4,02	0,28
UMB08	N	N	A	A	-3,8	0,15
UMB09	N	N	N	N	-3,93	0,48
UMB10	N	N	N	N	-10,68	0,47
UMB11	N	N	N	A	-9,18	0,27
UMB12	A	N	N	A	-0,98	0,21
UMB13	N	A	N	N	-4,29	0,29
UMB14	N	N	N	A	-3,08	0,28
UMB15	A	N	A	N	-1,22	0,21
UMB16	N	A	N	N	-6,52	0,49
UMB17	N	N	N	A	-2,03	0,32
UMB18	N	N	N	N	1,54	0,87
UMB19	N	N	N	N	-2,69	0,4
UMB20	N	N	N	N	-0,77	0,44
UMB21	N	N	N	N	-3,93	0,47
UMB22	N	A	N	N	-18,92	0,24
UMB23	N	N	N	A	-1,38	0,34
UMB24	N	N	N	N	-5,34	0,42
UMB25	N	N	N	N	-8,42	0,44
Doxirrubicina	N	N	A	N	4,57	0,31
Topotecano	N	N	N	N	6,64	0,84
Etoposídeo	N	N	N	N	-0,28	0,39

Legenda: DrugL – drug likeness; DrugS – drug-score; A – alto risco; M – risco moderado; N – sem risco.

A partir dos resultados obtidos, foi possível prever que as substâncias LP01, LP15, umbeliferona, UMB04, UMB12 e UMB15 apresentam alto risco mutagênico. Os derivados LP07, LP08, LP09, LP10, LP11 e LP12 apresentam alto risco tumorigênico, mutagênico e efeito no sistema reprodutor e risco moderado de irritação. Enquanto que os derivados LP24, UMB04, UMB08 e UMB15 apresentam alto risco irritante, e o lapachol, LP01, LP17, LP18, LP19, LP20, UMB02, UMB05, UMB08, UMB11, UMB12, UMB14, UMB17 e UMB23 apresentam risco elevado de efeito na reprodução.

Na análise do perfil *drug-likeness* e *drug-score*, as moléculas LP07, LP08, LP09, LP10, LP11, LP12, LP15 e LP25 apresentaram valores de *drug-score* abaixo de 0,1 e somente LP10, UMB06 e UMB24 apresentaram valor positivo na análise de *drug-likeness*.

5.3. Ancoragem molecular

Para a realização da ancoragem molecular, o *grid box* foi construído para cada uma das enzimas de acordo com as dimensões dispostas no quadro 6, e posteriormente validada.

Quadro 6. Dimensões do *grid box* para a realização da ancoragem molecular.

Enzima	Código	Dimensões	Espaçamento (Å)
Topoisomerase I	1k4t	39x36x29	1
Topoisomerase II- α	1zxn	26x22x28	1
Topoisomerase II- β	3qx3	30x34x34	1

Foi realizada a validação do método com as três enzimas utilizadas da topoisomerase (I, II alfa e II beta), 1K4T, 1ZNX e 3QX3, respectivamente, com os seus respectivos ligantes cocrystalizados obtidos na plataforma PDB por meio da análise do *redocking* utilizando o *grid box* anteriormente elaborado. Os resultados estão expressos na tabela 3.

Tabela3. Validação do método *in silico* de ancoragem molecular pelo método do *redocking*.

Enzima	Resolução (Å)	RMSD (Å)	Energia de ligação (Kcal/mol)
Topoisomerase I	2,1	1,053	-12,5
Topoisomerase II- α	2,51	0,886	-11,4
Topoisomerase II- β	2,16	0,548	-13,5

Legenda: RMSD – desvio médio quadrático.

A partir da análise do *redocking*, pode-se observar que em todos os métodos desenvolvidos, o valor de RMSD, desvio entre a posição da molécula cocrystalizada e a posição do ligante, considerando a pose mais estável do cluster mais populoso e com menor energia de ligação, após o processo de ancoragem molecular foi menor que 2 Å, representando assim, um alto grau de superposição e orientação relativa da conformação na estrutura cristalográfica (figura 21). Com isso, os métodos foram considerados adequados e confiáveis, validando as condições utilizadas para as ancoragens investigadas *in silico*.

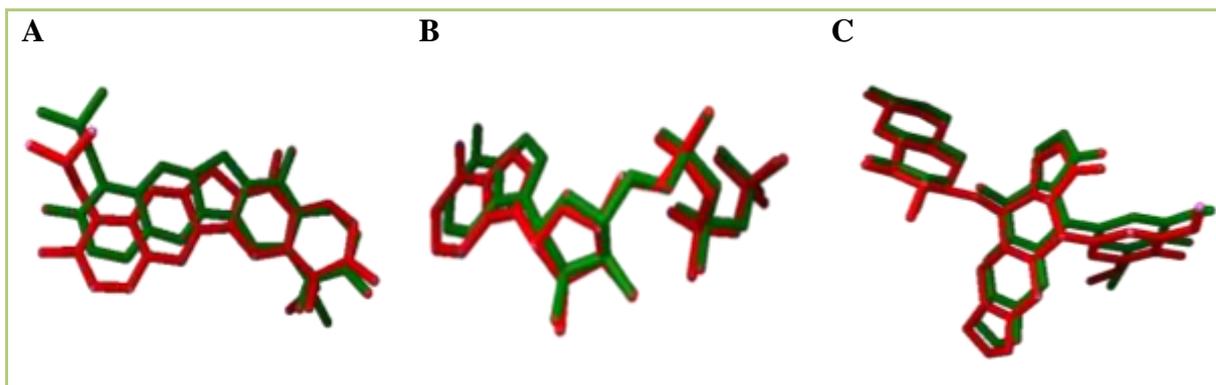


Figura 21. Redocking dos ligantes cocristalizados com a topoisomerase. Visualização da sobreposição da pose cristalográfica original (vermelho) e da pose dos ligante (verde) no sítio de ligação após a utilização dos métodos desenvolvidos. A) Topotecano – topoisomerase I; (B) ANP – topoisomerase II alfa; (C) Etoposídeo – topoisomerase II beta.

5.3.1. Triagem virtual

A triagem virtual dos derivados propostos foi realizada por meio da ancoragem molecular utilizando o programa Autodock Vina®, onde a seleção das moléculas que seriam sintetizadas foi baseada no *score* de encaixe do ligante com o receptor, onde se utilizou como valor de corte a energia de ligação de $-8,0$ kcal/mol, bem como a presença de ligação de hidrogênio com os aminoácidos presentes no sítio de ligação. Os resultados obtidos na análise da ancoragem molecular estão expressos nas tabelas presentes no Apêndice 3, Apêndice 4 e Apêndice 5.

Dentre todas as moléculas analisadas na ancoragem com a topoisomerase I, 41 apresentaram uma energia de ligação menor que $-8,0$ kcal/mol, sendo que destas, 20 apresentaram a presença de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da topoisomerase I, caracterizando um melhor perfil de complementariedade. Dentre estas, as melhores moléculas foram a LP04, LP05, LP18, LP20, LP23, LP24 e LP25, UMB22, UMB24 e UMB25, visto que apresentaram menores energias de ligação e maiores interações com a enzima.

O derivado LP04 apresentou ligação de hidrogênio do grupo carbonila da quinona com a asparagina 722, bem como interações hidrofóbicas com a arginina 364, treonina 718, lisina 532, aspartato 533 e a base adenina 113. Também foram observadas interações π - π do anel naftalênico do ligante com os anéis aromáticos dos pares de bases TGP11 e DT10, conferindo uma estabilidade à interação entre o ligante e o receptor. O derivado LP17 também apresentou ligação de hidrogênio com arginina 364, interações hidrofóbicas com a fenilalanina 361, ácido glutâmico 356, lisina 374 e 425, triptofano 416, isoleucina 377 e 420, asparagina 419 e o par de base adenina 113, além da interação π -cátion com ácido glutâmico 418 (figura 22).

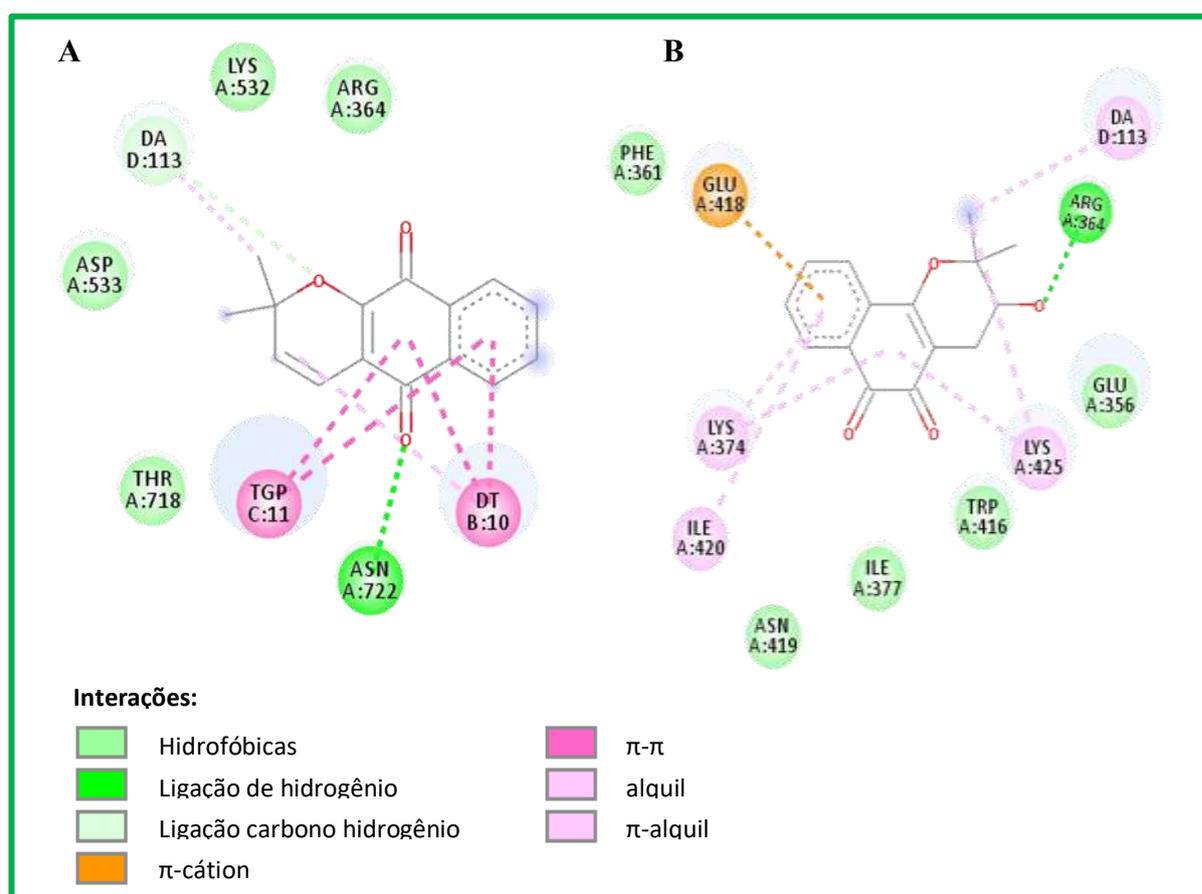


Figura 22. Representação 2D das interações dos derivados LP04 (A) e LP17 (B) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.

Os derivados LP18, LP23 e LP24 (figura 23) apresentaram ligação de hidrogênio da carbonila da quinona e do grupo sulfonil com os resíduos dos aminoácidos arginina 364 e

triptofano 416, e com os pares de bases adenina 113 e TGP11, além das interações hidrofóbicas com o ácido glutâmico 356, asparagina 352, lisina 425 e 532, fenilalanina 361, treonina 718, isoleucina 535 e os pares de bases DA13 e DT10. Também apresentaram interações π - π dos seus anéis aromáticos com os pares de bases TGP11, DC112 e DA113, além da interação π -cátion do anel naftalênico com a asparagina 533 e ácido glutâmico 418.

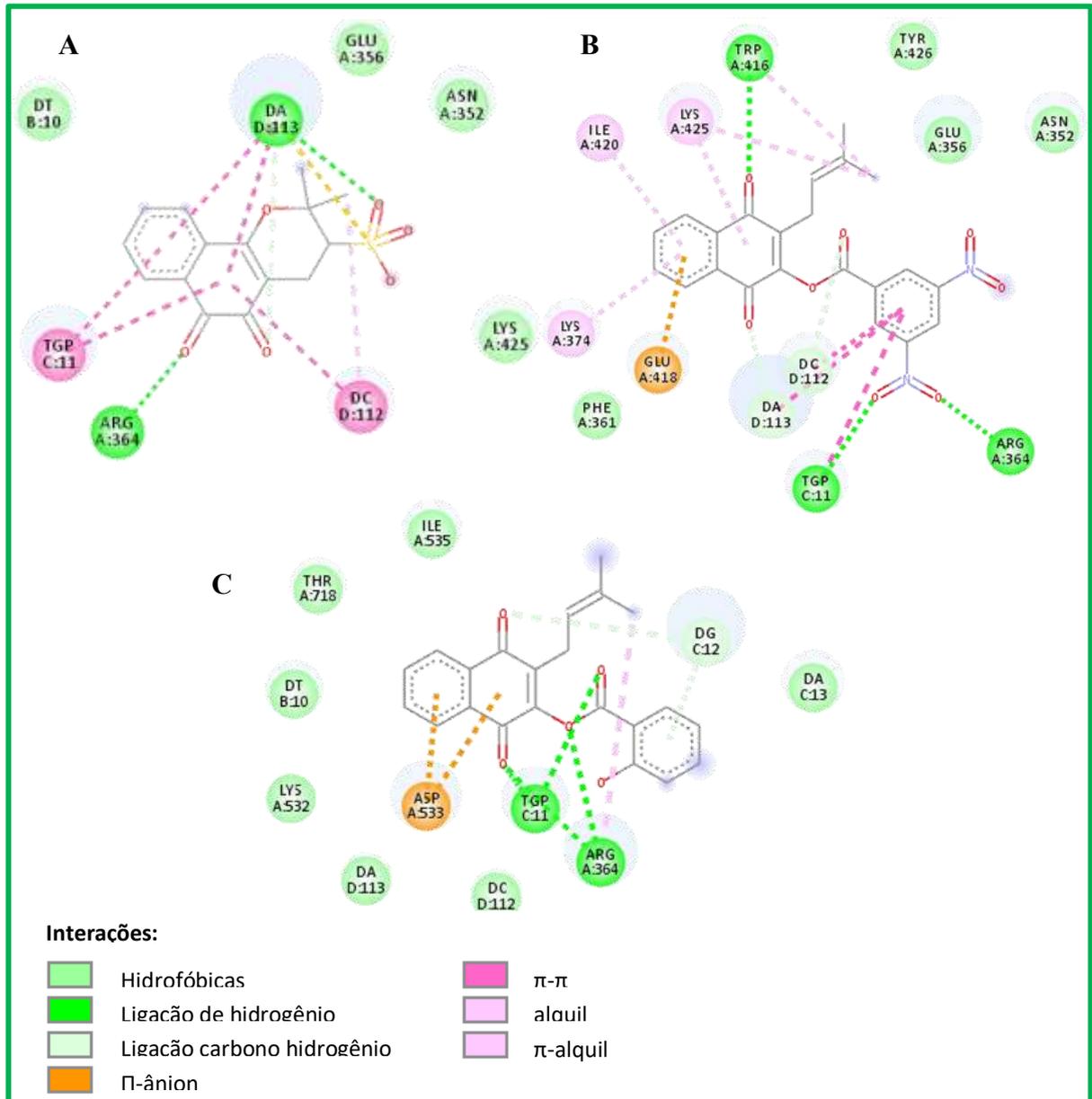


Figura 23. Representação 2D das interações dos derivados LP18 (A), LP23 (B) e LP24 com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.

Os derivados LP20 e LP25 (figura 24) apresentaram ligação de hidrogênio com os resíduos de lisina 425, asparagina 722 e os pares de bases DA114 e DA113. Além das

interações hidrofóbicas com os resíduos de lisina 532, treonina 718, asparagina 533, fenilalanina 361, serina 423, isoleucina 420 e 424.

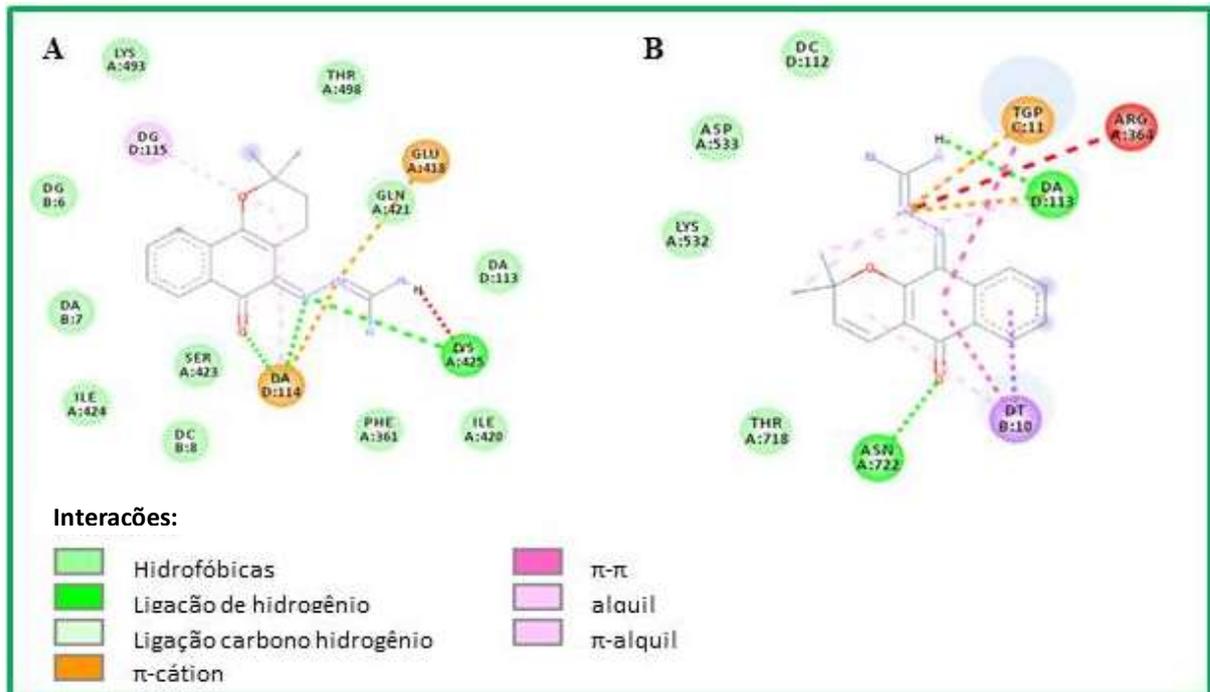


Figura 24. Representação 2D das interações dos derivados LP20 (A) e LP25 (B) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.

Entre os derivados da umbeliferona, os que apresentaram melhor interação com os resíduos do sítio ativo da topoisomerase I foram a UMB22, UMB24 e UMB25. O derivado UMB22 apresentou ligação de hidrogênio com lisina 425 e os pares de bases DA114 e DG6, além das interações hidrofóbicas com a isoleucina 377, serina 423, glutamina 421, treonina 498, fenilalanina 361, asparagina 419 e com os pares de bases DA113, DG115, DA7 e DC117. Os derivados UMB24 e UMB25 apresentaram ligação de hidrogênio da hidroxila fenólica com arginina 364, sendo que a UMB24 também apresentou ligação de hidrogênio com o par de base TGP11, bem como interações π - π com DA113 e DC112 e interações hidrofóbicas com lisina 532, treonina 718, arginina 488, histidina 632, asparagina 352, isoleucina 535, tirosina 723 fosforilada, e com os pares de bases DT116, DT10 e DG12. Já o derivado UMB25 apresentou interações hidrofóbicas do anel benzopirano com os resíduos de

asparagina 418 e 419, lisina 374 e 425, isoleucina-377 e 420, fenilalanina 361, ácido glutâmico 418 e os pares de base DA113. (figura 25).

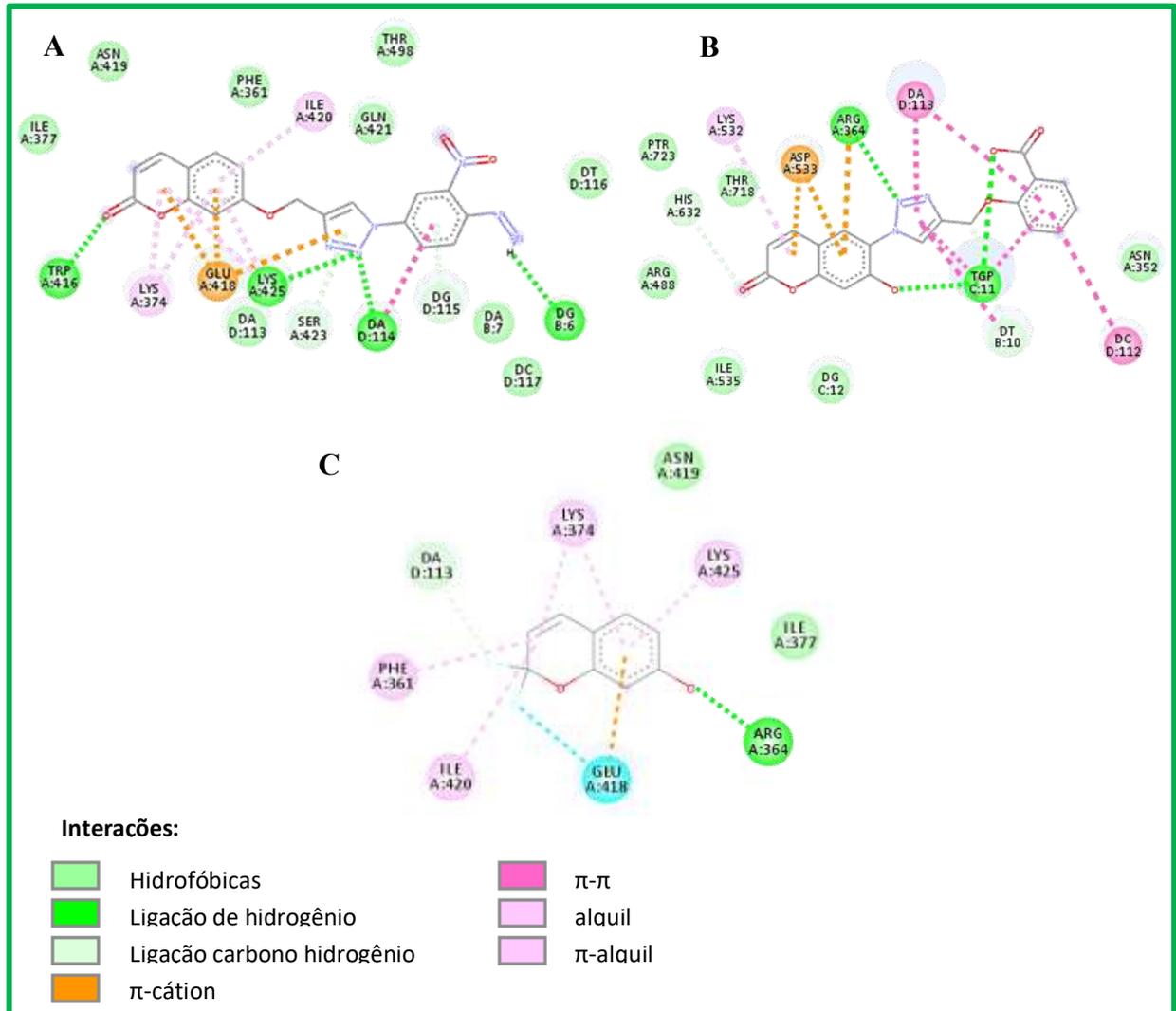


Figura 25. Representação 2D das interações dos derivados UMB22 (A), UMB24 (B) e UMB25 (C) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.

Os derivados LP18, LP20 e LP23 apresentaram a formação de ligação de hidrogênio com os resíduos de asparagina 91, 120 e 150 e serina 149, além de interações hidrofóbicas com os resíduos de serina 148, treonina 159 e 215, asparagina 94 e 95, glicina 164, lisina 123 e 168, fenilalanina-142 e alanina-92 (figura 26).

