

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

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA DA BIFLORINA:  
UMA ABORDAGEM IN SILICO**

THIAGO ANDRÉ ALBUQUERQUE DE SOUZA

MANAUS

2021

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

THIAGO ANDRÉ ALBUQUERQUE DE SOUZA

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA DA BIFLORINA:  
UMA ABORDAGEM IN SILICO**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2021

## Ficha Catalográfica

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

Souza, Thiago André Albuquerque

Toxicologia e Farmacologia da Biflorina: Uma Abordagem In Silico  
/ Thiago André Albuquerque de Souza. 2021

68f.: il. Color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. Ancoragem molecular. 2. Biflorina. 3. Câncer. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de II. Universidade Federal do Amazonas. III. Título.

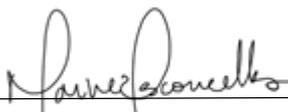
**THIAGO ANDRÉ ALBUQUERQUE DE SOUZA**

**TOXICOLOGIA E FARMACOLOGIA DA BIFLORINA:  
UMA ABORDAGEM IN SILICO**

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

Aprovada em 30 de junho de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**



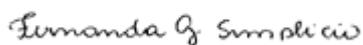
---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marne Carvalho de Vasconcellos  
Orientadora/Presidente – Universidade Federal do Amazonas



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Carvalho Montenegro  
Membro externo – Universidade Federal do Ceará



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Guilhon Simplicio  
Membro interno – Universidade Federal do Amazonas

*“O mundo é dos fortes. É verdade. Somente chegará lá ou em qualquer outro lugar os que realmente se destacarão pela força. Força essa que muitos querem ter, mas poucos se dispõem. Porque essa força, ao contrário do pensamento de muitos, exige humildade, aparente fraqueza, submissão ao Senhor de todas as coisas. És um forte. Chegarás aonde quiseres porque tens a força dos que confiam no Senhor e renovam suas energias, sobem com asas de águias, correm e não se cansam, caminham e não se fadigam. Siga em frente amigo querido. Siga com tua força inabalável porque ela vem de Deus, o Todo Poderoso.”*

*(minha amiga Ione Pinheiro)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, a razão de toda a minha existência, o meu tesouro. Desde o ventre da minha mãe, Ele tem cuidado de mim e preparado planos inimagináveis para a minha vida. Nunca me abandonou e nunca me desamparou, sempre esteve com os braços estendidos para me ajudar e apontar novos caminhos para seguir. Prometo sempre cantar e contar tuas histórias, meu Deus.

Nem as melhores palavras deste mundo descreveriam a gratidão que há no meu coração pela vida da minha mãe, Vera Lúcia desde sempre abriu mão de tudo por mim, para viver os meus sonhos. Espero um dia poder retribuir tudo aquilo que a senhora depositou em minhas mãos, seja o seu carinho, o seu cuidado, os seus recursos adquiridos com tanto esforço. Mãe, eu te amo e te amarei até o fim.

À minha família, em especial a minha irmã Aryanna que está sempre disponível para me ajudar, seja em qual for a situação. Minhas tias Rosimeiry e Meiry Jane, que estão sempre intercedendo pela minha vida. Gratidão aos meus primos que são praticamente irmãos, gratidão ao meu pai Elizomar por sempre me lembrar de quem eu sou. Sem vocês, eu estaria perdido.

Quero ser grato aos meus avós (*in memoriam*), que sonharam com esse momento, que sempre me diziam onde eu poderia chegar. Vovó Raimunda e vovô Antenor, minhas vitórias são fruto de suas orações. Vovó Nair, que apostou que eu iria longe, imagino sua alegria vivendo este momento comigo. Nos encontraremos na eternidade.

À minha orientadora, Prof. Marne Carvalho de Vasconcellos, que sempre esteve a disposição para me ajudar. A senhora não faz ideia da diferença que a senhora fez na minha vida quando em 2015 abriu as portas da UFAM para mim, mesmo nem me conhecendo, mesmo sendo aluno de uma faculdade particular... a senhora mudou a minha vida! Obrigado por tudo.

Aos meus amigos, que sempre me apoiam, meu Trio C: Cris, Clícia e Cássia, vocês sempre me escutando e enxugando minhas lágrimas, abrindo meus olhos, me aconselhando, seja de perto ou de longe. Minha amiga Litu, que não hesita em me ajudar em tudo. Minha mãe do coração, Prof. Roberta Mainardi, quero sempre lhe orgulhar. Amo vocês!

Meus parceiros de BIOPHAR, sem vocês eu estaria num mato sem cachorro, sem vocês eu estaria até hoje estagnado. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim neste tempo. Kríscia, Ellen, Evelyn, Bárbara, Leilane, Bianca, Diana a vocês toda a minha admiração. Tallitinha, minha dívida com você é eterna, esse trabalho não teria dado em nada se você não estivesse se disposto