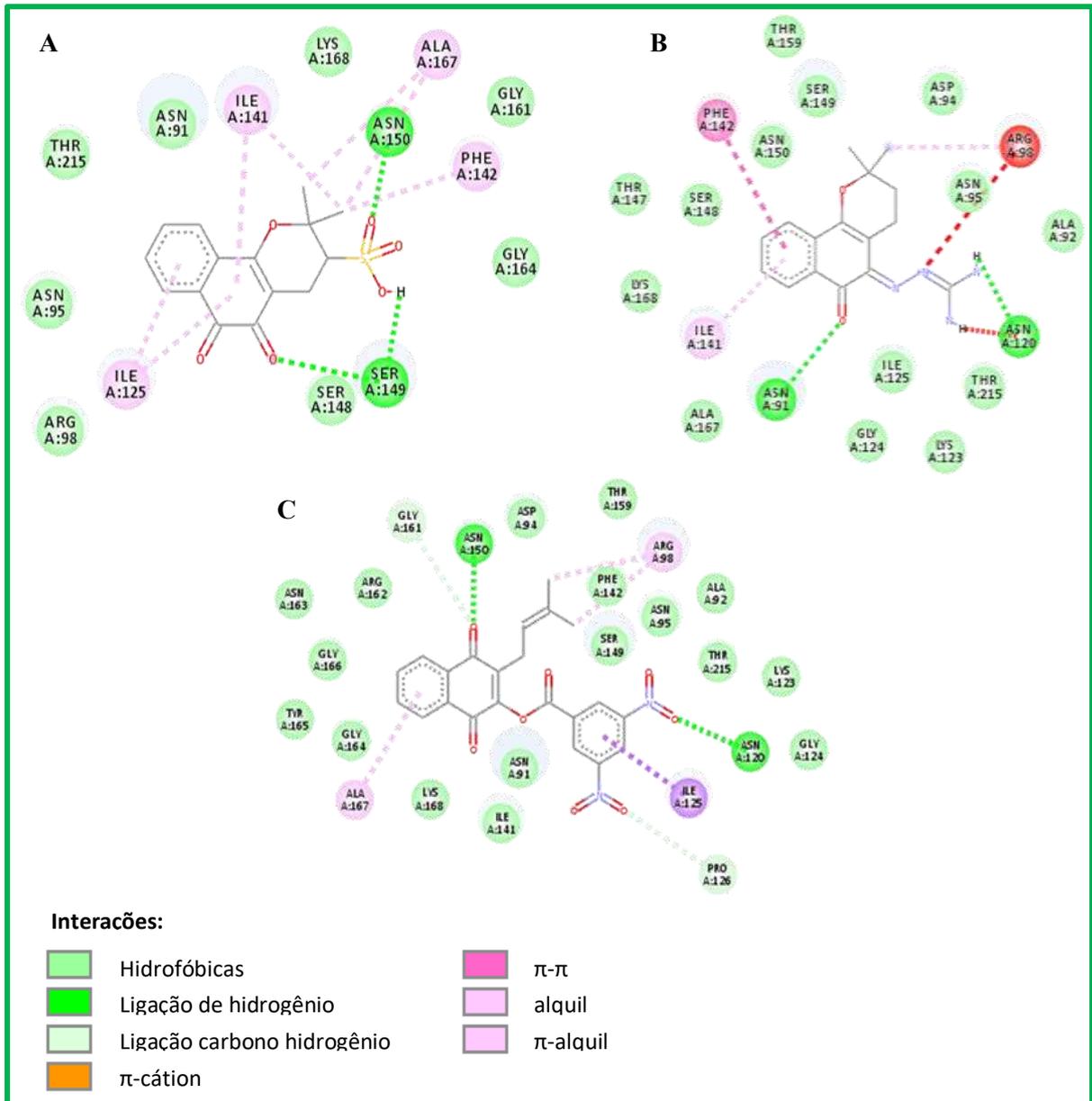


Figura 26. Representação 2D das interações dos derivados LP18 (A), LP20 (B) e LP23 (C) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa.

Os derivados LP24 e LP25 apresentaram a formação de ligação de hidrogênio com os resíduos de asparagina 94 e 150 e serina 149, além de apresentarem interações hidrofóbicas com os resíduos de glicina 161, 164 e 166, fenilalanina 142, isoleucina 125, alanina 167, lisina 168, treonina 147, serina 148, ácido glutâmico 97 e asparagina 95. O derivado LP25 também apresentou interação π -cátion com o resíduo de aspartato 94 (figura 27).

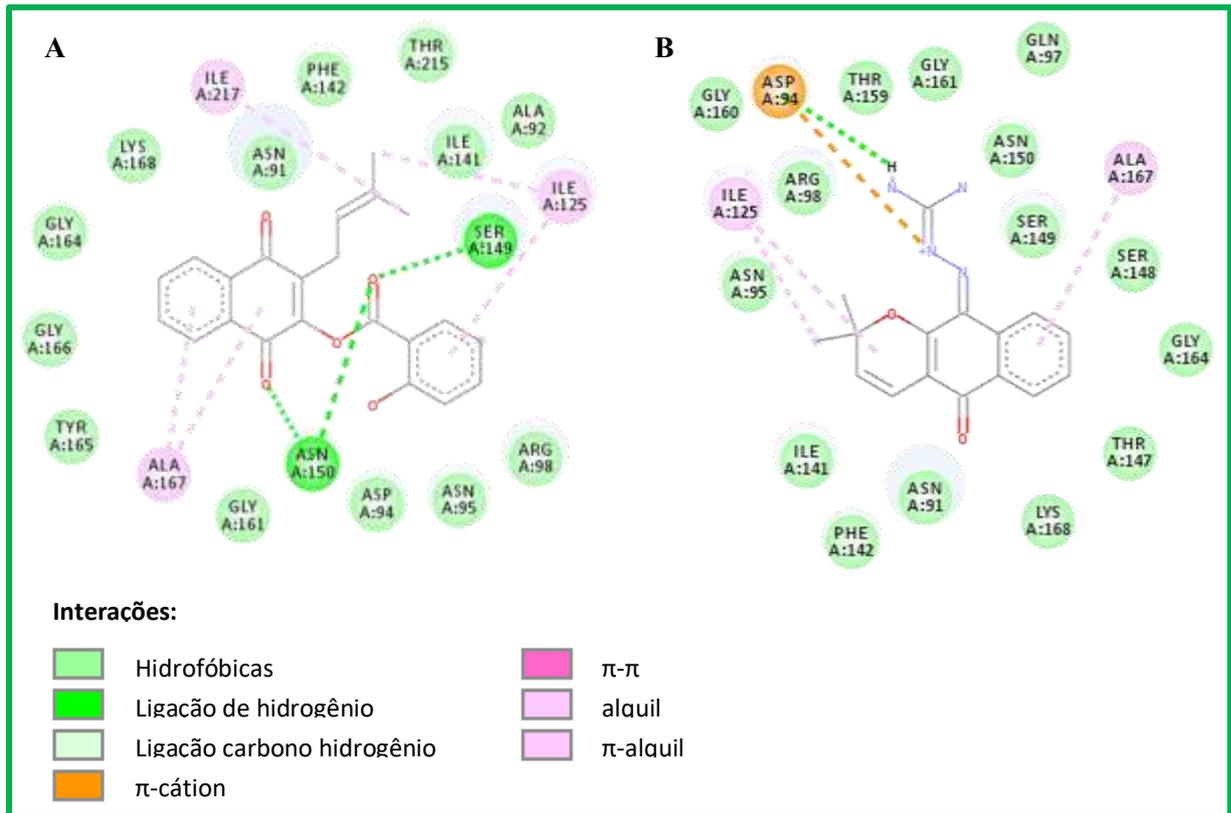


Figura 27. Representação 2D das interações dos derivados LP24 (A) e LP25 (B) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa.

Entre os derivados da umbeliferona, somente os derivados UMB22 e UMB24 foram capazes de realizar ligações de hidrogênio e com menor energia de afinidade com a topoisomerase II alfa. O derivado UMB24 apresentou a formação de ligação de hidrogênio com os resíduos de serina 148, asparagina 150 e 163 e arginina 162, além de interações hidrofóbicas com os resíduos de isoleucina 125, 88, 118 e 127, aspartato 94, glicina 166, treonina 165 e 147, alanina 167 e 92, serina 149, arginina 98, asparagina 91 e 120. Por sua vez, o derivado UMB24 apresentou ligações de hidrogênio com a serina 149, asparagina 150, glicina 164 e 166, ácido glutâmico 376 e treonina 165, bem como interações hidrofóbicas com a isoleucina 141 e 125, fenilalanina 142, treonina 215, asparagina 120, 91, 95 e 163, alanina 92, arginina 98 e 162, glicina 161, ácido glutâmico 87, lisina 378 e serina 148 (figura 28).

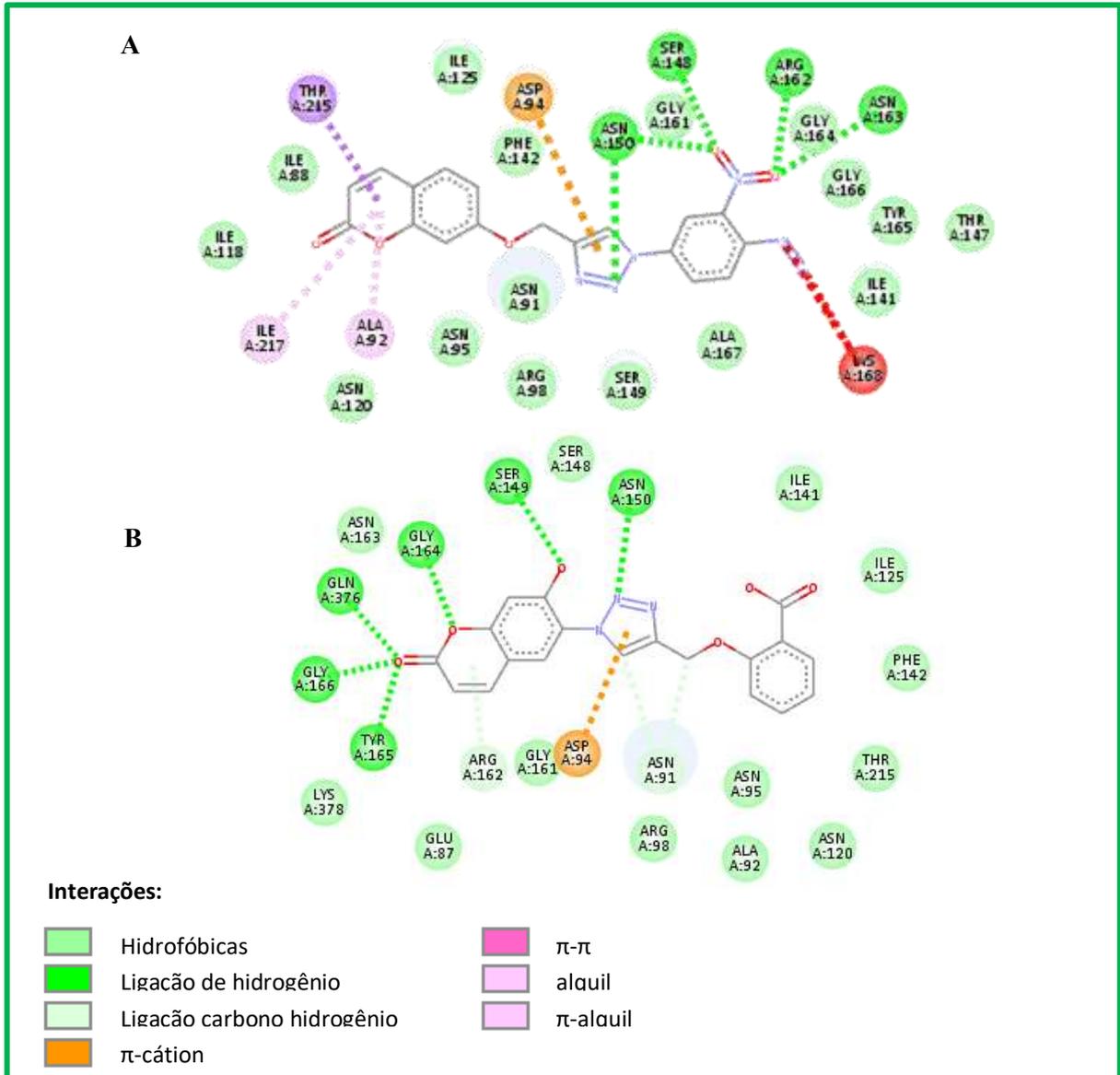


Figura 28. Representação 2D das interações dos derivados UMB22 (A) e UMB24 (B) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa.

Na análise da ancoragem molecular com a topoisomerase II beta, dentre todas as moléculas analisadas, 31 apresentaram uma energia de ligação menor que -8,0 kcal/mol, sendo que destas, 11 apresentaram a presença de ligações de hidrogênio com aminoácidos no sítio ativo da topoisomerase II beta, além de interações hidrofóbicas e do tipo π - π com os aminoácidos e pares de bases permitindo uma melhor complementariedade com o receptor. Assim, as melhores moléculas foram: LP01, LP04, LP17, LP20, LP24, UMB22 e UMB24.

Os derivados LP01 e LP17 apresentaram interações com os resíduos de aminoácidos e pares de bases, apresentando ligação de hidrogênio com os pares de base DG13, bem como interações π - π com os pares de bases, DA12 e DT9, além das interações hidrofóbicas com os resíduos de arginina 503, ácido glutâmico 778 e DC8. Já o derivado LP25 apresentou ligação de hidrogênio com a arginina 503 e DT9, interação π - π com DC8 e interações hidrofóbicas com glicina 776 e 504, DG13, ácido glutâmico 778 e DA12 (figura 29).

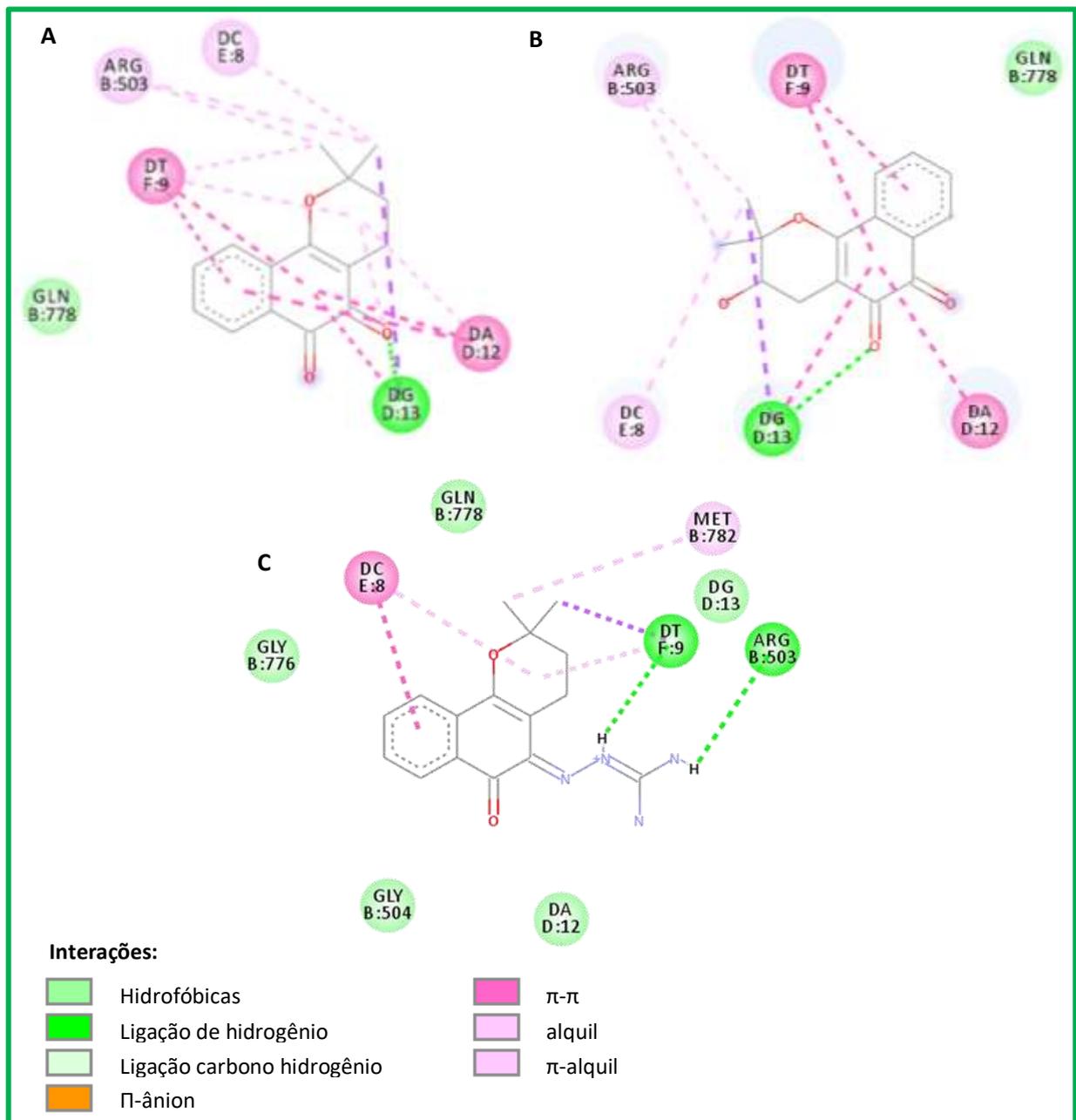


Figura 29. Representação 2D das interações dos derivados LP01 (A), LP17 (B) e LP20 (C) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta.

O derivado LP04 apresentou ligação de hidrogênio com DT9, interações π - π com os pares de bases DC8, DG13 e DA12 e interações hidrofóbicas com alanina 779 e ácido glutâmico 778. Enquanto que o derivado LP24 apresentou ligação de hidrogênio com DC8 e DG13, interação π -cátion com DT9 e interações hidrofóbicas com a glicina 478, 504 e 776, asparagina 479, arginina 503, DG10, DA12 e ácido glutâmico-778 (figura 30).

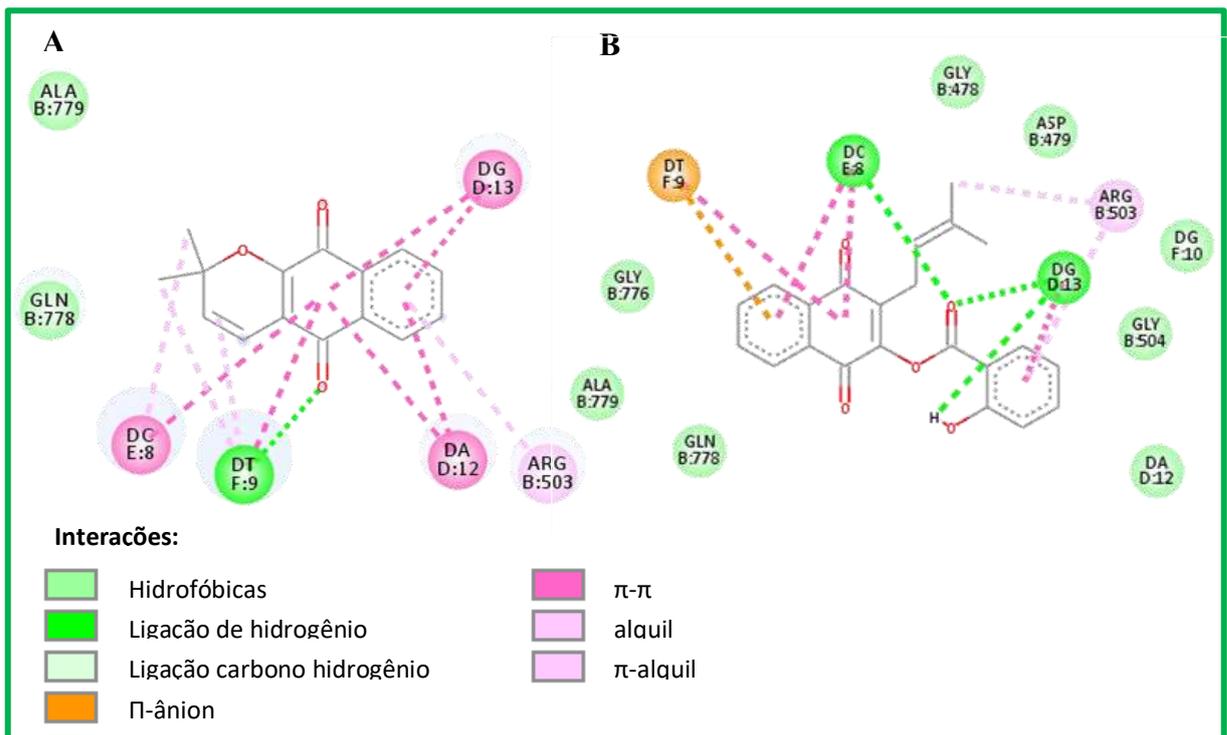


Figura 30. Representação 2D das interações dos derivados LP04 (A) e LP24 com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta.

Dentre os derivados da umbeliferona, os que apresentaram uma possível interação com a topoisomerase II beta foram os derivados UMB22 e UMB24 (figura 31).

O derivado UMB22 apresentou ligação de hidrogênio com DT9, alanina 779, DA12 e ácido glutâmico 778, interações π - π com DC8, DG10 e DG13 e interações hidrofóbicas com arginina 503, lisina 456, glicina 776 e ácido glutâmico 777. Já o derivado UMB24 apresentou ligação de hidrogênio com a lisina 456 e DG10, interações hidrofóbicas com glicina 478, aspartato 479, arginina 503, DC8, DG13, DT9 e DA12.

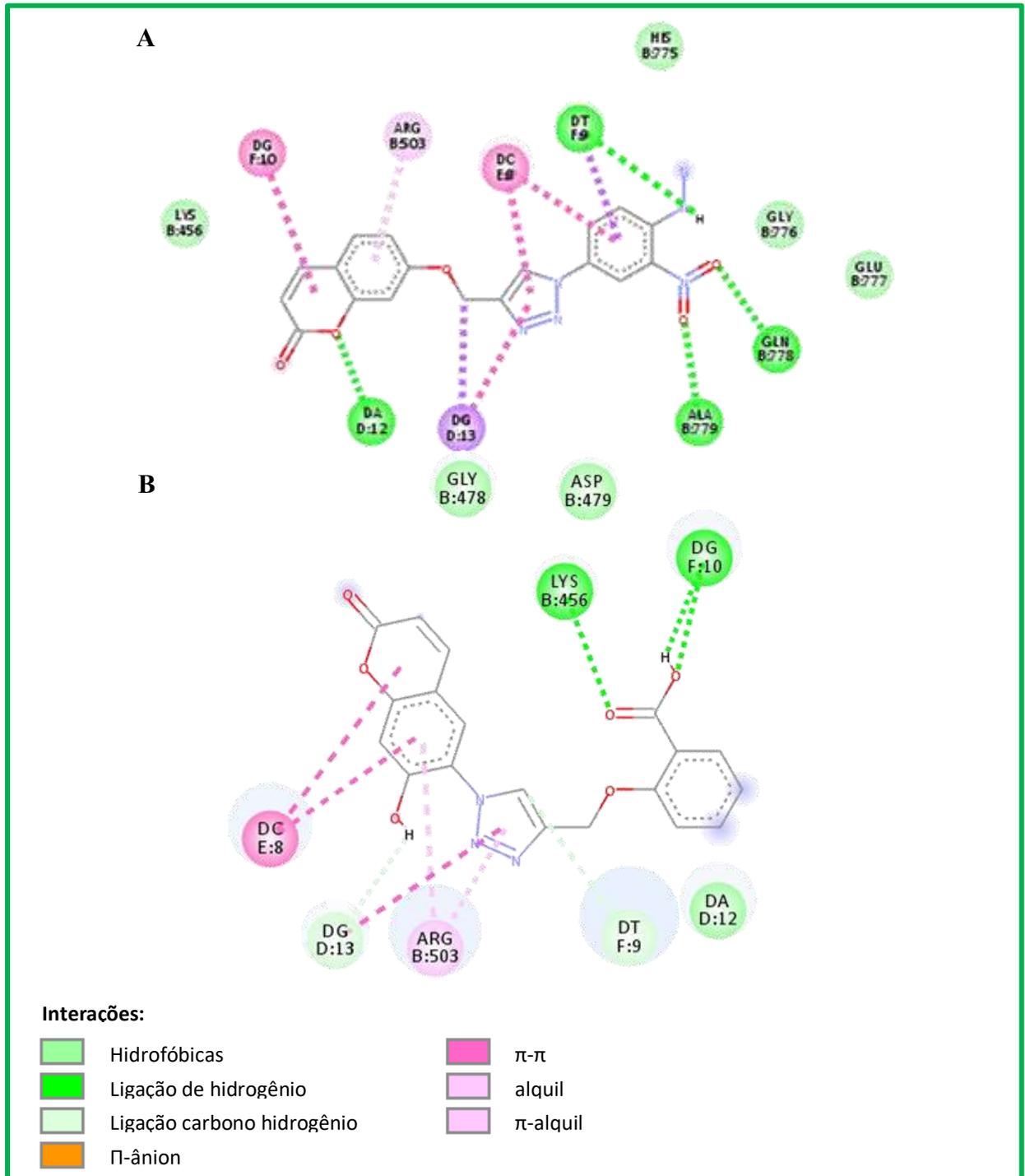


Figura 31. Representação 2D das interações dos derivados UMB22 (A) e UMB24 (B) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta.

Na análise dos resultados obtidos com a ancoragem molecular dos derivados com a topoisomerase II beta, não se observou a formação de ligação de hidrogênio com os aminoácidos críticos do sítio ativo, apresentando somente interações do tipo hidrofóbica com

estes resíduos, principalmente com a metionina 782, ácido glutâmico 778 e aspartato 479, permitindo uma possível estabilização no sítio ativo dos derivados. Porém, ao comparar a interação dos ligantes com topoisomerase II alfa e beta, observou-se que todos os derivados apresentaram uma maior afinidade com o receptor da topoisomerase II alfa devido o melhor perfil de complementariedade, bem como menor energia de afinidade.

Assim, a partir da análise da ancoragem molecular com as enzimas topoisomerasas, as moléculas que apresentaram uma maior probabilidade de atuarem com inibidores da topoisomerase devido um melhor perfil de complementariedade com o sítio ativo foram os derivados LP04, LP17, LP18, LP20, LP23, LP24, LP25, UMB22, UMB24 e UMB25.

5.5. Parâmetros farmacocinéticos

A análise dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada utilizando o *software* PreADMET®, e os resultados estão dispostos na tabela 5, onde os parâmetros que tiveram maior significância durante as análises foram: Caco2 (taxa de absorção), HIA (taxa de absorção intestinal humana), ligação às proteínas plasmáticas (distribuição) e inibição da glicoproteína-P.

Tabela 5. Avaliação in silico de parâmetros relacionados à absorção e distribuição dos derivados do lapachol realizada pelo *software* PreADMET.

Molécula	HIA (%)	BBB (Ccérebro/ Csangue)	Permeabilidade Caco-2 (nm/sec)	LPP (%)	IPGP
Lapachol	95,49	0,82	21,34	100	Negativo
Umbeliferona	94,17	0,58	19,51	42,39	Negativo
LP04	97,83	2,12	43,76	87,31	Negativo
LP17	96,05	0,67	0,25	80,94	Negativo
LP18	96,31	0,17	0,37	72,39	Negativo
LP20	79,11	0,09	1,01	54,18	Negativo
LP25	79,11	0,57	0,62	50,57	Negativo
UMB22	84,61	0,06	18,65	77,28	Negativo

UMB24	92,01	0,10	20,02	89,77	Negativo
UMB25	96,88	2,68	23,27	71,48	Negativo

Legenda: HIA – absorção no intestino humano; BBB-penetração barreira hematoencefálica; IPGP- inibidor da glicoproteína-P; LPP – ligação às proteínas plasmáticas.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que todos os derivados apresentaram uma ligação fraca em relação às proteínas plasmáticas, somente o lapachol, molécula de partida, apresentou forte ligação. E em relação a penetração da barreira hematoencefálica, observou-se que os derivados LP04 e LP25 apresentaram maior predição de penetrarem a barreira hematoencefálica, apresentando o nível de concentração cérebro/ concentração sangue acima de 2, enquanto os derivados LP17, LP18, LP25, UMB24 e as moléculas de partida, lapachol e umbeliferona, apresentaram média penetração. Os únicos derivados que apresentaram baixa predição de penetração foram o LP20 e UMB22 segundo a classificação de Ma, Chen e Yang (2005).

Na análise de predição da absorção intestinal, utilizou o pH 7,4, para mimetizar as condições *in vivo*. A partir dos resultados obtidos, observou-se que todos os derivados apresentaram boa absorção segundo a escala de Yee (1997). Em quanto que na predição da permeabilidade das células Caco-2, observou-se que os derivados LP04, UMB22, UMB24 e UMB25 apresentaram média permeabilidade, enquanto os derivados LP17, LP18, LP20 e LP25 apresentaram baixa permeabilidade conforme a classificação adotada por Yazdanian e colaboradores (1998).

Na análise da predição de inibição da glicoproteína P, nenhum dos derivados apresentou atividade inibitória *in silico*.

5.6. Obtenção dos derivados do lapachol e da umbeliferona

5.6.1. Síntese do LP04

Na síntese do LP04, 2-2-dimetil-2H-nafto(2,3-b)piran-5,10-diona, após o processo de purificação foram obtidos cristais de coloração amarela com rendimento de 46% e fator de retenção de 0,42 observado em CCD utilizando como fase móvel, hexano e acetato de etila (6:4). O derivado apresenta como fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_3$ e ponto de fusão de 270,8 °C.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de 1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN 1H ($CDCl_3$) δ (ppm) estão representados figura 32.

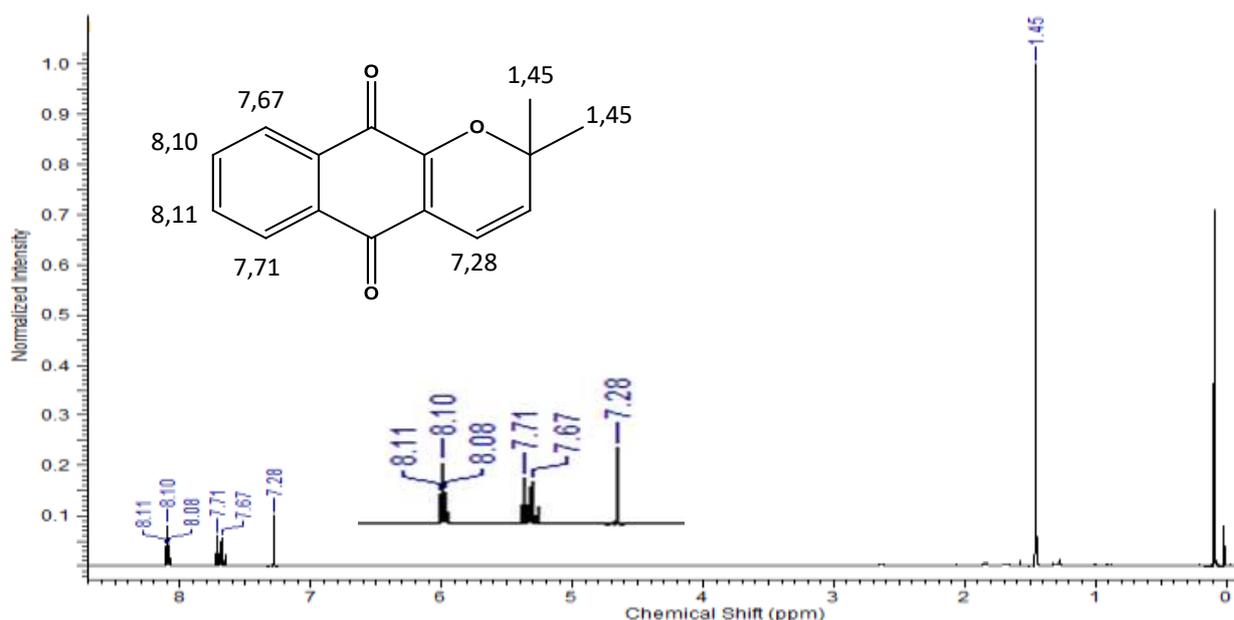


Figura 32. Espectro de RMN de 1H do derivado LP04.

Os dados de deslocamentos químicos foram compatíveis e característicos da estrutura do derivado. Como o peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 240,25 g/mol, a mesma foi submetida à análise por espectrometria de

massas, e o espectro de íons totais (Figura 33) revelou a presença de um pico base de m/z 241,27, conferindo com a massa da molécula desejada.

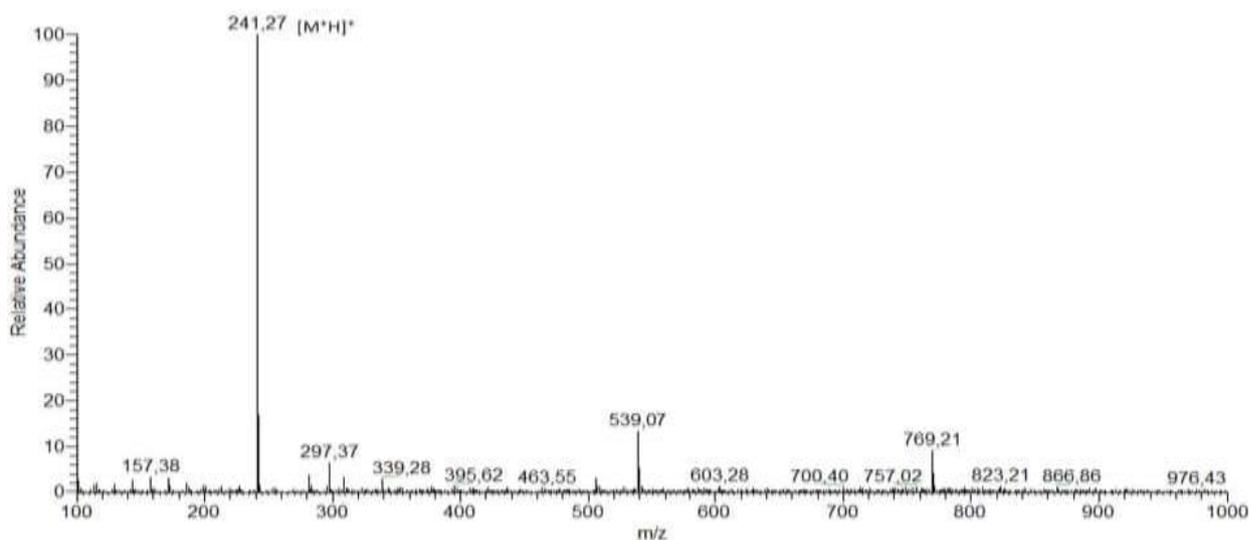


Figura 33. Espectro de massas no modo positivo $[M+H]^+$.

5.6.2. Síntese do LP17

Na síntese do LP17, 2-hidroxi- β -lapachona, após a purificação foi obtido um sólido amorfo de coloração laranja com rendimento de 52% e fator de retenção de 0,23 observado em CCD utilizando como fase móvel, hexano e diclorometano (6:3). O derivado possui como fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_4$ e ponto de fusão de 326,62 °C.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de 1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN 1H ($CDCl_3$) δ (ppm) estão dispostos na figura 34.

O peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 258,27 g/mol. Assim, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 35) revelou a presença de um pico base de m/z 259,29 conferindo com a massa da molécula desejada.

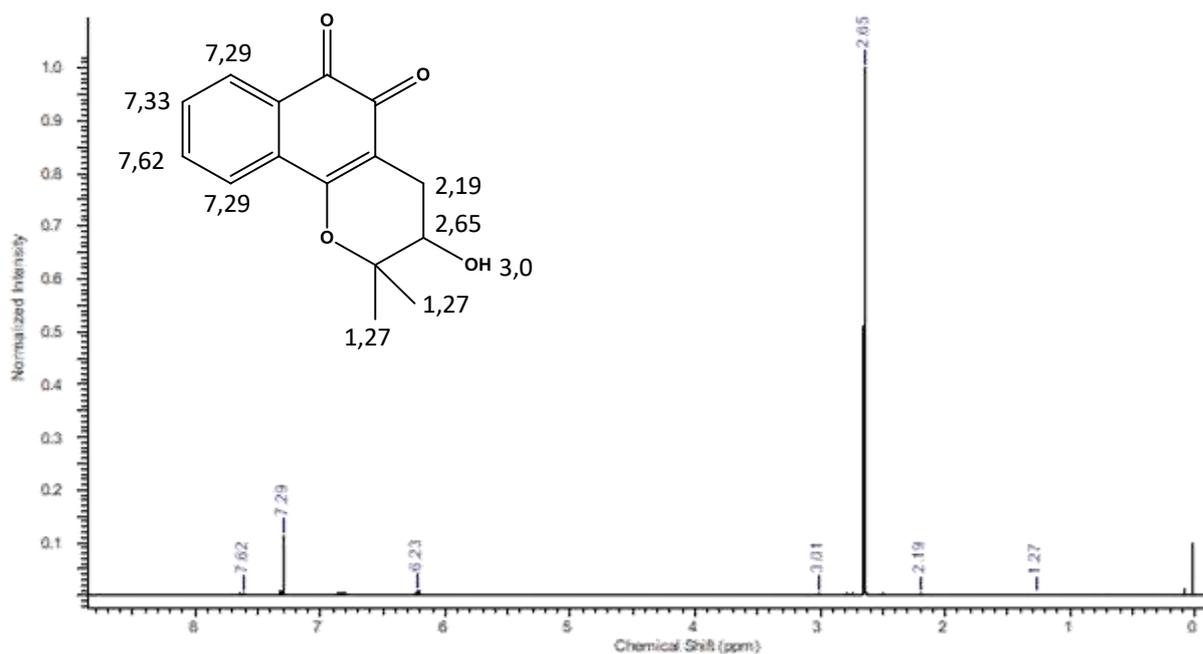


Figura 34. Espectro RMN de ^1H do derivado LP17.

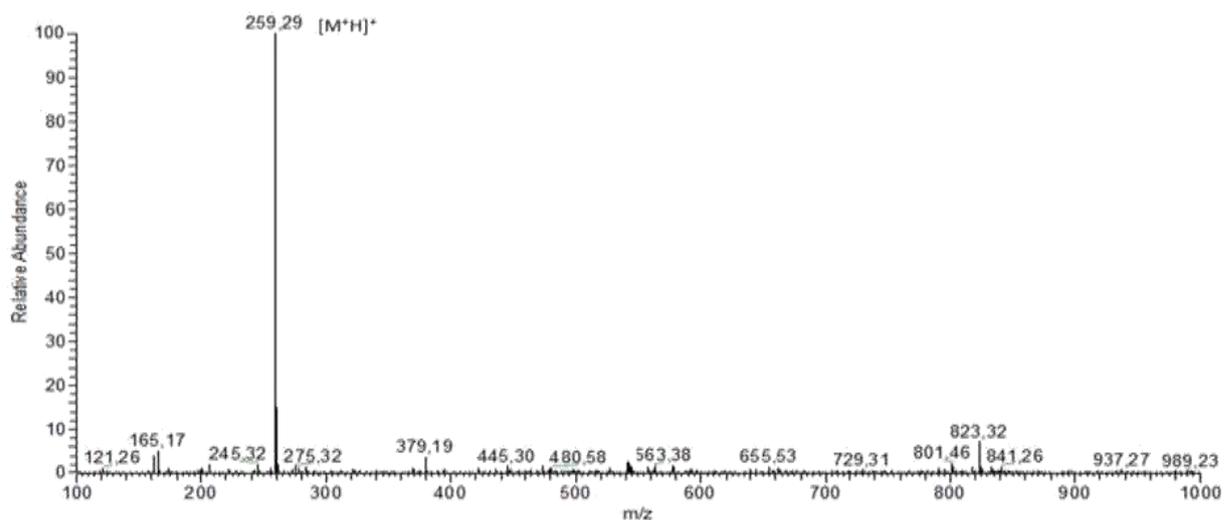


Figura 35. Espectro de massas no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ do derivado LP17.

5.6.3. Síntese do LP18

Na síntese do LP18, 2,2-dimetil-5,6-dioxo-3,4,5,6-tetraidro-2H-benzo(h)piran-3-sulfônico, após a purificação foram obtidos cristais de coloração vermelha com rendimento de 46% e fator de retenção em CCD de 0,42 na fase móvel contendo hexano e acetato de etila (2:8). O derivado possui como fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{S}$ e ponto de fusão de $326,62\text{ }^\circ\text{C}$.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm estão dispostos na figura 36.

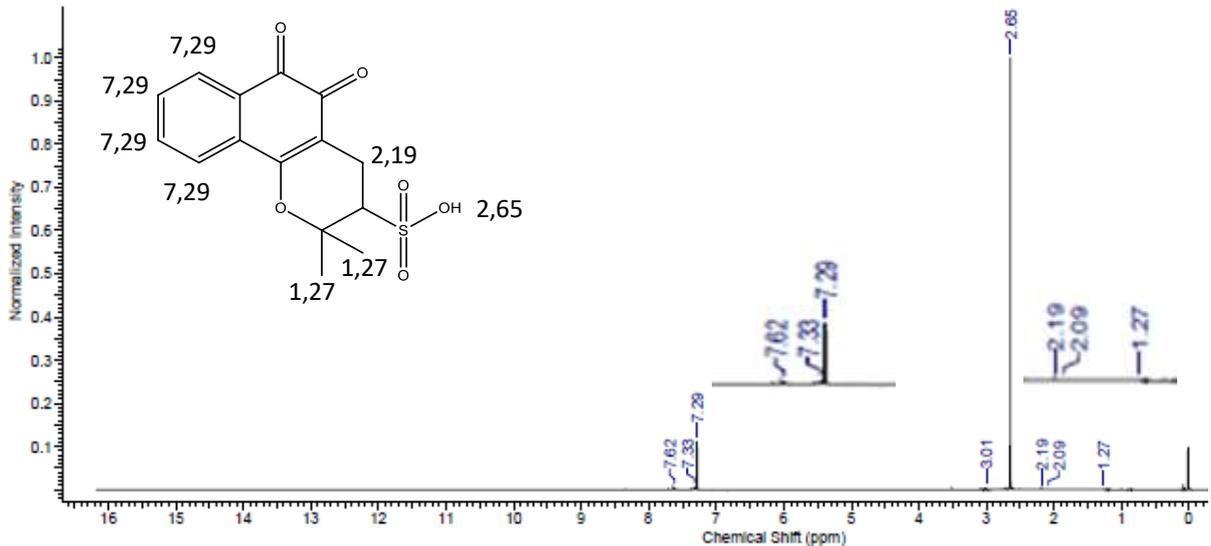


Figura 36. Espectro RMN de ^1H do derivado LP18.

O peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 322,05 g/mol. Assim, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 37) revelou a presença de um pico base de m/z 321,30 29 conferindo com a massa da molécula desejada.

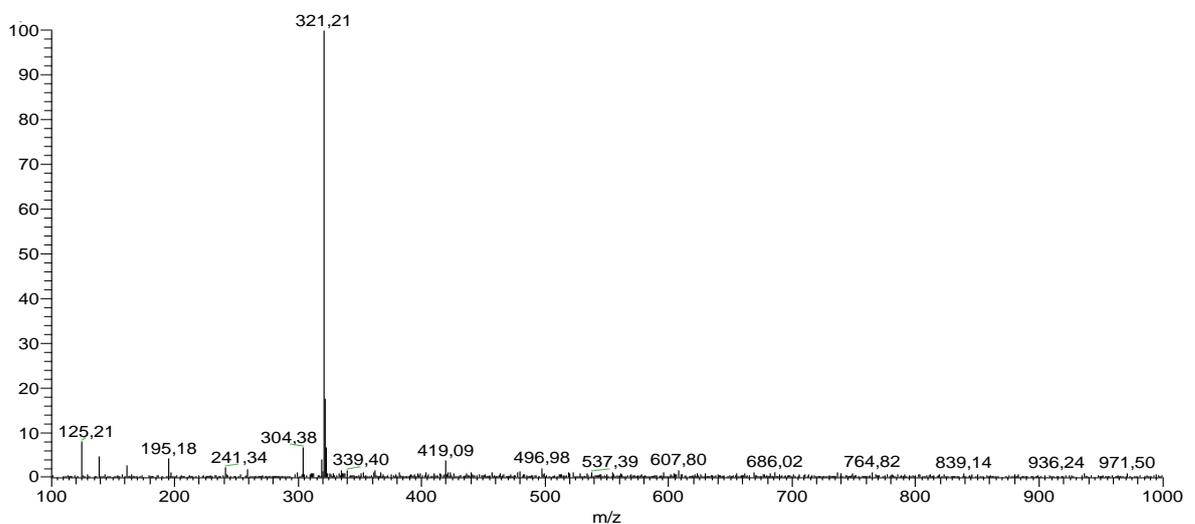


Figura 37. Espectro de massas no modo positivo $[\text{M}-\text{H}]^+$ do derivado LP18.

5.6.4. Síntese do LP20

Na síntese do LP20, (Z)-2-(2,2-dimetil-6-oxo-3,4-diidro-2H-benzo[h]piran-5(6H)-ilideno)hidrazinacarboximidamida, após a purificação foi obtido um sólido amorfo de coloração vermelha com rendimento de 63% e fator de retenção de 0,23 em CCD contendo como fase móvel o acetato de etila e metanol (8:2). O derivado possui como fórmula molecular $C_{16}H_{18}N_4O_2$.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de 1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN 1H ($CD_3(2SO)$) δ ppm estão dispostos na figura 38.

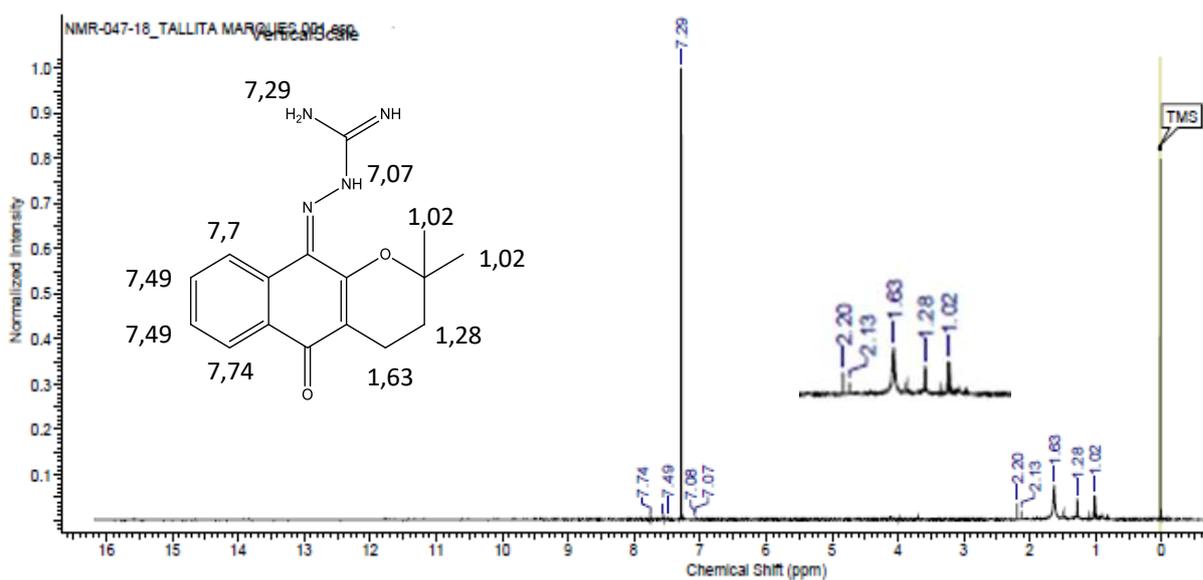


Figura 38. Espectro RMN de 1H da molécula LP20 obtido no equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz).

O peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 298,14 g/mol. Assim, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 39) revelou a presença de um pico base de m/z 299,27 conferindo com a massa da molécula desejada.

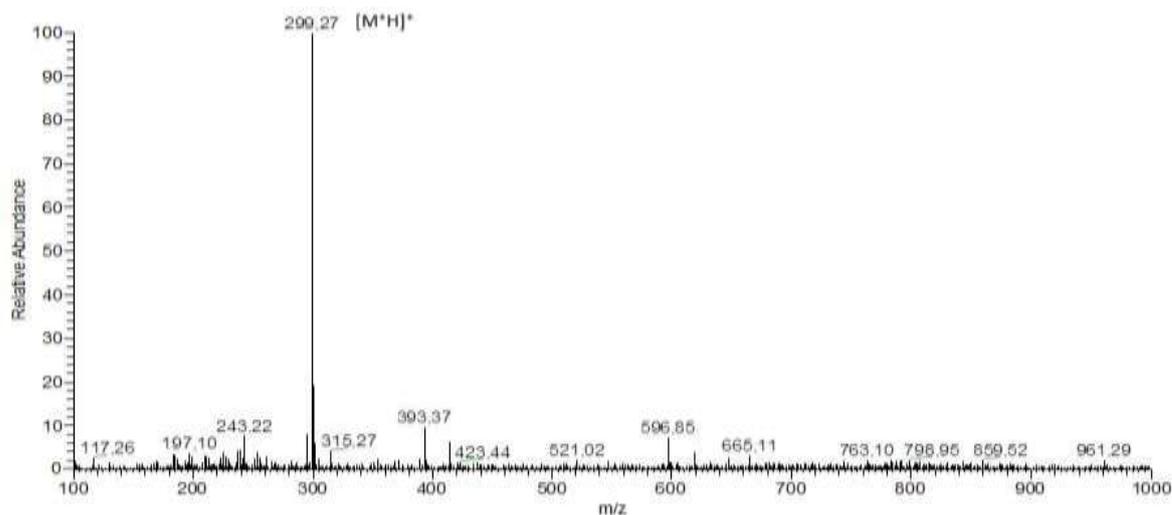


Figura 39. Espectro de massas do derivado LP20 obtida no modo positivo $[M+H]^+$.

5.6.5. Síntese do LP23

Na síntese do LP23, 2-(3,5-dinitrofenil)(hidroxi)metóxi)-3-(3metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona, após a purificação foi obtido um cristal de coloração amarela com rendimento de 17% e fator de retenção de 0,36 em CCD na fase móvel contendo acetato de etila e hexano (6:4). O derivado possui como fórmula molecular $C_{22}H_{16}N_2O_8$.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de 1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN 1H ($CDCl_3$) δ ppm estão dispostos na figura 40.

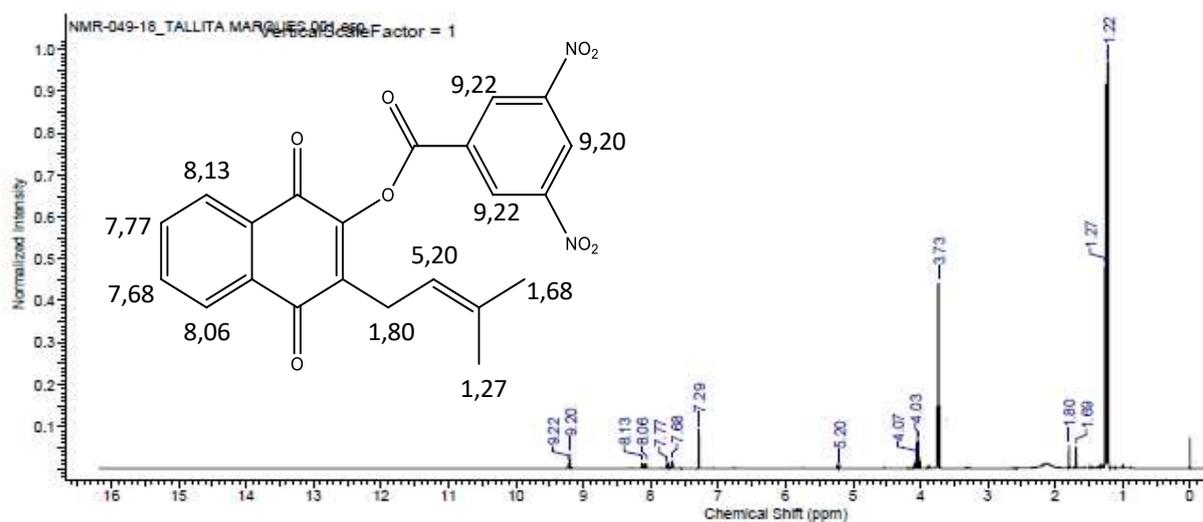


Figura 40. Espectro RMN de 1H da molécula LP23.

A molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 41) revelou a presença de um pico base de m/z 505,29 sendo acima da massa molecular esperada, embora os deslocamentos químicos do RMN ^1H confirmam com a molécula desejada. Isto pode ser explicado, devido à formação de adutos de sódio com o íon (representados com as setas), conferindo assim o acréscimo de massa.

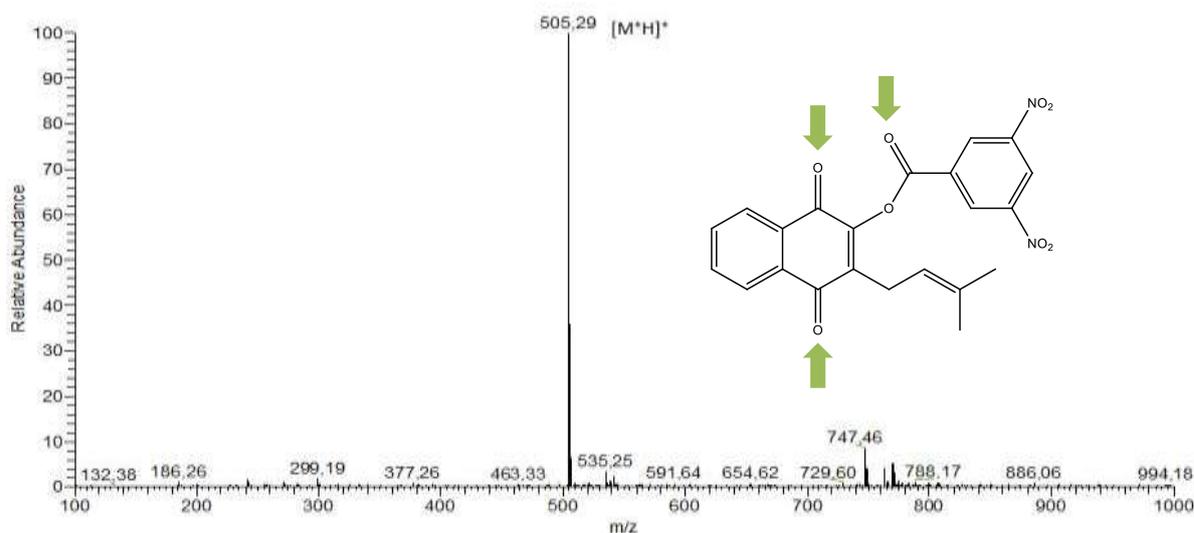


Figura 41. Espectro de massas do derivado LP23 obtida no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ com os adutos de sódio representados pelas setas verdes $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5.6.6. Síntese do LP24

Na síntese do LP24, 2-hidroxi-(2-hidroxifenil)-metóxi-3-(3metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona, após a purificação foi obtido um cristal de coloração amarela com rendimento de 21% e fator de retenção de 0,41 na fase móvel contendo acetato de etila e hexano (8:2). A molécula possui como fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_5$.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm estão dispostos na figura 42.

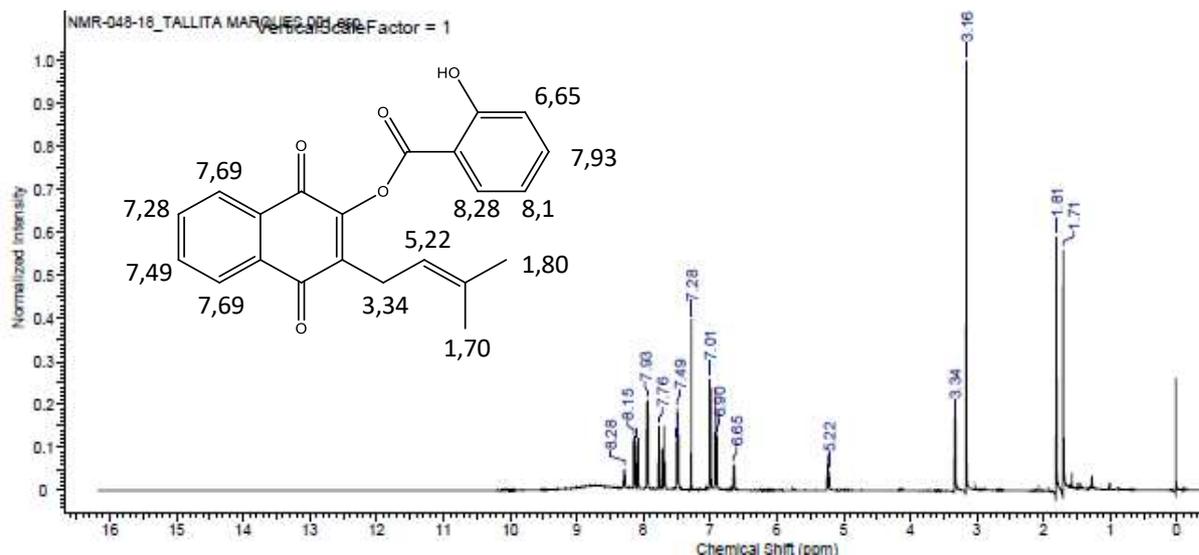


Figura 42. Espectro RMN de ^1H da molécula LP24.

A molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 43) revelou a presença de um pico base de m/z 333,22.

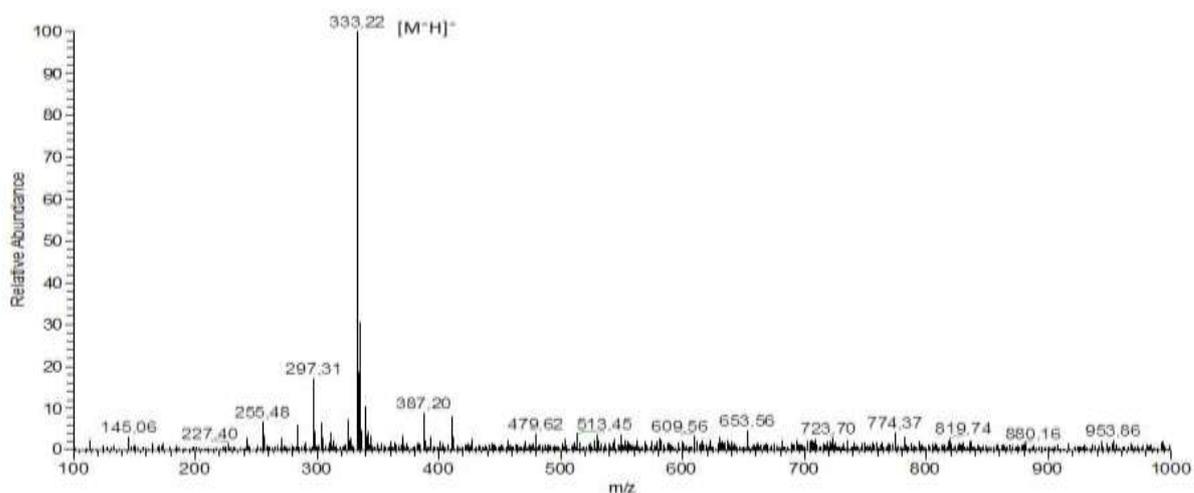


Figura 43. Espectro de massas do derivado LP24 obtida no modo negativo $[\text{M-H}]^-$.

5.6.7. Síntese do LP25

Na síntese do LP25, E-2-2-dimetil-5-oxo-3,4-hidrido-2H-benzo(g)piran-10-5H-ilideno-hidrazinacarboxiimida, após a purificação foi obtido um cristal de coloração amarela com rendimento de 21% e fator de retenção de 0,41 na fase móvel contendo acetato de etila:hexano (8:2). A molécula possui como fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H ($\text{CD}_3(2\text{SO})$) δ ppm estão dispostos na figura 44.

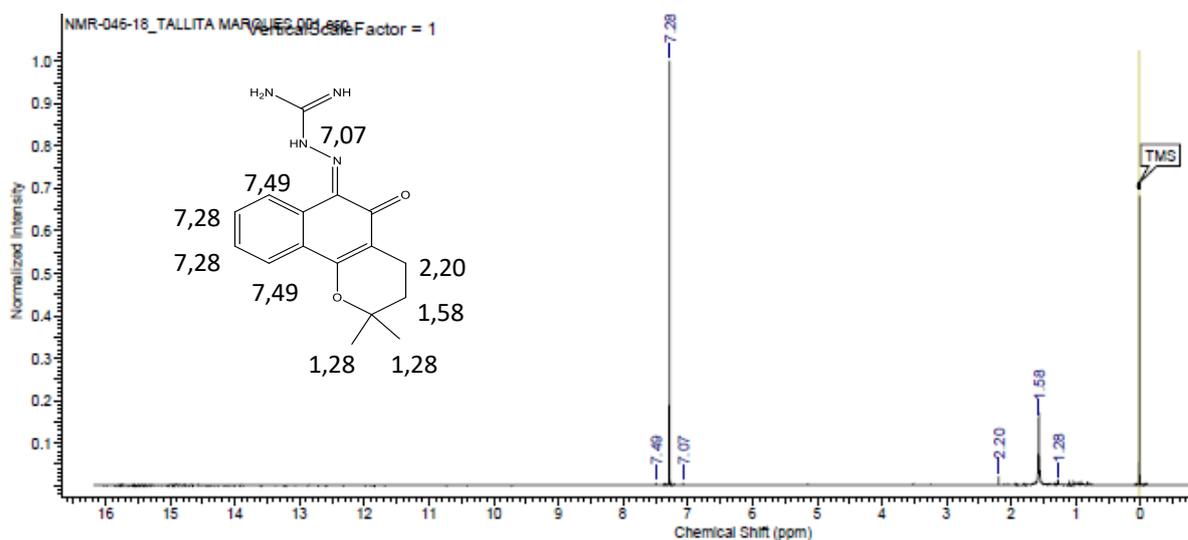


Figura 44. Espectro RMN de ^1H do derivado LP25.

O peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 298,14 g/mol. Assim, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 45) revelou a presença de um pico base de m/z 299,21 conferindo com a massa da molécula desejada.

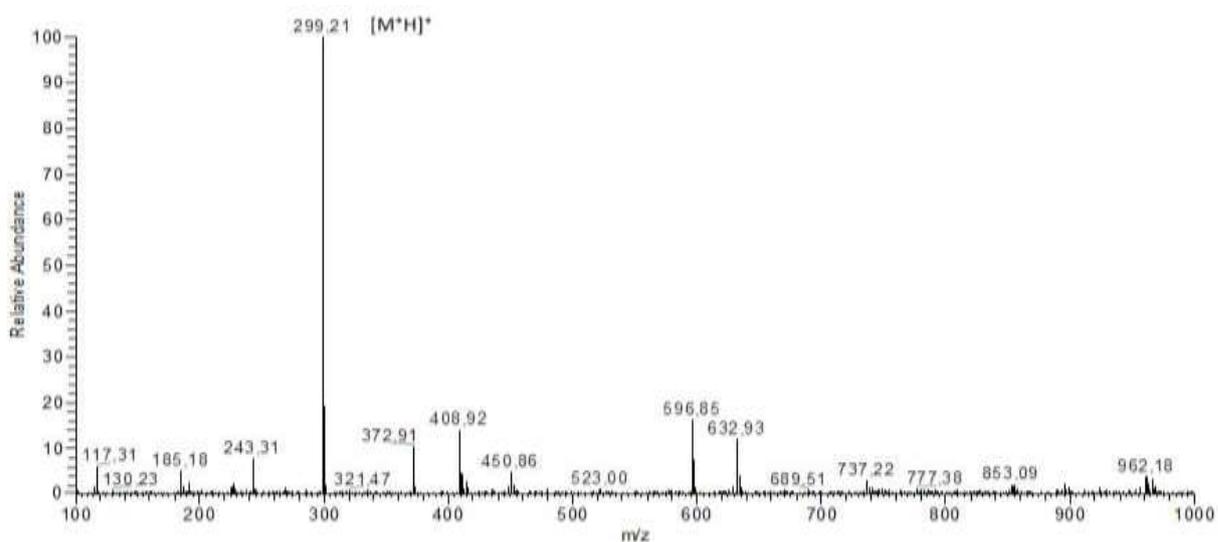


Figura 45. Espectro de massas do derivado LP25 obtida no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.5.8. Síntese do UMB22 e UMB24

Na realização da semissíntese, pode-se observar que não houve a formação do triazol dos derivados UMB22 e UMB24 devido à ausência de sinais deslocamentos químicos na análise de ^1H por RMN que fosse indicativo destas moléculas bem como no pico base na análise de espectrometria de massas, podendo estar relacionado a não redução do grupo $-\text{NO}_2$ para $-\text{NH}_2$, etapa necessária para a formação da azida. Já no derivado UMB25, a não formação do triazol pode estar relacionada a não formação da azida a partir da 2,4-dinitrofenilhidrazina, visto que houve a formação do alcino a partir da umbeliferona, apresentando deslocamentos químicos no RMN de ^1H compatíveis.

5.6.9. Síntese do UMB25

Na síntese do UMB25, 2,2-difluor-2H-benzopirano-7-ol, após purificação, foi obtido um sólido amorfo de coloração branca com rendimento de 35% e fator de retenção de 0,49 na fase móvel contendo clorofórmio e metanol (9,5:0,5). Apresentando como fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_6\text{F}_2\text{O}_2$ e ponto de fusão de $135,18\text{ }^\circ\text{C}$.

Para a confirmação estrutural, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e espectrometria de massas. Os deslocamentos químicos obtidos no RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm estão dispostos na figura 46.

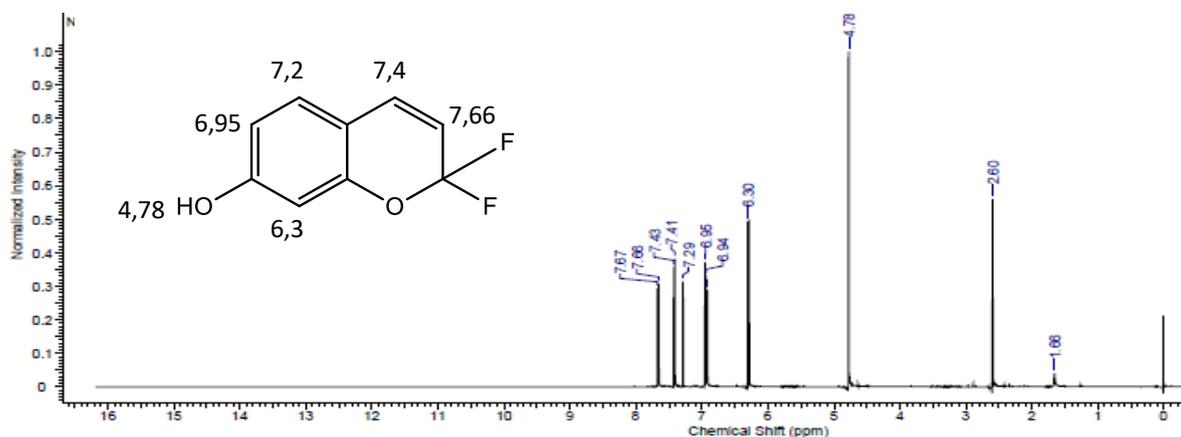


Figura 46. Espectro RMN de ^1H do derivado UMB25.

O peso molecular esperado para esta substância era, aproximadamente, de 184,03 g/mol. Assim, a molécula foi submetida à análise por espectrometria de massas, e o espectro de íons totais (Figura 47) revelou a presença de um pico base de m/z 185,14 conferindo com a massa da molécula desejada.

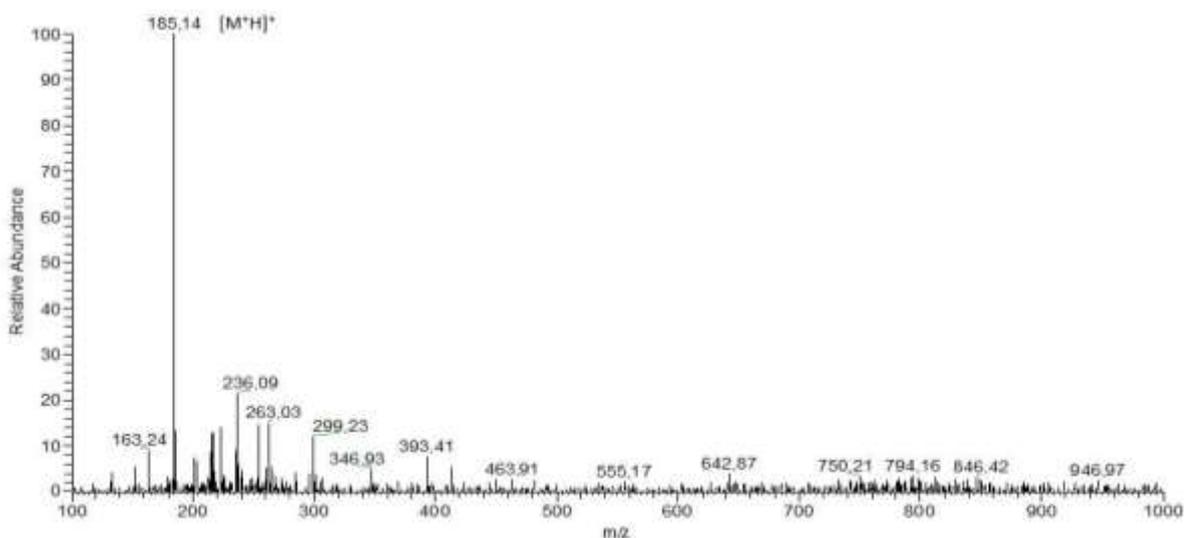


Figura 47. Espectro de massas do derivado UMB25 obtida no modo positivo $[M+H]^+$.

5.7. Avaliação da citotoxicidade

O efeito das moléculas sintetizadas sob a viabilidade celular foi realizado nas linhagens de células MCF-7, HCT 116, SK-Mel 19, HepG2, MES-SA/DX5 e MRC-5, utilizando o ensaio do Alamar blue, estão representados na tabela 6. Assim, todas as moléculas obtidas foram avaliadas em concentração única (20 μ M), prosseguindo no estudo somente as que apresentassem uma redução da viabilidade celular menor que 10% para que as moléculas sejam consideradas potenciais candidatas a fármacos anticâncer precisam apresentar citotoxicidade em células neoplásicas.

A partir dos resultados do, as amostras com viabilidade celular foram selecionadas para realização de diluições sucessivas para obtenção da curva e cálculo da CI_{50} (concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%).

Os derivados do lapachol apresentaram valores de CI_{50} variando entre 4,88 a 10,57 μM na linhagem MRC-5 e para as linhagens tumorais os valores de CI_{50} variaram entre 2,41 a 18,68 μM . Enquanto que não foi possível calcular o valor de CI_{50} para os derivados da umbeliferona, visto que a maior concentração testada não reduziu a viabilidade celular em 50%. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e também apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens celulares tumorais testadas (tabela 6).

Tabela 6.- Efeito dos derivados da umbeliferona e lapachol na viabilidade celular de linhagens tumorais e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 72h. Os valores estão representados como CI50 (intervalo de confiança de 95%).

Molécula	CI ₅₀ (µM)				
	MRC-5	MCF-7	HCT116	SK-Mel 19	MES-SA/DX5
LP04	10,57 (8,86-12,60)	8,20 (7,42-9,07)	18,68 (16,90-20,66)	>20	>20
LP17	4,88 (4,09-5,82)	2,41 (2,27-2,55)	5,40 (4,67-6,24)	>20	>20
LP18	9,26 (8,10-10,58)	3,71 (3,48-3,95)	9,22 (8,96-9,50)	>20	>20
LP20	6,16 (5,69-6,67)	3,88 (3,42-4,41)	7,50 (7,38-7,66)	>20	>20
LP23	>20	>20	>20	>20	>20
LP24	>20	>20	>20	>20	>20
LP25	10,56 (9,73-11,46)	4,33 (3,72-5,03)	6,85 (5,69-8,24)	>20	>20
UMB25	>20	>20	>20	>20	>20
Lapachol	>20	>20	>20	>20	>20
Umbeliferona	>20	>20	>20	>20	>20
Doxorrubicina	0,14 (0,10-0,17)	0,84 (0,50-1,43)	0,52 (0,27-0,97)	0,45 (0,36-0,55)	0,42 (0,20-0,87)

Tabela 7. Efeito dos derivados do lapachol na viabilidade celular de linhagens tumorais (MCF-7 e HCT116) e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 24h. Os valores estão representados como CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

Molécula	CI_{50} (μ M)		
	MRC-5	MCF-7	HCT116
LP04	17,16 (15,51-18,98)	14,28 (12,68-16,09)	>20
LP17	9,68 (7,70-12,17)	4,90 (4,23-5,67)	8,86 (7,82-10,04)
LP18	15,96 (14,52-17,56)	14,03 (12,30-16,01)	12,69 (12,12-13,28)
LP20	12,41 (10,18-15,14)	11,08 (9,70-12,65)	14,75 (12,86-16,91)
LP25	15,46 (13,54-17,66)	13,49 (12,19-14,94)	10,01 (8,88-11,27)
Doxorrubicina	3,90 (3,15-4,83)	1,97 (0,95-2,09)	3,32 (1,83-6,02)

Tabela 8. Efeito dos derivados do na viabilidade celular de linhagens tumorais (MCF-7 e HCT116) e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue no tempo de tratamento de 48h. Os valores estão representados como CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

Molécula	CI_{50} (μ M)		
	MRC-5	MCF-7	HCT116
LP04	14,10 (11,81-16,84)	11,71 (10,94-12,54)	>20
LP17	7,75 (6,25-9,08)	3,72 (3,46-3,98)	7,32 (6,58-8,14)
LP18	12,98 (11,84-14,24)	9,48 (7,94-11,33)	10,68 (10,34-11,03)
LP20	8,21 (6,70-10,08)	6,63 (5,66-7,75)	11,11 (10,53-11,74)
LP25	13,28 (10,04-17,56)	8,10 (7,23-9,08)	9,33 (8,56-10,18)
Doxorrubicina	1,10 (0,59-1,71)	1,39 (0,56-2,45)	1,00 (0,78-1,27)

De acordo com os valores obtidos de CI_{50} nas linhagens tumorais no tempo de 72 horas, selecionou-se as moléculas para os testes posteriores, e calculou-se a viabilidade celular nos tempos de 24 horas (tabela 7) e 48 horas (tabela 8) para os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25.

Ao analisar a atividade citotóxica dos derivados de lapachol sobre as células normais de fibroblasto humano (MRC5), observou-se, que em todos os tempos analisados, os derivados apresentaram um efeito citotóxico menor quando comparado a doxorrubicina. Além

disso, pode-se observar que a citotoxicidade aumentou de forma gradual conforme maior o tempo de exposição às substâncias.

5.8. Avaliação da genotoxicidade

5.8.1. Ensaio do cometa neutro e alcalino

A avaliação da atividade genotóxica de indução de dano ao DNA de quebra de fita simples e dupla foi avaliada pelo ensaio do cometa alcalino e neutro, avaliando o dano induzido pelos derivados em células não neoplásicas (MRC-5) nas concentrações de 5, 10 e 20 μM por análise comparativa do índice de dano (ID) ao DNA.

Nos resultados obtidos referentes ao cometa neutro na linhagem MRC-5, após o tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 no tempo de 3 h de incubação, observou-se que em todas as concentrações avaliadas houve a indução de dano ao DNA quando comparadas ao grupo controle (DMSO). Porém, em relação ao controle positivo, doxorrubicina (5 μM), todas as substâncias apresentaram menor índice de dano em todas as concentrações avaliadas (figura 48).

Em todas as concentrações, foi observado uma maior frequência nos danos do tipo 1 e 2. A doxorrubicina (5 μM) causou maior frequência de dano do tipo 2, 3 e 4.

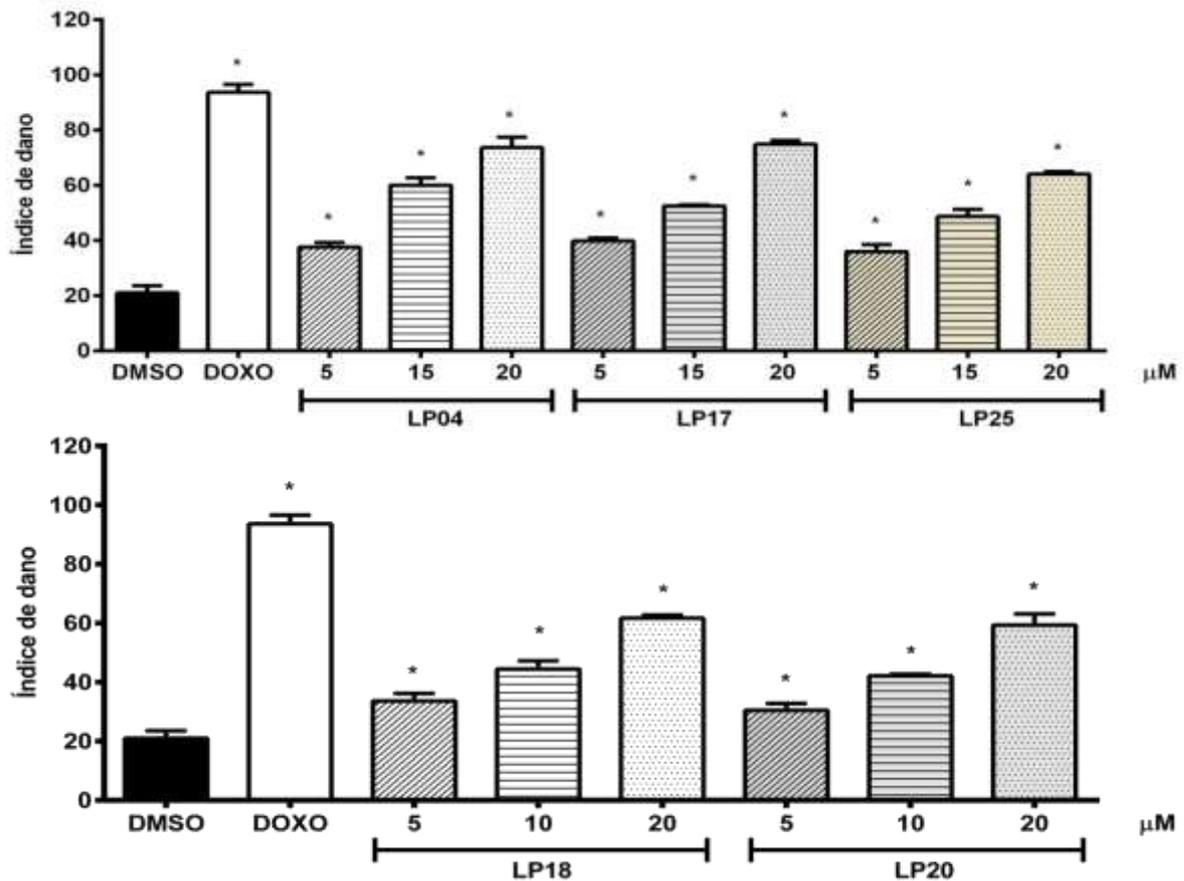


Figura 48. Índice de dano ao DNA em células MRC-5 após 3h de tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA one way seguido de teste Bonferroni.

Nos resultados obtidos na análise do cometa alcalino, observou-se que em todas as concentrações avaliadas (5, 10 e 20 μM) houve a indução de dano ao DNA quando comparadas ao grupo controle (DMSO). Porém, em relação ao controle positivo, doxorrubicina (5 μM), as substâncias LP17 e LP18 na concentração de 20 μM apresentou maior intensidade no dano observado com a doxorrubicina (figura 49).

Em todas as concentrações avaliadas, os tipos de danos mais frequentes foram o tipo 1 e 2, o mesmo foi observado com a doxorrubicina (5 μM).

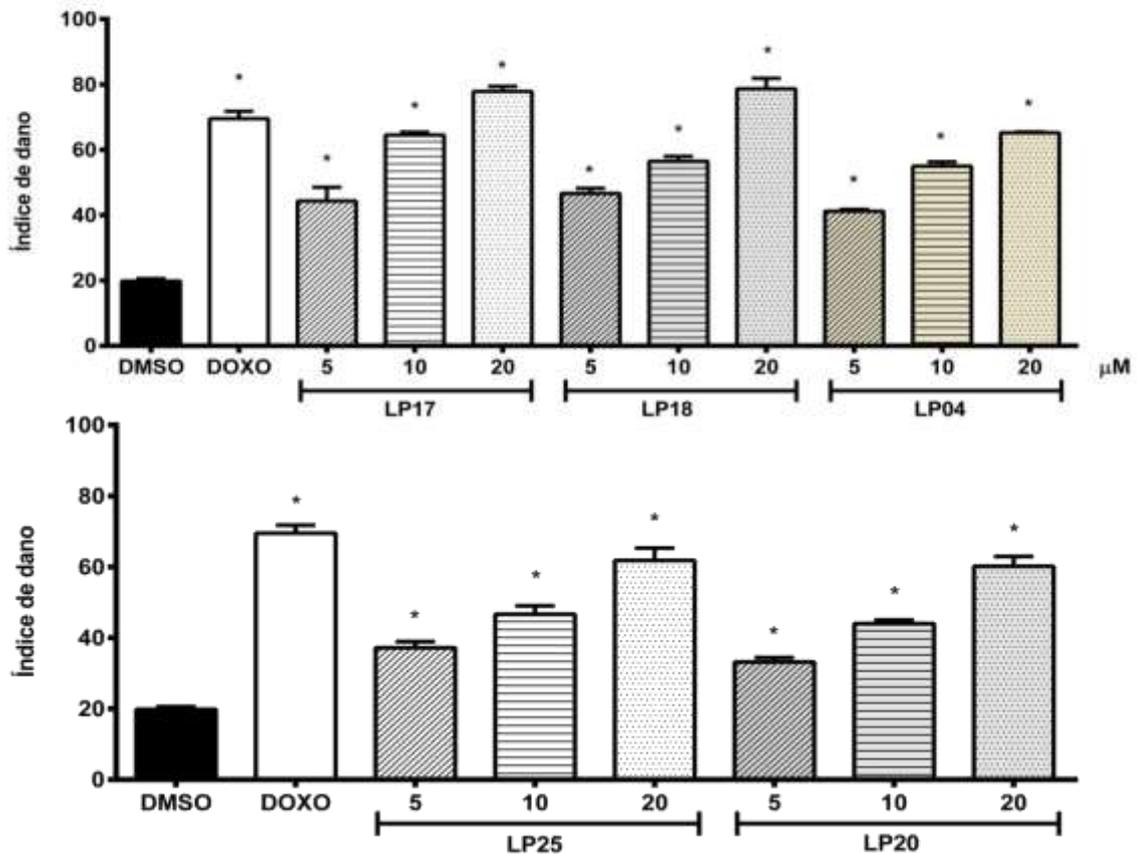


Figura 49. Índice de dano ao DNA em células MRC-5 após 3h de tratamento com as substâncias LPO4, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA one way seguido de teste Bonferroni.

A partir dos resultados obtidos, os derivados apresentaram tanto quebras de fita simples quanto quebras de fita dupla de DNA pelo ensaio do cometa em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 µM) de modo concentração-dependente.

5.8.2. Detecção do dano induzido por inibidores da topoisomerase

A avaliação da detecção do dano induzido por inibidores da topoisomerase foi realizado pela indução de dano ao DNA de quebra de fita simples (topoisomerase I) e dupla (topoisomerase II), sendo avaliado pelo ensaio do cometa alcalino e neutro sob ação da proteinase K nas células das linhagens tumorais MCF-7 e HCT116.

Nos resultados obtidos referentes ao cometa neutro na linhagem MCF7, após o tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 no tempo de 3 h de incubação, observou-se que em todas as concentrações avaliadas houve a indução de dano ao DNA quando comparadas ao grupo controle. Porém, ao avaliar o cometa onde houve a adição da proteinase K, observou-se que houve aumento no dano ao DNA de forma significativa ($p < 0,05$) no tratamento com todas as substâncias, sendo que somente a LP20 na concentração de 7,5 μM não apresentou diferença significativa. Em relação ao controle positivo, doxorrubicina, todas as substâncias apresentaram menor índice de dano em todas as concentrações avaliadas (figura 50).

Nas concentrações de 7,5 μM e 15 μM , os tipos de danos mais frequentes foram do tipo 0, 1 e 2, enquanto que na concentração de 30 μM foi observada uma frequência de dano do tipo 1, 2 e 3, onde o mesmo foi observado com a doxorrubicina.

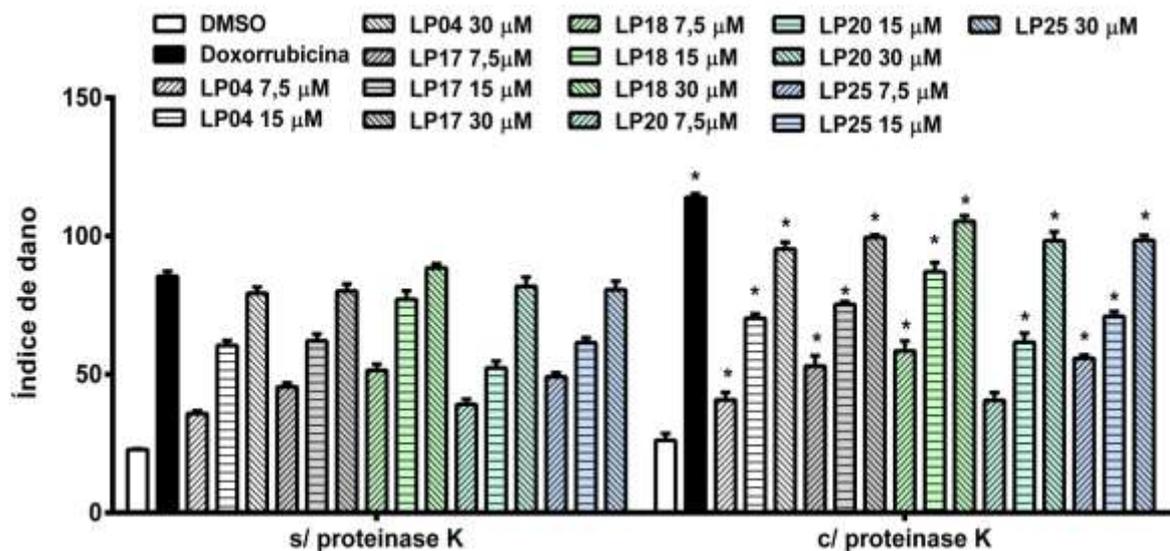


Figura 50. Índice de dano ao DNA em células MCF7 após 3h de tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro sem e com adição da proteinase K. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

Nos resultados obtidos referentes ao cometa alcalino na linhagem MCF7, após o tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 no tempo de 3 h de

incubação, observou-se que em todas as concentrações avaliadas houve a indução de dano ao DNA quando comparadas ao grupo controle. Porém, ao avaliar o cometa com e sem a adição da proteinase K, observou-se que houve aumento no dano ao DNA de forma significativa ($p < 0,05$) no tratamento com todas as substâncias, sendo que somente a LP04, LP20 e LP25 na concentração de 7,5 μM não apresentou diferença significativa. Em relação ao controle positivo, doxorubicina, todas as substâncias nas concentrações de 15 e 30 μM apresentaram maior índice de dano (figura 51).

Em relação a frequência de dano, nas concentrações de 7,5 μM e 15 μM , os tipos de danos mais frequentes foram do tipo 0, 1 e 2, enquanto que na concentração de 30 μM foi observado uma frequência de dano do tipo 1, 2 e 3. Já no controle positivo, doxorubicina, observou-se uma frequência de dano do tipo 1, 2 e 3.

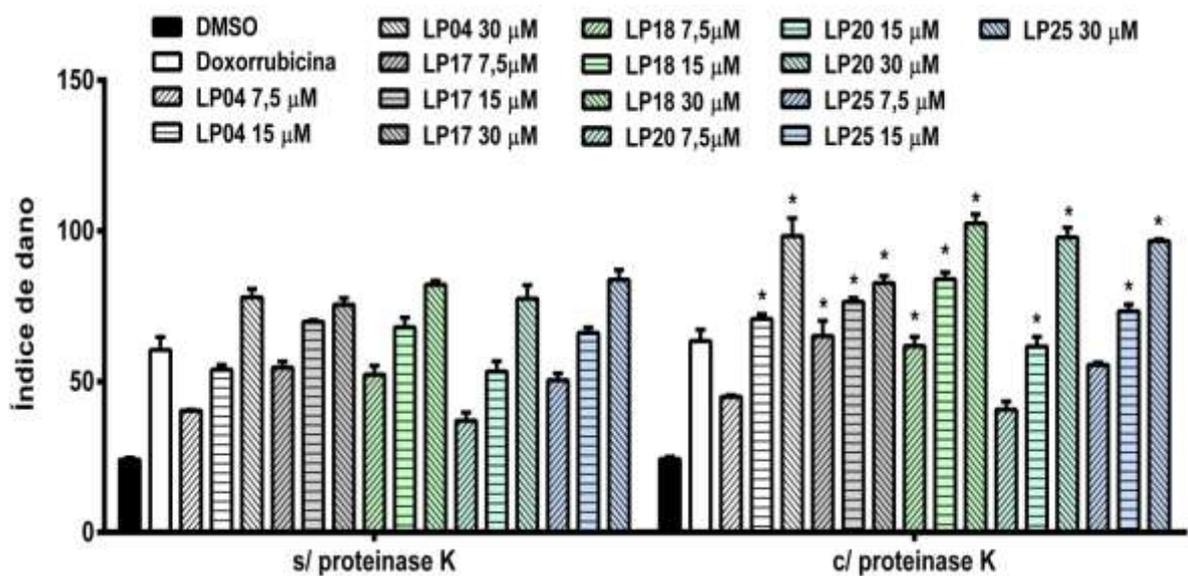


Figura 51. Índice de dano ao DNA em células MCF7 após 3h de tratamento com os derivados LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino com e sem adição da proteinase K. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

Nos resultados obtidos referentes ao cometa neutro na linhagem HCT116, após o tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 no tempo de 3 h de incubação, observou-se que em todas as concentrações avaliadas houve a indução de dano ao

DNA quando comparadas ao grupo controle. Porém, ao avaliar o cometa com e sem a adição da proteinase K, observou-se que houve aumento no dano ao DNA de forma significativa ($p < 0,05$) no tratamento com todas as substâncias na concentração de 30 μM . LP04 e LP20 não apresentaram diferença significativa na concentração de 7,5 μM e 15 μM , bem como o LP18 e LP25 na concentração de 7,5 μM . Em relação ao controle positivo, doxorrubicina, todas as substâncias apresentaram menor índice de dano em todas as concentrações avaliadas (figura 52).

Nas concentrações de 7,5 μM e 15 μM , os tipos de danos mais frequentes foram do tipo 0, 1 e 2, enquanto que na concentração de 30 μM foi observado uma frequência de dano do tipo 1, 2 e 3, onde o mesmo foi observado com a doxorrubicina.

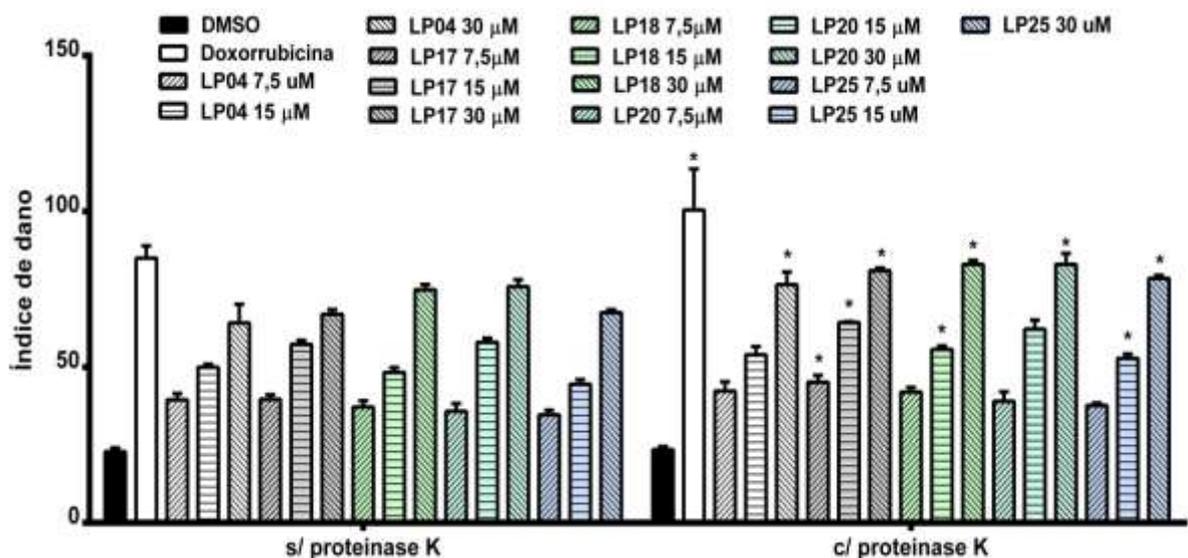


Figura 52. Índice de dano ao DNA em células HCT116 após 3h de tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa neutro com e sem adição da proteinase K. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

Nos resultados obtidos referentes ao cometa alcalino na linhagem HCT116, após o tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 no tempo de 3 h de incubação, observou-se que em todas as concentrações avaliadas houve a indução de dano ao DNA quando comparadas ao grupo controle. Porém, ao avaliar o cometa com e sem a adição

da proteinase K, observou-se que houve aumento no dano ao DNA de forma significativa ($p < 0,05$) no tratamento com todas as substâncias, sendo que LP18 e LP20 não apresentaram diferença significativa na concentração de 7,5 μM . Em relação ao controle positivo, doxorrubicina, todas as substâncias na concentração de 30 μM apresentaram maior índice de dano (figura 53).

Em todas as concentrações avaliadas, os tipos de danos mais frequentes foram do tipo 0, 1 e 2, onde o mesmo foi observado com a doxorrubicina.

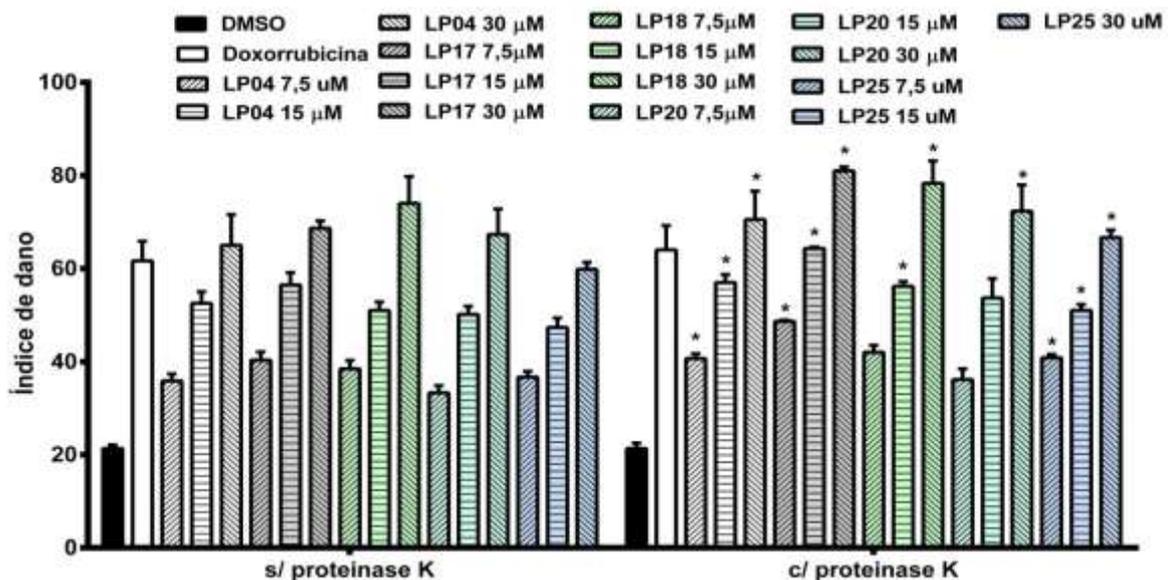


Figura 53. Índice de dano ao DNA em células HCT116 após 3h de tratamento com as substâncias LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25 observados no cometa alcalino com e sem adição da proteinase K. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO por ANOVA two way seguido de teste Bonferroni.

5.8.3 Expressão gênica da topoisomerase I e II

Foi realizado a análise da expressão dos genes TOP1M, TOP2A, TOP2B nas linhagens MCF7 e HCT116 após o tratamento com os derivados LP17, LP20 e LP25.

No tratamento com o derivado LP25 na linhagem HCT116, só foi possível observar a detecção da expressão dos genes de topoisomerase I, II alfa e II beta nas concentrações de 7,5 μM e 15 μM (figura 54), não sendo possível detectar a expressão no tratamento com 30 μM .

Nas concentrações analisadas, observou-se uma redução na expressão dos genes da topoisomerase com o aumento da concentração do derivado, embora não tenha ocorrido de forma significativa ($p < 0,05$).

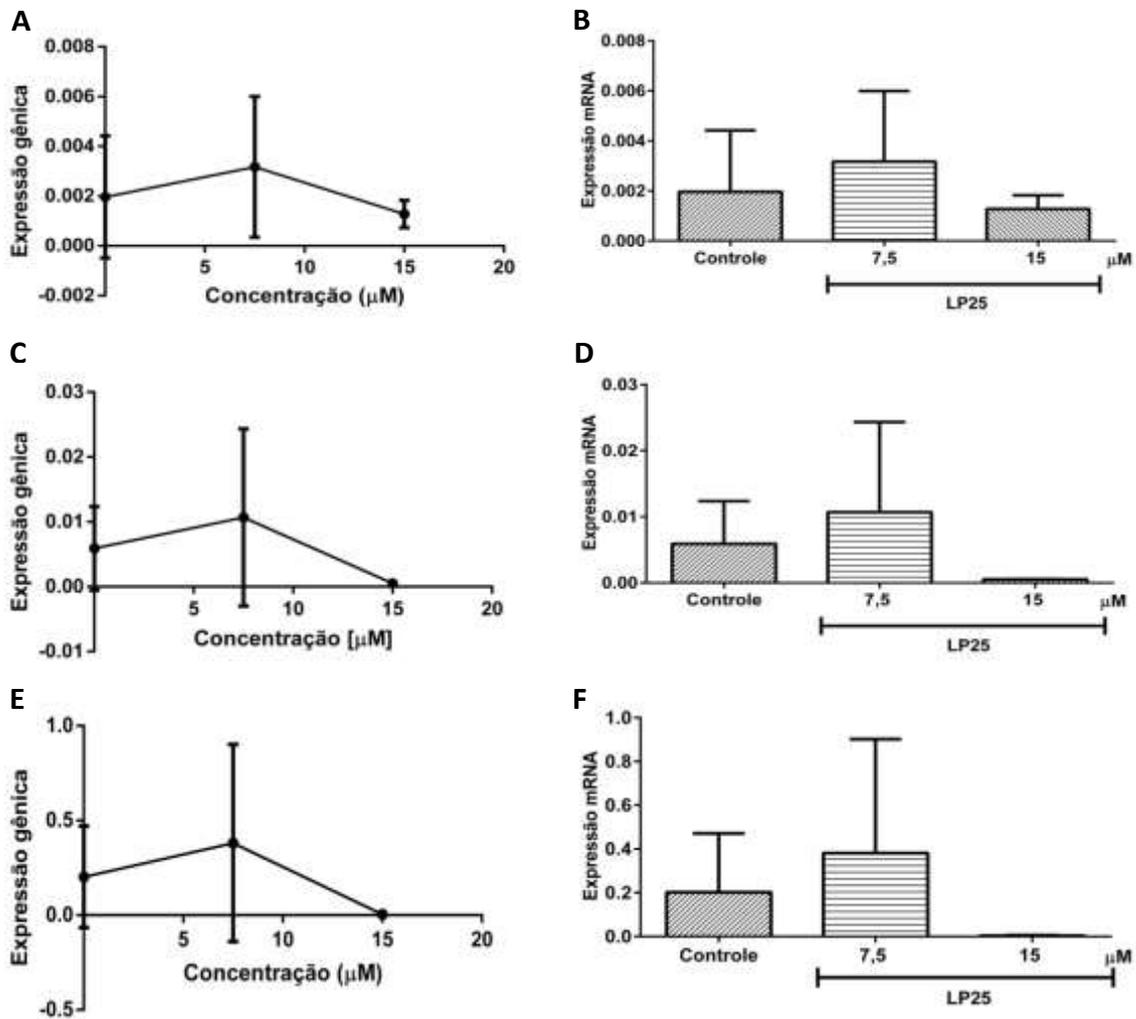


Figura 54. Expressão da topoisomerase I (A e B), topoisomerase II alfa (C e D) e topoisomerase II beta (E e F) após o tratamento com o derivado LP25.

Na análise com os derivados LP17 e LP20, não se observou a detecção dos genes estudados, podendo estar relacionada a erros durante o procedimento de conversão do RNA para o cDNA e/ou durante a análise da qPCR..

6. DISCUSSÃO

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos é um processo demorado, podendo ter muitos fatores responsáveis pelo seu insucesso, como falta de eficácia, efeitos colaterais, farmacocinética deficiente e razões comercializáveis (WADOOD et al., 2013). Assim, a utilização de metodologias *in silico* tem sido cada vez mais utilizada no planejamento de fármacos de modo a evitar ou reduzir tais problemas (ROGNAN, 2017; WOLF et al., 2010).

Assim, neste trabalho, optou-se por utilizar o estudo *in silico* com o intuito de selecionar possíveis inibidores da topoisomerase a partir de uma série de derivados do lapachol e da umbeliferona, de modo que permitisse uma modificação estrutural direcionada e um aumento da probabilidade de obtenção de moléculas bioativas, utilizando tanto a ancoragem molecular quanto as análises das propriedades moleculares, toxicológicas e farmacocinéticas, visto que um potencial candidato a fármaco, além de possuir atividade farmacológica, necessita possuir boas propriedades farmacocinéticas e baixa toxicidade (MABKHOT et al., 2016).

Propriedades como a lipofilicidade, peso molecular e flexibilidade rotacional influenciam na ação biológica de moléculas *in vivo*, sendo seu estudo prévio importante, seja para transpor barreiras em processos biológicos para que a molécula alcance o sítio ativo obtendo uma boa biodisponibilidade, como na própria interação com o receptor (BAKHT et al., 2010). Assim, a lipofilicidade é um parâmetro de grande importância, sendo um dos descritores mais relevantes a ser aplicado em estudos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (KOSMALSKI et al., 2017; LIANG; QIAO; LIAN, 2017), e uma característica chave para avaliar a permeabilidade na membrana plasmática.

Dentre todas as moléculas propostas, somente o LP18 e UMB16 apresentaram Log P abaixo de zero indicando um caráter hidrofílico, podendo inferir que estas moléculas não

sejam capazes de se difundir passivamente pelas membranas, além de possuírem baixa permeabilidade pelo trato gastrointestinal e serem mais suscetíveis ao *clearance* renal (LAGORCE et al., 2017; TSAIOUN; KATES, 2011). Enquanto que a maioria dos derivados apresentaram Log P que variou de 0 a 4, estando dentro de um limite que permite inferir que os mesmos sejam capazes de penetrar através das biomembranas (PARAMASHIVAM et al., 2015). Quando comparados com a doxorrubicina, fármaco antineoplásico e inibidor da topoisomerase, todas as substâncias propostas apresentaram um comportamento mais lipofílico, visto que a doxorrubicina apresenta uma natureza polar com Log P de 0,57, valor este, que corrobora com dados encontrados na literatura (AMIJI, 2007).

Além da lipofilicidade, outro fator que pode afetar a permeabilidade de compostos bioativos é o peso molecular, que não deve ultrapassar 500 Da, tornando-se desfavorável para moléculas grandes a difusão passiva pelas membranas celulares (LIPINSKI, 2004; TIHANYI; VASTAG, 2011), além de afetar vários eventos moleculares, como a absorção, taxa de eliminação da bile, penetração na barreira hemato-encefálica e a própria interação com os alvos biológicos (LAGORCE et al., 2017). Assim, todos os derivados apresentaram massa molecular abaixo de 500 Da, o que indica que podem ser facilmente transportados, difundidos e absorvidos (PARAMASHIVAM et al., 2015).

Outro parâmetro importante relacionado à polaridade e a permeabilidade dos compostos, é o número de receptores de ligação de hidrogênio (átomos de oxigênio e nitrogênio) e o número de doadores de ligação de hidrogênio (NH e OH) (ALEX et al., 2011). A partir dos resultados obtidos, os compostos analisados estavam dentro do limite aceito por Lipinski, apresentando um número de receptores de ligação de hidrogênio menor que 10 e número de doadores de ligação de hidrogênio menor que 5 (LIPINSKI, 2004). Segundo o estudo de Lagorce e colaboradores (2017), o número de doadores de ligação de hidrogênio pode ser mais importante quando comparado ao número de aceptores de ligação de hidrogênio

para o desenvolvimento de fármacos, estando relacionado com a biodisponibilidade da molécula.

O TPSA também demonstrou ser um descritor importante para a caracterização da absorção de fármacos, incluindo a absorção intestinal, biodisponibilidade, permeabilidade pelas células Caco-2 e penetração da barreira hemato-encefálica (AHSAN et al., 2012; PARAMASHIVAM et al., 2015). Todos os derivados propostos apresentaram TPSA abaixo de 130 \AA^2 não violando a regra de Lipinski, além disso, moléculas que apresentam $\text{TPSA} \leq 160 \text{ \AA}^2$ possuem boa absorção intestinal (DA SILVA et al., 2015). Características estas que corroboram com a boa absorção intestinal e permeabilidade pelas células Caco-2 observadas nos estudos *in silico*.

Todos os derivados propostos exibiram uma taxa de absorção que variou de 70% a 100% indicando boa biodisponibilidade, características que podem ser observadas em compostos com ligações rotativas menores ou iguais a 10 e o TPSA menor ou igual a 140 \AA^2 , visto que a medida que o número de ligações rotativas aumentam, a molécula torna-se mais flexível e mais adaptável para uma interação eficiente com um bolso de ligação da enzima-alvo (PARAMASHIVAM et al., 2015; VEBER et al., 2002). Assim, a partir da análise dos descritores moleculares, as moléculas propostas apresentam um perfil que sugere uma boa biodisponibilidade oral, bem como boa absorção pelas membranas biológicas.

A influência destes descritores moleculares, como a lipofilicidade, também foi observada nos estudos de Neves e colaboradores (2013) e Liu, Testa e Fahr (2011) que destacaram a importância do Log P estar abaixo de 5 para uma adequada absorção e permeação pelas membranas biológicas, bem como no estudo de Kosmalski e colaboradores (2017) que avaliaram uma série de derivados de benzofuranos e observaram o mesmo perfil de lipofilicidade (Log P abaixo de 5) apresentado neste trabalho.

Na análise da ancoragem molecular, os três métodos desenvolvidos foram avaliados pelo *redocking* e apresentaram valores de RMSD menores que 2,0 Å em comparação com as estruturas cristalográficas originais, corroborando com diversos estudos *in silico* que indicam que para que o método desenvolvido seja validado e permita uma região de busca conformacional mais fidedigna, o valor de RMSD não deve ser superior a 2,0 Å (BAN; OHUE; AKIYAMA, 2018; BORGATI et al., 2017; HOFFER et al., 2015; RAVINDRANATH et al., 2015).

Como forma de avaliar os resultados da ancoragem molecular, vários aspectos das conformações obtidas foram usados para selecionar as melhores moléculas, tais como presença de interações chaves dos ligantes com os resíduos de aminoácidos críticos do sítio ativo, similaridade de conformações com ligantes conhecidos, presença de doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio no complexo ligante/receptor e menores energias de ligação (COSCONATI et al., 2010), visto que as interações entre uma molécula ativa e um receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares que desempenham um papel crucial na prevenção ou obstrução do sítio ativo (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010; SALEH et al., 2016). Além disso, a dissociação do complexo ligante/receptor é rápida para interações mais fracas, enquanto que interações fortes entre os resíduos implicam em uma ligação mais estável entre o ligante e o receptor, levando a uma reação inibitória (YOUSUF et al., 2017).

Na análise da ancoragem molecular com a topoisomerase I, observou-se que os derivados, principalmente os derivados do lapachol, apresentaram interações com os resíduos catalíticos, arginina-364 e asparagina-722, que são cruciais na mediação entre a interação da topoisomerase-DNA. Além disso, somado a interação e a formação de ligação de hidrogênio com estes aminoácidos, os derivados ativos apresentaram uma característica comum, que foi a presença de anéis aromáticos, seja do anel benzopirano ou do anel naftalênico, na sua

estrutura química que podem estar favorecendo esta atividade por meio de impedimento estérico do sítio ativo da enzima (XIN et al., 2017). Assim, todas estas interações e a disposição dos grupos funcionais dos derivados favoreceram uma maior complementaridade e, conseqüentemente, uma maior afinidade, sendo observada em uma menor energia de ligação, e maior probabilidade de possuir atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, tais interações encontradas com os resíduos de aminoácidos também podem ser observadas com os inibidores conhecidos da topoisomerase I, como o topotecano que apresenta interações específicas entre a topoisomerase e o anel lactona por meio de ligações de hidrogênio com a hidroxila do anel e os resíduos aspartato-533 e asparagina-722. Além disso, outra interação determinante entre o topotecano e a topoisomerase residiu na interação π - π com os pares de bases adjacentes do DNA, bem como ligações de hidrogênio com os resíduos de arginina-364, asparaginina-352 e ácido glutâmico-356 com os inibidores indolocarbazol e lamerlina D (KULKARNI et al., 2013; NEIDLE, 2008; XIN et al., 2017), interação esta, que também foi observada nos derivados ativos analisados.

Na análise da predição de inibição da topoisomerase II alfa, as quinonas apresentam interações com os resíduos de serina-148 e 149 e asparagina-91 e 150 do local de ligação do ATP desta enzima, seja por ligações de hidrogênio ou por interações hidrofóbicas (GURBANI et al., 2012). Tais interações foram observadas em todos os derivados propostos do lapachol, além disso, os derivados selecionados foram capazes de se complexar a topoisomerase realizando interações com os resíduos essenciais (arginina-162, asparagina-163, glicina-164 e 166, treonina-165 e alanina-167) do domínio catalítico ATPase que estão relacionados a sua inibição (DARPAN et al., 2016). Tais interações corroboram com o estudo de Boonyalai e colaboradores (2013) e Jun e colaboradores (2011) que observaram perfil de interação semelhante com os resíduos de serina 148 e 149 e asparagina 150 do sítio catalítico com inibidores da topoisomerase II alfa derivados de naftoquinonas e xantonas.

Na análise dos resultados obtidos com a ancoragem molecular dos derivados com a topoisomerase II beta, não se observou a formação de ligação de hidrogênio com os aminoácidos críticos do sítio ativo, apresentando somente interações do tipo hidrofóbicas com estes resíduos, principalmente com a metionina-782, ácido glutâmico-778 e aspartato-479, permitindo uma possível estabilização no sítio ativo dos derivados. Porém, ao comparar a interação dos ligantes com topoisomerase II alfa e beta, observou-se que todos os derivados apresentaram uma interação mais estável com o receptor da topoisomerase II alfa devido as ligações de hidrogênio, bem como menor energia de afinidade.

De forma geral, pode-se observar que a presença de heterociclos favoreceu a atividade de inibição da topoisomerase *in silico* em relação as moléculas de partida, visto que os derivados do lapachol que possuíam anéis cromanos e cromenos, bem como os derivados da umbeliferona que continham triazóis, apresentaram uma grande relevância no aumento da energia de afinidade bem como uma melhor complementariedade com o receptor alvo. Assim, a inserção de grupos funcionais que favoreçam a formação de ligação de hidrogênio como $-NH_2$, $-SO_3H$, $-OH$ e $C=O$ permitiram interações mais fortes com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Corroborando com o estudo de Baptista e colaboradores (2015) e Chen e colaboradores (2016), onde se observou uma maior afinidade e estabilidade na interação ligante-receptor com o aumento da capacidade de ligação de hidrogênio sem afetar a lipofilicidade, sendo eficaz na concepção de moléculas com alta afinidade de ligação e propriedades ADMET satisfatórias.

Além disso, os derivados selecionados a partir dos resultados obtidos *in silico*, apresentaram fraca ligação as proteínas plasmáticas, permitindo que se tenha mais moléculas livres que estarão disponíveis para distribuição em tecidos e poderão ser expostas aos alvos biológicos e exercerem sua atividade farmacológica (SUN et al., 2017). Embora estudos mais recentes tenham sugerido que devido organização alterada da vasculatura tumoral há um

acúmulo de macromoléculas preferencialmente de proteínas plasmáticas dentro do interstício tumoral, permitindo com que as moléculas que estejam ligadas a elas sejam metabolizadas (FERNÁNDEZ-SAINZ et al., 2017; LIU; LIU; WANG, 2017)

Dentre os derivados selecionados para serem sintetizados, pode-se observar que não houve a formação do triazol dos derivados UMB22 e UMB24 devido à ausência de sinais na análise de ^1H por RMN bem como a não observação de massa corresponde ao produto desejado, podendo estar relacionado a não redução do grupo $-\text{NO}_2$ para $-\text{NH}_2$, etapa necessária para a formação da azida. Já no derivado UMB25, a não formação do triazol pode estar relacionada a não formação da azida a partir da 1,4-dinitrofenilhidrazina, visto que houve a formação do alcino a partir da umbeliferona. Já em relação aos derivados do lapachol, observou-se que as reações de esterificação apresentaram um baixo rendimento podendo estar relacionada à inserção de moléculas grandes em uma hidroxila próxima a cadeia alílica do lapachol. Enquanto que os demais derivados foram sintetizados, apresentando os deslocamentos químicos observados no RMN de ^1H bem como massas compatíveis a estrutura pretendida.

Assim, todas as moléculas obtidas foram avaliadas quanto à viabilidade celular, prosseguindo no estudo somente as que apresentassem uma redução da viabilidade celular acima de 90%, visto que a inibição da topoisomerase leva à parada do ciclo celular e consequente a morte das células (BERTRAND et al., 1991; TAMURA et al., 2012), além disso, para que as moléculas sejam consideradas potenciais candidatos a fármacos anticâncer precisam apresentar citotoxicidade em células neoplásicas, sendo os testes de citotoxicidade métodos eficazes de triagem de moléculas anticâncer em modelos *in vitro* (CHEN et al., 2009).

Dentre todos os derivados sintetizados, os que apresentaram atividade citotóxica foram os derivados do lapachol podendo esta atividade estar relacionada a presença do anel

diidropirano atuando como substituintes do 2-alcóxi e 3-alkil na porção quinona, visto que tal estrutura também é observada nas moléculas α e β -lapachona e que colaboram com sua atividade (FERREIRA et al., 2010; GABRIEL, 2017; SANTOS, 2012; SUNASSEE et al., 2013).

Além disso, observou-se que os derivados apresentaram uma maior atividade citotóxica frente às células MCF-7 que as de HCT116, porém também apresentaram citotoxicidade em células não neoplásicas (MRC-5). A atividade citotóxica apresentada corrobora com outros estudos com naftoquinonas frente linhagens tumorais, como a IVS320, uma naftoquinona que apresentou citotoxicidade na linhagem de melanoma (Skmel-28) apresentando CI_{50} de 0,54 μ M, 0,47 μ M e 0,49 μ M nos tempos de 24, 48 e 72 horas (CAVALCANTE, 2016). Evidenciando a atividade citotóxica dos derivados naftoquinônicos, no estudo de Kishore e colaboradores (2014), um derivado da 5-hidroxi-7-metil-1,4-naftoquinona apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano (HeLa) e células do câncer de próstata (DUO-145), com CI_{50} de 5,3 μ M e 6,8 μ M, respectivamente.

Embora os derivados do lapachol tenham apresentado atividade citotóxica, tanto a umbeliferona quanto seus derivados não apresentaram esta atividade na maior concentração testada (20 μ M) em nenhuma linhagem celular avaliada. Não havendo relatos na literatura de sua atividade citotóxica nas linhagens testadas em concentrações inferiores a 50 μ M (MAZIMBA, 2017; YU; HU; ZHANG, 2015). Sendo assim, não apresentaram potencial atividade anticâncer, embora sejam moléculas de estrutura química com grande valor para bloco de construção para novas moléculas bem como para outras atividades farmacológicas.

Acoplado aos estudos *in silico* de propriedades toxicológicas, a análise da genotoxicidade *in vitro* é essencial para determinar a segurança de uma molécula para uso humano (SANTOS et al., 2011). Assim, os ensaios de genotoxicidade foram realizados a fim

de detectar moléculas que possuam capacidade de interagir com o DNA (DEMMA; ENGIDAWORK; HELLMAN, 2009; KAMDEM et al., 2013), onde foram avaliados pelo teste do cometa, que é uma das técnicas mais utilizadas para pesquisas de genotoxicidade, principalmente por ser uma técnica de alta sensibilidade e reprodutibilidade (AZQUETA et al., 2013; LORENZO et al., 2013). Onde o ensaio do cometa em pH alcalino (pH>13), detecta todos os possíveis tipos de danos ao DNA, não havendo especificidade, sendo necessário a utilização do cometa em pH neutro (pH 8) para distinguir as quebras de fitas duplas, visto que se preserva a estrutura de cadeia dupla (SHARMA et al., 2011).

A partir dos resultados obtidos, os derivados apresentaram tanto quebras de fita simples quanto quebras de fita dupla de DNA pelo ensaio do cometa em todas as concentrações testadas de modo dose-dependente. Os danos mensurados correspondentes a scores de 0 a 2 são passíveis de reparo, porém no desenho deste estudo não permitiu prever se ocorreu o processo de reparo (TICE et al., 2000). Embora os derivados tenham apresentado um risco genotóxico *in vitro*, os mesmos não apresentaram riscos de mutagenicidade e tumorigenicidade *in silico*.

A presença do dano no DNA corrobora com estudos realizados com quinonas, visto que estas comumente produzem quebras na fita de DNA (NEVES et al., 2013). Como observado com a IVS320 na concentração de 1 μ M, que causou dano na mesma linhagem utilizada neste estudo, fibroblasto humano (MRC-5), utilizando o mesmo modelo experimental (CAVALCANTE, 2016). Além disso, as 1,2-naftoquinonas são capazes de interagir com o DNA e promover quebra de fitas duplas (AFRASIABI et al., 2005).

Assim, os efeitos genotóxicos de novas alternativas terapêuticas podem ser biologicamente relevantes, como uma alternativa para matar células tumorais, porém esse efeito sobre o DNA deve ser cuidadosamente avaliado, de modo a garantir a segurança do seu uso. Sendo necessário estudar concentrações que possam garantir os efeitos biológicos dos

derivados obtidos, sem causar efeitos tóxicos consideráveis, com o intuito de garantir sua eficácia e segurança.

Na análise de dano induzido pela inibição da topoisomerase, pode-se observar que os derivados apresentaram dano tanto no cometa alcalino quanto no cometa neutro, sugerindo que estas possam atuar como inibidores da topoisomerase, sendo estes danos observados em maior intensidade com a adição da proteinase K que permite a digestão do complexo clivável expondo a ruptura do DNA, assim se o dano do DNA for mediado por Topoisomerase II, quebras de DNA de duas duplas podem ser detectadas, enquanto que se o dano do DNA for mediado por Topoisomerase I, será observado quebras de fita simples (HAZLEHURST, 2009).

Assim , a partir dos resultados obtidos, observou-se dano superior no cometa neutro, podendo ser explicado por uma possível inibição da topoisomerase II por meio da quebra de fitas duplas. Resultados estes que corroboram com o estudo de Godard e colaboradores (2002), que utilizaram a mesma metodologia aplicada, porém com menor tempo de tratamento, onde foi possível observar a quebra de fita duplas e simples decorrentes da ação da inibição da topoisomerase pelos inibidores conhecidos, topotecano e etoposídeo, inibidores de topoisomerase I e II, respectivamente. Bem como no estudo de Kadioglu e colaboradores (2017), que avaliaram a inibição da topoisomerase pelos derivados da artemisina via produção de quebras de fita dupla e simples pelo ensaio do cometa.

Fato este, que pode ser observado na análise da expressão gênica com as células da linhagem HCT116 tratadas com o derivado LP25, onde houve uma redução da expressão da topoisomerase I, II alfa e II beta de modo dose dependente, corroborando com os resultados obtidos no cometa da topoisomerase, onde também houve um aumento de dano de modo dose-dependente. Tal efeito, também foi observado por Ma e colaboradores (2016) na avaliação da expressão da topoisomerase II por um inibidor de topoisomerasas, onde um

derivado da chalcona na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ reduziu os níveis deste gene de forma significativa, bem como nos estudos de Liao e colaboradores (2008) que observaram a redução da expressão de topoisomerase I após tratamento com 50 nM de homocamptotecina e diflomotecano na linhagem de células de glioblastoma (SF295).

Durante a análise não foi possível detectar a expressão dos genes avaliados na linhagem MCF7 após o tratamento com os derivados e no controle da reação, embora haja relatos na literatura como no estudo de Branco e colaboradores (2008), que observaram que em tecidos tumorais, a expressão das topoisomerasas I e II é maior do que nas células de metabolismo normal, bem como tais genes são expressos na linhagem MCF7 como observado nos estudos de Abuhammad e Zihlif (2013) e Kaplan e Gündüz (2012) que avaliaram a expressão destes genes após o tratamento com o etoposídeo. Uma explicação para este fato pode estar associada a erros durante o procedimento experimental, sendo necessária a realização de novos ensaios para a comprovação desta hipótese.

Assim, a partir dos resultados obtidos tanto *in silico* como *in vitro*, é possível inferir que os derivados analisado apresentam potencial atividade anticâncer, atuando como potenciais inibidores da topoisomerase, capazes de se intercalar entre as bases da cadeia nucleotídica alterando a geometria da ligação das topoisomerasas com o DNA, afetando na religação que é requerida entre as extremidades que foram clivadas pela enzima, permitindo com que o complexo DNA-topoisomerase, permaneça por mais tempo, resultando na quebra das fitas do DNA (JU et al., 2006; NITISS, 2009; POMMIER, 2006; SORDET et al., 2003). Contudo, outros estudos devem ser realizados, como o de avaliação de inibição direta com estas enzimas bem como a avaliação de outras vias associadas ao câncer.

7. CONCLUSÃO

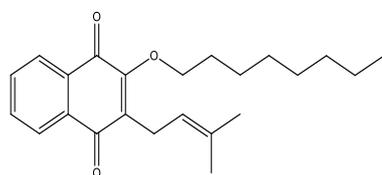
A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Dentre as moléculas propostas, os derivados LP04, LP17, LP18, LP20, LP23, LP24, LP25, UMB22, UMB24 e UMB25 apresentaram maior probabilidade de atuarem como inibidores da topoisomerase I e II *in silico*, bem como apresentaram características moleculares e físico-químicas necessárias para sua administração por via oral.
- Somente os derivados LP04, LP17, LP18, LP20, LP23, LP24, LP25 e UMB25 foram obtidos com êxito por meio reações de semissíntese e avaliados *in vitro*, onde os derivados do lapachol, LP04, LP17, LP18, LP20 e LP25, apresentaram citotoxicidade para as linhagens tumorais avaliadas, adenocarcinoma de mama humano e adenocarcinoma de colorretal humano, com CI_{50} variando de 2,41 a 18,68 μ M.
- Os derivados do lapachol apresentaram atividade genotóxica na linhagem MRC-5, induzindo tanto quebra de fita simples quanto de fita dupla, bem como se apresentaram como possíveis inibidores da topoisomerase via formação de danos no DNA.
- O derivado LP25 reduziu a expressão dos genes da topoisomerase I, II alfa e II beta de forma concentração-dependente.

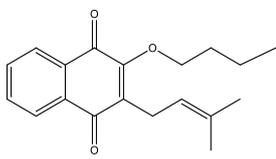
Desta forma, o presente estudo contribuiu para o estudo da aplicação de metodologias *in silico* na semissíntese racional de moléculas para potencialização de sua atividade biológica. Além disso, este estudo suscitou futuras investigações quanto aos possíveis mecanismos de morte e atividade, para avaliar se os derivados obtidos poderiam estar influenciando outras vias além da inibição da topoisomerase, bem como, determinar níveis seguros de sua utilização e eficácia terapêutica.

APÊNDICE 1

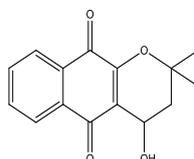
Derivados do lapachol



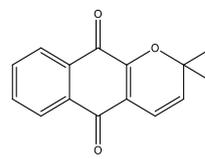
LP01



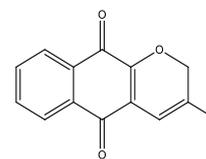
LP02



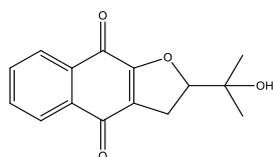
LP03



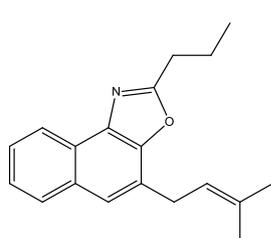
LP04



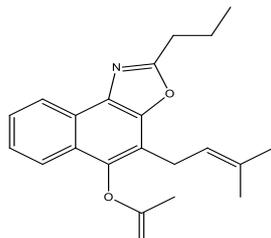
LP05



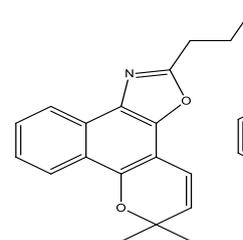
LP06



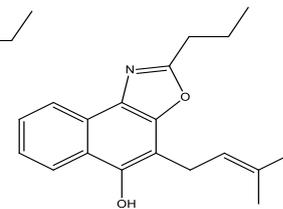
LP07



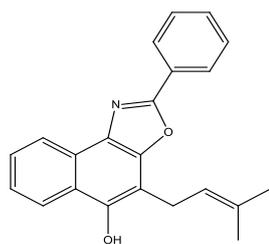
LP08



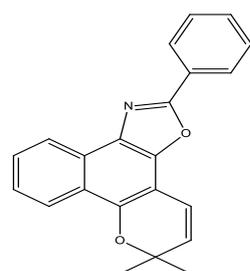
LP09



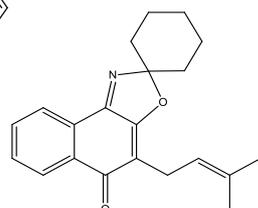
LP10



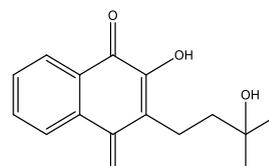
LP11



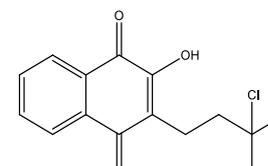
LP12



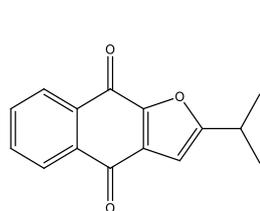
LP13



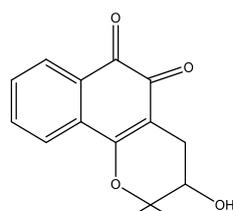
LP14



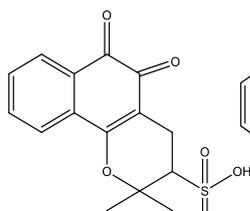
LP15



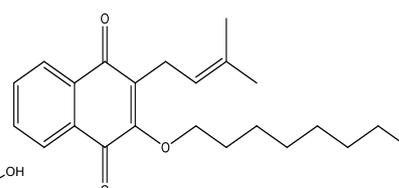
LP16



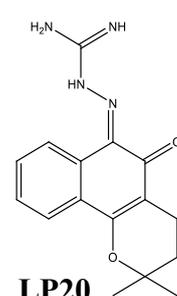
LP17



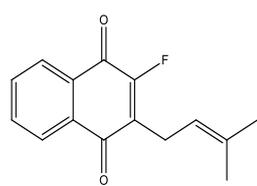
LP18



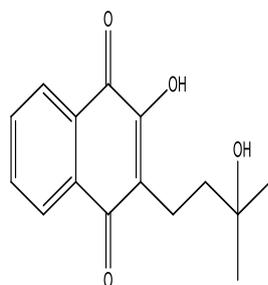
LP19



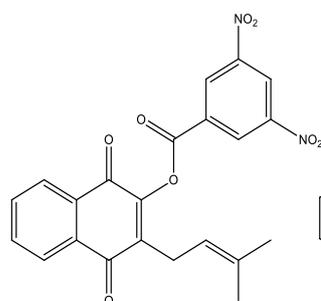
LP20



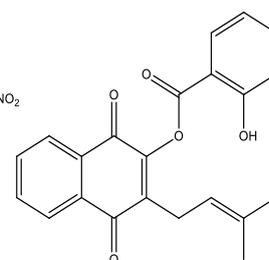
LP21



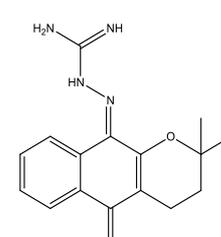
LP22



LP23



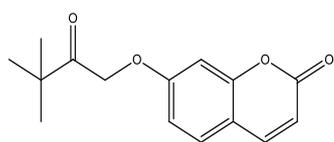
LP24



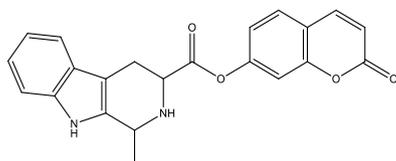
LP25

APÊNDICE 2

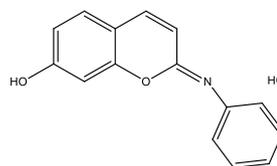
Derivados da umbeliferona



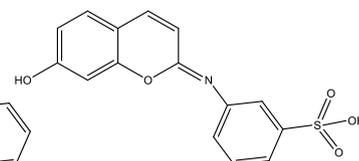
UMB01



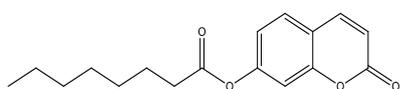
UMB02



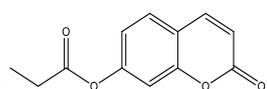
UMB03



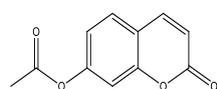
UMB04



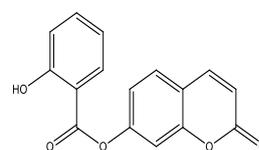
UMB05



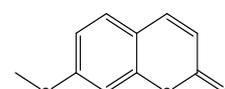
UMB06



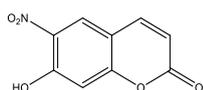
UMB07



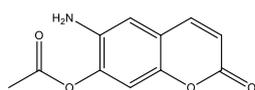
UMB08



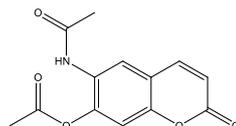
UMB09



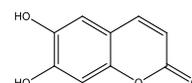
UMB10



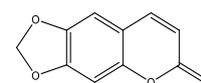
UMB11



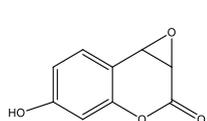
UMB12



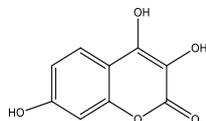
UMB13



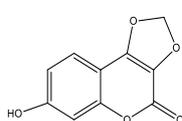
UMB14



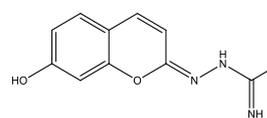
UMB15



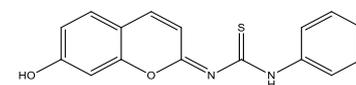
UMB16



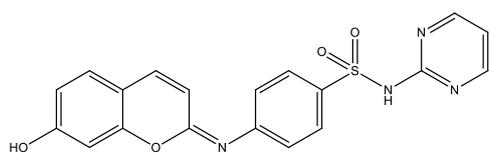
UMB17



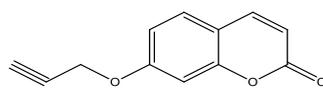
UMB18



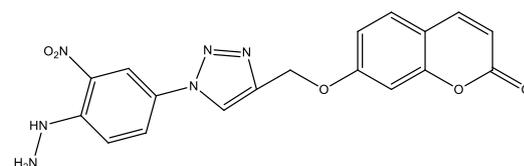
UMB19



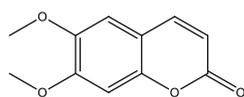
UMB20



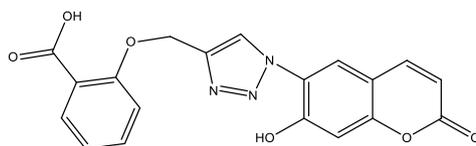
UMB21



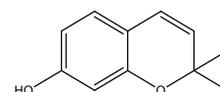
UMB22



UMB23



UMB24



UMB25

APÊNDICE 3

Ancoragem molecular dos derivados de lapachol e umbelifenona com a topoisomerase I

Ligante	Afinidade (Kcal/mol)	Interações hidrofóbicas	Ligação de hidrogênio	Interação π-π	Interação π- cátion
Lapachol	-8,1	DA113, Trp416, Glu418, Ile420, Gln421, Ser423, Lys425	-	-	-
LP01	-9,1	Phe361, Lys374, Trp416, Glu418, Ile420	-	-	-
LP02	-8,7	DT10, DA113, Thr716	Arg364	DT10, DA113, TGP11	-
LP03	-8,7	DG12, DA113	TGP11	-	-
LP04	-9,3	DT10, Tgp11, Lys532, Asp533	Asn722	DA10, TGP11	-
LP05	-10,0	DT10, DC112, TGP11, DA113	-	DC112, TGP11, DT10, DA113	-
LP06	-9,2	TGP11, DT10	Asn722	TGP11, DT10	-
LP07	-8,9	TGP11, DA113, DT10, Leu721, Asn722, Thr718	-	TGP11, DT10	-
LP08	-8,6	TGP11, DA113, DT10, Asn722	-	TGP11, DA113, DT10	-
LP09	-9,7	DC112, TGP11, DA113, Arg364, DT10, Thr718, Asn722	-	DT10, DA113, TGP11, DC112	-
LP10	-9,1	DC112, TGP11, DA113, DT10, Asn722	-	DC112, TGP11, DT10, DA113	-
LP11	-10,7	DC112, TGP11, DA113, DT10, Asn722	-	TGP11, DC112, DT10, DA113	-
LP12	-11,3	DC112, DA13, TGP11, DT10, Thr718, Asn722, Leu721	-	DA113, DC112, TGP11, DT10	-

LP13	-9,6	Phe361, Gln421, Glu418, Lys425, DA113, Trp416	-	-	-
LP14	-8,6	DG12, Tgp11, Arg364, DA113, DT10, Ile535	Thr718	DG12, TGP11, DT10, DA113	-
LP15	-8,0	TGP11, DA113, DT10, Asn722, Leu721, Lys751	-	TGP11, DA113, DT10	-
LP16	-9,2	DC112, TGP11, DA113, DT10, Arg364	-	TGP11, DC112, DT10, DA113	-
LP17	-8,3	DA113, Phe361, Glu356, Lys374, Lys425, Trp416, Ile377, Asn419, Ile420, Lys374	Arg364	-	Glu418
LP18	-9,1	DC112, TGP11	DA113, Arg364	TGP11, DC112, DA113	-
LP19	-7,4	TGP11, DA113, DT10, Tyr426, DT9, Asn722	-	TGP11, DA113, DT10, DT9	-
LP20	-9,3	Thr498, DA114, DG115, Phe361, Glu418, Ser423, DA7, DG6	Lys425	-	Lys425
LP21	-8,7	Arg364, DA113, TGP11, Lys532, DT10	-	TGP11, DT10, DA113	-
LP22	-8,5	Lys374, Glu356, Lys425, Tyr426, DC112, DA113	-	DC112, DA 113	Lys374
LP23	-10,6	DA113, TGP11, DC112, Lys374, Ile420, Glu418, Trp416, Tyr426	Arg364	TGP11, DC112, DA113	-
LP24	-9,7	Asp533, Arg364, TGP11, DG12, Thr718	TGP11	-	-
LP25	-10,8	Arg364, DA113, TGP11, DT10	Asn722	TGP11, DA113, DT10	-
Umbeliferona	-7,0	Tgp11, DA113, DT10, Asn722	Arg364	Tgp11, DA113, DT10	-
UMB01	-7,5	Lys374, Lys425, Trp416, Tyr426	DA113	-	-
UMB02	-11,9	DG12, DA113, Asp533, DT10, Thr718, Asn722	-	DG12, DT10, DA113, Tgp11	-
UMB03	-9,5	Tgp11, DA113	Arg364	Tgp11, DA113	-
UMB04	-9,8	DA113, Tgp11, DT10, Asn722, His632, Ptr723, Arg488	-	Ptr723, DT10, DA113, TGP 11	-
UMB05	-7,1	Glu356, Trp416, Glu418, Lys374, Phe361, DA113	Lys425, DA114	Phe361	-
UMB06	-9,6	Phe361, Gln421, Ile420, Lys374, Glu418, Ser423, DA114,	-	DA113, DA114,	-

		DA113			
UMB07	-8,0	Tgp11, Lys532, DA113, DT10	Arg364	Tgp11, DA113, DT10	-
UMB08	-9,9	DG12, Tgp11, DA113, DT10, Lys532, His632, Ptr723, Ile535	-	DG12, DT10, DA113, Tgp11	-
UMB09	-7,3	Tgp11, DA113	Arg364	Tgp11, DA113	-
UMB10	-8,0	Tgp11, DA113, DT10	Arg364	TGP 11, DT10, DA113	-
UMB11	-7,8	Tgp11, DA113, DT10, Asn722	Arg364	TGP11, DA113, DT10	-
UMB12	-8,5	Arg364, Tgp11, DA113, Lys532, DT10, Thr718	-	TGP 11, DT10, DA113	-
UMB13	-7,5	Tgp11, DA113, DT10, Asn722	Arg364	Tgp11, DA113, DT10	-
UMB14	-8,5	Tgp11, DA113, DT10, Asn722	Arg364	Tgp11, DA113, DT10	-
UMB15	-7,0	Tgp11, DC112, DA113	Arg364	Tgp11, DA113, DC112	-
UMB16	-7, 6	Tgp11, DA113	Arg364	Tgp11, DA113	-
UMB17	-8,4	DA113, Asp533, Tgp11	Arg364	Tgp11, DA113	-
UMB18	-9,0	Arg364, Tgp11, DA113, Thr718, Asn722	-	Tgp11, DA113	-
UMB19	-9,1	Gln421, Ser423, Glu418, Lys425, Lys374, DA113, DA114	DG115	-	Lys425
UMB20	-11,0	DC112, Tgp11, DA113, Arg364, DT10, Asn722, Thr718	-	Tgp11, DT10, DA113, DC112	-
UMB21	-7,8	Tgp11, DA113, DT10	Arg364	Tgp11, DA113, DT10	-
UMB22	-11,1	DA113, DG115, DA7, DG6, Gln421, Ile420, Phe361, Lys374, Lys425, Glu418, Ser423	DA114, Trp416	DA7, DA113, DA114	Lys425
UMB23	-7,5	Asn722, DT10, DA113, Tgp11	Arg364	Tgp11, DT10, DA113	-
UMB24	-10,4	Asp533, DA113, DC112, His632	Tgp11	Tgp11, DA113	-
UMB25	-9,2	DA114, DA113, DC112, Glu418, Lys374, Phe361	Lys425	Phe361	-

APÊNDICE 4

Ancoragem molecular dos derivados de lapachol e umbelifenona com a topoisomerase II alfa

Ligante	Afinidade (Kcal/mol)	Interações hidrofóbicas	Ligação de hidrogênio	Interação π - π	Interação π -cátion
Lapachol	-8,8	Ile141, Phe142, Ala187, Gly164, Gln376, Asn163, Ser148, Glu87, Asn91, Lys378, Gly161, Ser149, Arg162, Asn150	Asn91, Ser149	-	-
LP01	-8,4	Asn95, Ser149, Ile141, Phe142, Ile125	Ser149	-	-
LP02	-8,4	Asn91, Ile141, Gly164, Arg98, Ser149, Asn150, Ala167	Ser149	-	-
LP03	-8,8	Phe142, Ile125	Ser149	-	-
LP04	-9,0	Ile141, Ala167, Gly164, Asn91, Ser149, Asn150	Ser149	-	-
LP05	-8,4	Ile217, Thr215, Asn120, Asn91, Phe142, Ile125	-	-	-
LP06	-8,4	Ser149, Asn150, Lys157, Thr159, Arg98, Asn91, Phe142	Asn150, Lys157	-	-
LP07	-8,5	Phe142, Asn120, Ser149	-	-	-
LP08	-8,5	Arg98, Ser149, Asn95, Lys157, Asn91, Gly161, Phe142, Ile141	-	-	-
LP09	-9,7	Ile217, Thr215, Asn95, Asn91, Phe142, Ile141, Ser148, Ser149	-	-	-
LP10	-9,0	Ala167, Lys168, Asn91, Phe142, Ile217, Asn150, Asp94, Asn95	-	-	-
LP11	-9,5	Thr215, Asn91, Ile141, Asn95, Asn150, Ala167, Pro126,	-	-	Arg98

		Arg98			
LP12	-9,8	Ile217, Asn120, Ile88, Asn91, Ala92, Phe142, Ile141, Ile125, Arg98, Ser149, Ser148	-	-	-
LP13	-9,8	Arg98, Ser149, Asn95, Asn120, Thr215, Asn91, Ile88, Ile217, Phe142, Ile141, Lys168	-	-	-
LP14	-7,8	Ala167, Asn91, Gly164, Asn150, Ser149	Ser149	-	-
LP15	-8,0	Ala167, Asn91, Asn95, Gly164, Asn150, Ser149,	Ser149	-	-
LP16	-8,6	Asn91, Ala167, Ile141, Gly164, Asn150, Ser149	Ser149	-	-
LP17	-8,6	Phe142, Ala167, Asn91,	-	-	-
LP18	-9,5	Ile141, Asn91, Asn150, Ser149	Ser149	-	-
LP19	-8,5	Ile217, Ala167, Asn91, Lys168, Phe142, Gly164, Arg98, Asn95, Asp94, Asn150, Arg162	-	-	-
LP20	-9,9	Phe142, Asn95, Arg98, Asn150, Ser149, Asp94	Asn91, Asn120	-	-
LP21	-8,5	Ala167, Gly166, Phe142, Asn91, Ile141, Gln376, Lys378, Gly161, Arg162, Asn150, Ser149	Asn91, Ala167	-	-
LP22	-9,8	Phe142, Asn91, Ala92, Asn120, Asn150, Ser149, Arg98	-	-	-
LP23	-9,8	Ala167, Ile125, Gly166, Gly164, Tyr165, Ser149, Asn150, Gly161, Arg98, Asn95, Asn120	Asn120, Asn150	-	-
LP24	-9,8	Arg98, Ser149, Asn150, Ile125, Asn91, Gly164, Phe142, Ala167, Lys168	Ser149, Asn150	-	Lys168, Arg98
LP25	-9,2	Phe142, Ile125, Asn91, Ser148, Asn150, Ser149, Thr159, Asp94	Asp94	-	-
Umbeliferona	-6,8	Gly166, Tyr165, Gly164, Asn163, Asn91, Asn150, Arg162, Ala167, Ser149	Ser149, Arg162, Asn163, Gly164	-	-
UMB01	-7,9	Asp94, Gly164, Asn150, Ser149, Arg162	Ser149, Asn150,	-	-

			Gly164		
UMB02	-10,8	Thr215, Ala92, Asn91, Asn95, Arg98, Ser149, Arg162, Ser148, Gly166, Gly164, Ile141, Phe142, Ala167, Lys168	-		Lys168
UMB03	-8,3	Ile125, Asn91, Ala167, Gly161, Gly164, Ser149, Asn150, Arg162, Asn163	-	-	-
UMB04	-10,2	Ile125, Asn120, Asn91, Ala167, Lys168, Gly166	-	-	Lys168
UMB05	-8,2	Asn150, Gly161, Val90, Lys378, Arg162, Asn163, Lys83, Gln376, Glu87, Gly166, ALA167, TYR165	-	-	-
UMB06	-9,8	Ser149, Asn150, Arg162, Asn91, Asn163, Gly164, Gly166, Ala167, Gln376, Tyr165	-	-	-
UMB07	-8,4	Ser149, Asn150, Arg162, Lys378, Asn163, Gly164, Gln376, Tyr165, Gly166, Ala167	-	-	-
UMB08	-7,0	Asn91, Ile141, Lys168, Ser148, Asn150, Ser149	Ser149	-	Lys168
UMB09	-7,2	Asn91, Ala167, Gly166, Lys378, Gln376, Asn163, Arg162, Gly164, Asn150, Ser149	Ser149, Arg162, Gly164	-	-
UMB10	-7,9	Ala167, Arg162, Gly164, Tyr165, Gly166	Gly164, Tyr165, Gly166, Ala167	-	-
UMB11	-7,4	Ala167, Lys168, Gly166, Tyr165, Asn163, Gly164, Gly161, Arg162, Asn150	Arg162, Asn163, Ala167	-	-
UMB12	-8,0	Asn91, Ala167, Lys168, Asn150, Asp94, Ser149,	Asn150	-	-
UMB13	-7,5	Lys168, Ala167, Gly166, Tyr165, Gly164, Gly161, Asn150	Tyr165, Gly166, Ala167	-	-
UMB14	-7,9	Asn91, Ala167, Gly166, Gln376, Tyr165, Gly164, Asn163, Asn150, Arg162, Ser149,	Arg162, Gly164, Gly166	-	-
UMB15	-7,2	Ala167, Gly166, Asn91, Asn163, Gly164, Arg162, Asn150,	Ser149, Arg162,	-	-

		Ser149	Asn163, Gly164		
UMB16	-7,9	Ala167, Gly166, Tyr165, Asn91, Gly164, Arg162, Asn150, Ser149	Asn150 Gly164, Ala167	-	-
UMB17	-7,7	Ala167, Gly166, Asn91, Gly161, Asn163, Gly164, Arg162, Asn150, Ser149	Ser149, Arg162, Asn163, Gly164	-	-
UMB18	-8,0	Phe142, Gly164, Gly161, Ser148, Asn150, Arg162, Asp94	-	-	-
UMB19	-8,7	Ala167, Tyr165, Asn163, Gly164, Asn91, Gly161, Arg162, Asn150, Ser149, Ile125	-	-	-
UMB20	-11,2	Ala167, Gly166, Gln376, Lys378, Tyr165, Asn163, Arg162, Gly164, Gly161, Asn91, Lys168, Asn95, Asn120, Ile125	-	-	Lys378
UMB21	-7,6	Gln376, Tyr165, Lys168, Lys378, Gly166, Ala167, Asn163, Gly164, Gly161, Arg162, Ser148, Asn150, Ser149	Arg162	-	-
UMB22	-11,0	Ala167, Gly166, Lys168, Tyr165, Gly164, Phe142, Asn91, Asn150, Ser148, Ser149, Asn95, Ile125, Thr215, Ile217	Gly164	-	-
UMB23	-6,9	Lys168, Ala167, Ile141, Tyr165, Asn91, Asn150, Ser149	Ala167	-	-
UMB24	-9,6	Phe142, Ile141, Gly166, Gln376, Tyr165, Gly164, Gly161, Ser 148, Asn150, Asn91, Asn95, Ser149, Thr215	Gly164, Tyr165, Gly166, Gly376	-	-
UMB25	-9,6	Tyr215, Ile125, Asn120, Gly164, Asn150, Ser149	Ser149, Asn150, Gly164	-	-

APÊNDICE 5

Ancoragem molecular dos derivados de lapachol e umbelifenona com a topoisomerase II beta

Ligante	Afinidade (Kcal/mol)	Interações hidrofóbicas	Ligação de hidrogênio	Interação π - π	Interação π -cátion
Lapachol	-8,3	Met782, DG7, Ala779, Gly776, Gln778, DA12, Gly504, Arg503	-	DG13, DC8, DT9	-
LP01	-8,9	Arg503, DC8, Gln778	DG13	DT9, DA12	-
LP02	-8,8	Ala779, Gln778, DA12, Arg503	-	DG13, DC8, DT9	-
LP03	-8,7	DA12, Gln778, DT9, Arg503, DC8	-	DG13	-
LP04	-8,6	Ala779, Gln778, Arg503	DT9	DA12, DC8, DG13	-
LP05	-9,0	Gly504, Arg503, DG13	-	DA12, DC8	-
LP06	-8,6	Arg503, Gly776, DG13, Gln778, DA12	-	DC8	DT9
LP07	-8,7	DA12, Arg503, Gln778, Ala779, DG7, Met782, Gly776	-	DG13, DT9, DC8	-
LP08	-8,8	Glu477, Gly504, Arg503, DT9, Gly776, Gln778, DG7, DA12, Ala779	-	DG13	-
LP09	-9,0	Arg503, DA12, DG7, DG13, Ala779, Gly504, Gly478, Gln778, Met782	-	DT9, DC8	-
LP10	-9,1	Met782, Ala779, Gln778, Gly776, DG7, DA12, Arg503	-	DG13, DC8	-
LP11	-9,6	DA12, Gln778, Arg503, Gly478, Ala779, Gly776, DT9, DG10, Gly504, Asp479, Gly478	-	DG13, DC8	-
LP12	-10,3	Gln778, Met782, Glu477, Arg503, Gly504, Gly478	-	DT9, DC8, DG13, DA12	-

LP13	-9,1	DA12, Met782, DT9, Arg503, Gln778, Gly504, Gly776	-	DC8, DG13	-
LP14	-7,9	Gly504, DA12, Arg503, Gly478	-	-	-
LP15	-7,9	DT9, Arg503, Gln778, Gly504	-	-	-
LP16	-8,8	DA12, Gln778, Gly776, Arg503, Gly504	-	DG13, DT9, DC8	-
LP17	-8,7	DC8, Arg503, Gln778	DG13	DA12, DT9	-
LP18	-8,6	Arg503, DC8, Gln778, Gly504, DA12	-	-	DT9
LP19	-7,6	Gly776 Gln778, DG7, Ala779, Arg503, DG10, Lys456, Gly504, Asp479	-	DA12, DT9, DC8, DG13	-
LP20	-9,1	Gln778, Gly776, Met782, DG13, Gly504, DA12	DT9, Arg503	DC8	-
LP21	-8,5	Arg503, DA12, Ala779, Gly504, Gln778	-	-	-
LP22	-9,8	Gly776, Gln778, Asp479, DG10, Lys456	-	-	-
LP23	-10,5	DC8, Glu477, Gly504, Arg503, Leu502, Gly478, DG10,	-	-	-
LP24	-9,8	Gly478, Asp479, Arg503, DG10, Gly776, Ala779, Gln778, DA12	DG13, DC8	-	-
LP25	-9,8	Gly478, Gln778 Arg503, DA12, DG13, DT9	-	-	-
Umbeliferona	-6,4	Gly776, His775, DG7, Gln778	DC8, Ala779	DT9	-
UMB01	-7,7	Arg503, DG7, Ala779, Gly776, Gln778	DA12, DC8	DG13, DT9	-
UMB02	-11,2	Gly504, Lys456, Arg503, Gly776, Ala779, Gln778	-	DC8, DA12	DT9
UMB03	-8,5	Gly776, Gln778, Arg503, Ala779	DA12	DG13, DT9, DC8	-
UMB04	-8,9	Gln778, DG10	-	DT9, DC8, DG13	-
UMB05	-7,4	Gly776, Gln778, DG7, Ala779, Gly478, DG10, DA12, Asp479, Lys456, DT9, DG13	DC8	Arg503	-
UMB06	-7,0	Arg503, DT9, DA12, Gly504, DC8	-	DG13	-
UMB07	-9,3	DG7, Gln778, Arg503, Ala779	-	DG13	-
UMB08	-6,6	Arg503, DG13	DA12	DC8, DT9	-

UMB09	-7,4	Gln778, DG13, Arg503	-	DA12, DC8, DT9	-
UMB10	-7,1	DA12, Gly504, Arg503, DG13	DG13	DT9, DC8	-
UMB11	-6,7	Gly504, DT9, Gly478, DG10, Ser480, DG13, Arg503, Lys456	DC8, Asp479	-	-
UMB12	-7,3	Arg503, DC8, DT9, DA12	-	DG13	-
UMB13	-6,7	DA12, Gly504, DG13, DC8, DT9	Arg503	-	-
UMB14	-7,3	Arg503, DG13, DT9, DC8, DA12	-	-	-
UMB15	-6,7	DA12, Gly504, DG13	-	DC8, DT9	-
UMB16	-7,1	Arg503, DT9, DC8, DA12	-	DG13	-
UMB17	-7,6	Arg503, Gly504, DG13, DA12	-	-	-
UMB18	-7,8	DA12, DT9, Lys456, DG13, Arg503, Asp479, Dg10	-	-	-
UMB19	-8,3	DG13, Ala779, Arg503, DT9, Gly504	-	-	DC8
UMB20	-9,9	Gln778, DG10, DC11, Lys456	-	DT9, DC8	Lys378
UMB21	-7,1	DG13, DC11, DG10, Lys456	Arg503, DA12	-	-
UMB22	-10,1	Arg503, Ly456, His775, Gly776, Glu777, DC8	DA12, Ala779, Gln778	DG13	-
UMB23	-6,9	Arg503, DT9, DG13, DA12, DC8, Gly504	-	-	-
UMB24	-10,0	Gly478, Asp479, DG13, DA12, Arg503	Lys456, DG10	Dc8	-
UMB25	-6,6	DT9, Gly504, Gln778	Arg503, DC8	DG13	-

REFERÊNCIAS

- ABUHAMMAD, S.; ZIHLIF, M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. **Genomics**, v. 101, n. 4, p. 213–220, abr. 2013.
- AGBARYA, A. et al. Natural products as potential cancer therapy enhancers: A preclinical update. **SAGE open medicine**, v. 2, p. 2050312114546924, 2014.
- AHMAD, A.; SAKR, W. A.; RAHMAN, K. M. W. Novel targets for detection of cancer and their modulation by chemopreventive natural compounds. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 410–25, 1 jan. 2012.
- AHSAN, M. J. et al. POMA analyses as new efficient bioinformatics' platform to predict and optimise bioactivity of synthesized 3a,4-dihydro-3H-indeno[1,2-c]pyrazole-2-carboxamide/carbothioamide analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7029–7035, 1 dez. 2012.
- ALEX, A. et al. Intramolecular hydrogen bonding to improve membrane permeability and absorption in beyond rule of five chemical space. **MedChemComm**, v. 2, n. 7, p. 669, 5 jul. 2011.
- ALMEIDA, V. L. **Estudos de QSAR de furanobenzoamidinas frente à Pneumocystis carinii, Candida Albicans e Cryptococcus neoformans: síntese de análogos furânicos S-isotioureídicos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- ALMEIDA, V. L. DE et al. Câncer E Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos E Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com O Dna: Uma Introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, set. 2006.
- AMIJI, M. M. **Nanotechnology for cancer therapy**. [s.l.] CRC/Taylor & Francis, 2007.
- AMORIM, G. L. C. DO C. et al. Molecular aspects of bladder cancer. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 1, p. 95–99, mar. 2011.
- ARDALANI, H.; AVAN, A.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 285–294, 2017.
- ARNO, B. et al. A small organic compound enhances the religation reaction of human topoisomerase I and identifies crucial elements for the religation mechanism. **Biosci. Rep**, v. 33, 2013.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. DA. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- AVILA, C. M. **Estudos de modelagem molecular para o planejamento estrutural de novos protótipos antiinflamatórios inibidores da IKK-B**. [s.l.] Universidade Federal do

Rio de Janeiro, 2010.

AZQUETA, A. et al. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 271–277, 1 maio 2013.

BAIKAR, S.; MALPATHAK, N. Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 7, p. 12–26, jan. 2010.

BAKER, N. M.; RAJAN, R.; MONDRAGÓN, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 3, p. 693–701, fev. 2009.

BAKHT, M. A. et al. Molecular properties prediction, synthesis and antimicrobial activity of some newer oxadiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5862–5869, 2010.

BAN, T.; OHUE, M.; AKIYAMA, Y. Multiple grid arrangement improves ligand docking with unknown binding sites: Application to the inverse docking problem. **Computational Biology and Chemistry**, v. 73, p. 139–146, 1 abr. 2018.

BAPTISTA, P. et al. Heterocycle anticancer compounds: recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool box. **Molecules**, v. 20, p. 16852–16891, 2015.

BARBOSA, T. P.; DINIZ NETO, H. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 331–334, 2013.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.

BARROS, F. W. A. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 1, p. 37–46, 1 abr. 2013.

BAUDINO, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current drug discovery technologies**, v. 12, n. 1, p. 3–20, 2015.

BERTRAND, R. et al. Cell death induced by topoisomerase inhibitors: Role of calcium in mammalian cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 77–85, 21 jun. 1991.

BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M. N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 09–26, 2011.

BOECHAT, N.; PINTO, A. DA C.; BASTOS, M. M. Selective fluorination methods of organic molecules. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1323–1338, 2015.

BOONYALAI, N. et al. Biophysical and molecular docking studies of naphthoquinone derivatives on the ATPase domain of human Topoisomerase II. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 2, p. 122–128, 1 mar. 2013.

BORGATI, T. F. et al. Synthesis, SAR, and Docking Studies Disclose 2-Arylfuran-1,4-naphthoquinones as In Vitro Antiplasmodial Hits. **Journal of tropical medicine**, v. 2017, p. 7496934, 2017.

BRANCO, A. et al. Rubrofusarina, um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- α humana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 703–708, dez. 2008.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BUTLER, M. S. et al. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.

CÂNDIDO, C. et al. A carcinogênese e o câncer de mama. **Maiêutica - Ciências Biológicas**, v. 4, n. 1, 2016.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CAVALCANTE, J. S. **Atividade anticâncer de uma furano-naftoquinona em modelos de cultura celular de melanoma**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2016.

CHEN, D. et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. **Science advances**, v. 2, n. 3, p. e1501240, 2016.

CHEN, Z. et al. Screen anticancer drug in vitro using resonance light scattering technique. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1365–1369, 15 fev. 2009.

CHHATRIWALA, H.; JAFRI, N.; SALGIA, R. A review of topoisomerase inhibition in lung cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, n. 12, p. 1600–1607, 2006.

COSCONATI, S. et al. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 597–607, 23 jun. 2010.

COSTA, M. et al. Controlled Release of Nor- β -lapachone by PLGA Microparticles: A Strategy for Improving Cytotoxicity against Prostate Cancer Cells. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 873, 2 jul. 2016.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical principles and practice**, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016.

CRUZ, E. H. G. DA. **Síntese de heterocíclicos fotoluminescentes e a-lapachonas arilamino substituídas: aplicações em biologia celular e na terapêutica do câncer**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

DAMIÃO, M. C. F. C. B. **Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da atividade antitumoral**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

DARPAN, D. et al. Synthesis and biological evaluation of new 2,5-dimethylthiophene/furan based N-acetyl pyrazolines as selective topoisomerase II inhibitors. **RSC Advances**, v. 6, n. 18, p. 14880–14892, 3 fev. 2016.

DEMMA, J.; ENGIDAWORK, E.; HELLMAN, B. Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 1, p. 136–142, 25 fev. 2009.

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 11, p.

1201–1226, 2 nov. 2017.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 1 nov. 2008.

DHOLWANI, K. K. et al. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. **Indian journal of pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 49–58, mar. 2008.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016.

DRAKE, F. H. et al. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. **Biochemistry**, v. 28, n. 20, p. 8154–8160, out. 1989.

EL-NAJJAR, N. et al. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 353–370, 20 set. 2011.

ERICKSON, J. A. et al. Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 1, n. 47, p. 45–55, 2004.

ESTEVEZ-SOUZA, A. et al. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1399–1402, out. 2007.

FARSHORI, N. N. et al. DCC/DMAP mediated esterification of hydroxy and non-hydroxy olefinic fatty acids with β -sitosterol: In vitro antimicrobial activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 6, p. 646–650, jun. 2010.

FERNÁNDEZ-SAINZ, J. et al. Binding of the anticancer drug BI-2536 to human serum albumin. A spectroscopic and theoretical study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 172, p. 77–87, 1 jul. 2017.

FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.

FERREIRA, L. F. G. R. **Desenvolvimento e implementação de software para aplicação de grids computacionais em modelagem para inovação terapêutica**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

FERREIRA, S. B. et al. β -Lapachone: Medicinal chemistry significance and structural modifications. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140–160, 2010.

FIORITO, S. et al. **Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [s.l.: s.n.].

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. **JAMA Oncology**, 3 dez. 2016.

FLOOR, S. L. et al. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in**

molecular medicine, v. 18, n. 9, p. 509–15, set. 2012.

FUKUMOTO, S. et al. Novel, non-acylguanidine-type Na(+)/H(+) exchanger inhibitors: synthesis and pharmacology of 5-tetrahydroquinolinylidene aminoguanidine derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 14, p. 3009–21, 4 jul. 2002.

GABRIEL, G. H. **Propriedades citotóxicas da B lapachona em células de osteossarcoma in vitro**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2017.

GARRAWAY, L. A.; JÄNNE, P. A. Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 3, 2012.

GODARD, T. et al. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 520, n. 1–2, p. 47–56, set. 2002.

GOLDEN, E. B.; APETOH, L. Radiotherapy and Immunogenic Cell Death. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 25, n. 1, p. 11–17, jan. 2015.

GOSWAMI, P. C.; ROTI ROTI, J. L.; HUNT, C. R. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 4, p. 1500–8, abr. 1996.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 1 set. 2015.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2016.

GURBANI, D. et al. Mechanism of Inhibition of the ATPase Domain of Human Topoisomerase II α by 1,4-Benzoquinone, 1,2-Naphthoquinone, 1,4-Naphthoquinone, and 9,10-Phenanthroquinone. **Toxicological Sciences**, v. 126, n. 2, p. 372–390, 1 abr. 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** CellElsevier, , 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>. Acesso em: 12 fev. 2017

HANNA, G. G.; COYLE, V. M.; PRISE, K. M. Immune modulation in advanced radiotherapies: Targeting out-of-field effects. **Cancer Letters**, v. 368, n. 2, p. 246–251, 28 nov. 2015.

HAZLEHURST, L. A. **Chromatin Protocols**. Second ed. [s.l: s.n.]. v. 523

HOFFER, L. et al. S4MPLE—Sampler for Multiple Protein-Ligand Entities: Methodology and Rigid-Site Docking Benchmarking. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8997–9028, 19 maio 2015.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: An overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–

1792, 2014.

HUANG, S.-Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016–34, 18 ago. 2010.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 1–20, 31 dez. 2009.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Special Issue Reviews and Accounts ARKIVOC**, p. 145–171, 2007.

IMAMURA, P. M.; BAPTISTELLA, L. H. B. Nitração do fenol, um método em escala semi-micro para disciplina prática de 4 horas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 270–272, abr. 2000.

INAGAKI, R. et al. Synthesis, Characterization, and Antileukemic Properties of Naphthoquinone Derivatives of Lawsone. **ChemMedChem**, v. 10, n. 8, p. 1413–1423, ago. 2015.

INCA. **ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: [s.n.].

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

JACOBSEN, R. G. et al. DNA Topoisomerase II α contributes to the early steps of adipogenesis in 3T3-L1 cells. 2016.

JAIN, C. K.; MAJUMDER, H. K.; ROYCHOUDHURY, S. Natural Compounds as Anticancer Agents Targeting DNA Topoisomerases. **Current genomics**, v. 18, n. 1, p. 75–92, fev. 2017.

JARDIM, G. A. M. et al. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. **Med. Chem. Commun.**, v. 6, p. 120–130, 2015.

JU, B.-G. et al. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. **Science**, v. 312, n. 5781, p. 1798–802, 23 jun. 2006.

JUN, K.-Y. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of 3-(3'-heteroatom substituted-2'-hydroxy-1'-propyloxy) xanthone analogues as novel topoisomerase II α catalytic inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1964–1971, 1 jun. 2011.

KADIOGLU, O. et al. Artemisinin Derivatives Target Topoisomerase 1 and Cause DNA Damage in Silico and in Vitro. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 711, 2017.

KAMDEM, J. P. et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26–34, 1 nov. 2013.

KANDIL, S.; WESTWELL, A. D.; MCGUIGAN, C. 7-Substituted umbelliferone derivatives as androgen receptor antagonists for the potential treatment of prostate and breast cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 8, p. 2000–2004, 2016.

KAPLAN, E.; GÜNDÜZ, U. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.

66, n. 1, p. 29–35, fev. 2012.

KIELBUS, M. et al. 7-substituted coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells in vitro. **Anticancer research**, v. 33, n. 10, p. 4347–56, out. 2013.

KISHORE, N. et al. Cytotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 5013–5019, 2014.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 24 fev. 2005.

KOSMALSKI, T. et al. Lipophilicity Study of 1-(Benzofuran-2-yl)ethan-1-one Oxime and its Substituted O-Benzyl Ethers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2100–2105, 2017.

KULKARNI, S. et al. Molecular Dynamics, Docking and QSAR analysis of Napthoquinone derivatives as Topoisomerase I inhibitors. **International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling**, v. 2, n. 5, p. 223–233, 2013.

KUMAR, A.; BORA, U. Molecular Docking Studies of Curcumin Natural Derivatives with DNA Topoisomerase I and II-DNA Complexes. **Interdiscip Sci Comput Life Sci**, v. 6, p. 285–291, 2014.

LAGORCE, D. et al. Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors. **Scientific Reports**, v. 7, p. 46277, 11 abr. 2017.

LAURIA, A.; IPPOLITO, M.; ALMERICO, A. M. Molecular docking approach on the Topoisomerase I inhibitors series included in the NCI anti-cancer agents mechanism database. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, p. 393–400, 2007.

LEE, D. et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 162, p. 120–133, 2016.

LI, M.; LIU, Y. Topoisomerase I in Human Disease Pathogenesis and Treatments. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 14, n. 3, p. 166–171, jun. 2016.

LIANG, C.; QIAO, J.; LIAN, H. Determination of reversed-phase high performance liquid chromatography based octanol-water partition coefficients for neutral and ionizable compounds: Methodology evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 1528, p. 25–34, 15 dez. 2017.

LIAO, Z. et al. Reduced expression of DNA topoisomerase I in SF295 human glioblastoma cells selected for resistance to homocamptothecin and diflomotecan. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 490–7, fev. 2008.

LILL, M. A.; DANIELSON, M. L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 1, p. 13–19, 30 jan. 2011.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug**

Discovery Today: Technologies, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LIU, C.; LIU, Z.; WANG, J. Uncovering the molecular and physiological processes of anticancer leads binding human serum albumin: A physical insight into drug efficacy. **PLoS one**, v. 12, n. 4, p. e0176208, 2017.

LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 962–977, 2011.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, out. 2004.

LOPEZ-CAMARILLO, C. et al. MetastamiRs: non-coding MicroRNAs driving cancer invasion and metastasis. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 2, p. 1347–79, 2012.

LÓPEZ-VALLEJO, F. et al. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 14, n. 6, p. 475–87, jul. 2011.

LORENZO, Y. et al. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427–432, 1 jul. 2013.

MA, X.; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds1. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 500–512, abr. 2005.

MA, Y.-C. et al. Dual Inhibition of Topoisomerase II and Tyrosine Kinases by the Novel Bis-Fluoroquinolone Chalcone-Like Derivative HMNE3 in Human Pancreatic Cancer Cells. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0162821, 2016.

MABKHOT, Y. N. et al. Antimicrobial Activity of Some Novel Armed Thiophene Derivatives and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses. **Molecules**, v. 21, p. 1–16, 2016.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 1, p. 81–93, fev. 2000.

MAGALHÃES, L. G. **Identificação e caracterização de novos agentes com propriedades anticâncer**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. February, p. 143, 2002.

MARQUES, C. A. V.; FIGUEIREDO, E. N. DE; GUTIÉRREZ, M. G. R. DE. Políticas de saúde pública para o controle do câncer de mama no Brasil. **Rev. enferm. UERJ**, v. 23, n. 2, p. 272272–8, 2015.

MAZIMBA, O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 55, n. 2, p. 223–232, 1 dez. 2017.

MECZES, E. L. et al. The Impact of the Human DNA Topoisomerase II C-Terminal Domain on Activity. **PLoS ONE**, v. 3, n. 3, p. e1754, 12 mar. 2008.

MENDON, A. et al. **Aplicação de métodos computacionais no estudo da relação estrutura-atividade e perfil toxicológico de novos compostos antiparasitários e antimicobacterianos**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2007.

MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, jun. 2011.

MODA, T. L. **Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades de ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 134–137, fev. 2000.

MUTHU, R.; SELVARAJ, N.; VAIYAPURI, M. Anti-inflammatory and proapoptotic effects of umbelliferone in colon carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 10, p. 1041–1054, 1 out. 2016.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NEIDLE, S. **Cancer drug design and discovery**. [s.l.] Academic Press, 2008.

NEUENFELDT, P. D. **Síntese e avaliação biológica de derivados pirazolínicos e bis-chalconas simétricas: estudos de correlação estrutura/atividade**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

NEVES, A. P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 119, p. 54–64, fev. 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338–350, 20 maio 2009.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, dez. 2007.

PALLER, C. J.; DENMEADE, S. R.; CARDUCCI, M. A. Challenges of conducting clinical trials of natural products to combat cancer. **Clinical advances in hematology & oncology : H&O**, v. 14, n. 6, p. 447–55, jun. 2016.

PARAMASHIVAM, S. K. et al. In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bioinformation**, v. 11, n. 2, p. 73–84, 2015.

PASSAMANI, F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos físico-químico e toxicológicos in silico de derivados heterocíclicos com atividade antiviral**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

PINGAEW, R. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone–coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 65–76, 6 out. 2014.

PIRES, S. M. G. et al. Novel biomimetic oxidation of lapachol with H₂O₂ catalysed by a manganese(III) porphyrin complex. **RSC Advances**, v. 1, n. 7, p. 1195, 1 nov. 2011.

PODOLSKIY, D. I.; GLADYSHEV, V. N. Intrinsic versus extrinsic cancer risk factors and aging. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 10, p. 833–834, out. 2016.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 789–802, out. 2006.

PUECH, C. et al. Umbelliferone decreases intracellular pH and sensitizes melanoma cell line A375 to dacarbazine. Comparison with Acetazolamide. **Current Molecular Pharmacology**, v. 8, 2015.

RABELLO, M. M. **Desenvolvimento e automação de metodologias in silico para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

RAVINDRANATH, P. A. et al. AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 12, p. e1004586, dez. 2015.

ROGNAN, D. The impact of in silico screening in the discovery of novel and safer drug candidates. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 47–66, 1 jul. 2017.

ROSA, L. S. et al. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer – a review. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2016.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421–7, out. 2014.

SALEH, M. A. et al. Inhibition of DNA Topoisomerase Type II α (TOP2A) by Mitoxantrone and Its Halogenated Derivatives: A Combined Density Functional and Molecular Docking Study. **BioMed research international**, v. 2016, p. 6817502, 2016.

SANGI, D. P. SYNTHETIC STRATEGIES IN DRUG DISCOVERY: EMPLOYING DIVERSITY-ORIENTED SYNTHESIS. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995–1006, 2016.

SANTOS, E. A. **Estudo da atividade citotóxica da alfa-lapachona e seu derivado tetrahidropirano**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2012.

SANTOS, J. L. et al. Mutagenic and genotoxic effect of hydroxyurea. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 7, n. 4, p. 263–7, dez. 2011.

SARKAR, F. H. et al. Cellular signaling perturbation by natural products. **Cellular signalling**, v. 21, n. 11, p. 1541–7, nov. 2009.

SHARMA, A. et al. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 721, n. 2, p. 142–146, 3 abr. 2011.

SHARMA, N. K. et al. Nitric Oxide Down-Regulates Topoisomerase I and Induces Camptothecin Resistance in Human Breast MCF-7 Tumor Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0141897, 5 nov. 2015.

SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy.

Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 1 ago. 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, jan. 2016.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, maio 2003.

SORDET, O. et al. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 3, n. 4, p. 271–90, jul. 2003.

SOUZA, M. A. A. DE et al. Atividade biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1670–1672, 2008.

STAKER, B. L. et al. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15387–15392, 2002.

SUN, L. et al. In Silico Prediction of Compounds Binding to Human Plasma Proteins by QSAR Models. **ChemMedChem**, v. 13, n. 6, p. 572–581, 10 nov. 2017.

SUNASSE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98–110, 2013.

TAMURA, N. et al. Analysis of type of cell death induced by topoisomerase inhibitor SN-38 in human oral squamous cell carcinoma cell lines. **Anticancer research**, v. 32, n. 11, p. 4823–32, nov. 2012.

TAYLOR, W. F.; JABBARZADEH, E. The use of natural products to target cancer stem cells. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 7, p. 1588–1605, 2017.

TERAMOTO, R.; FUKUNISHI, H. Supervised consensus scoring for docking and virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 2, p. 526–534, mar. 2007.

THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69, p. 29–41, 2014.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.

TIHANYI, K.; VASTAG, M. **Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drug candidates**. Budapest: Bentham eBooks, 2011.

TSAIOUN, K.; KATES, S. A. **ADMET for Medicinal Chemists: a Practical Guide**. New Jersey: Hoboken, 2011.

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 3–10, jan. 2010.

VASCONCELLOS, M. C. DE. **Estudo do potencial antineoplásico da biflorina, o-naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora* L.** [s.l.] Universidade Federal do

Ceará, 2007.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 1 ago. 2003.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, abr. 2006.

VIEIRA, A. A. et al. Hybrid compounds with two redox centres: Modular synthesis of chalcogen-containing lapachones and studies on their antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 254–265, 2015.

WADOOD, A. et al. In-silico drug design: an approach which revolutionarised the drug discovery process. **OA Drug Design and Delivery**, v. 1, n. 1, 2013.

WARDLE, J. et al. Screening for Prevention and Early Diagnosis of Cancer. **American Psychologist**, v. 70, n. 2, p. 119–133, 2015.

WEI, H. et al. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37041–7, 4 nov. 2005.

WENDORFF, T. J. et al. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. **Journal of molecular biology**, v. 424, n. 3–4, p. 109–24, 7 dez. 2012.

WOLF, A. et al. In Silico Drug Discovery Approaches on Grid Computing Infrastructures. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 37–46, 1 fev. 2010.

XIN, L.-T. et al. Discovery of DNA Topoisomerase I Inhibitors with Low-Cytotoxicity Based on Virtual Screening from Natural Products. **Marine drugs**, v. 15, n. 7, 9 jul. 2017a.

XIN, L.-T. et al. Discovery of DNA Topoisomerase I Inhibitors with Low-Cytotoxicity Based on Virtual Screening from Natural Products. **Marine drugs**, v. 15, n. 7, 9 jul. 2017b.

YANG, R. **Potenciais candidatos a novos antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos da queleritrina planejados por simplificação molecular**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

YAZDANIAN, M. et al. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 9, p. 1490–4, set. 1998.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 6, p. 763–6, jun. 1997.

YOUSUF, Z. et al. Structure-based virtual screening and molecular docking for the identification of potential multi-targeted inhibitors against breast cancer. **Breast cancer: Targets and Therapy**, v. 9, p. 447–459, 2017.

YU, S.-M.; HU, D.-H.; ZHANG, J.-J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 3, p. 3869–73, 2015.

ZHANG, C.; QU, Y.; NIU, B. Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 22, p. 5781–5786, 15 nov. 2016.

ZHAO, G. et al. Enhanced intestinal absorption of etoposide by self-microemulsifying drug delivery systems: roles of P-glycoprotein and cytochrome P450 3^a inhibition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3-4, p. 429-439, 20 nov. 2013.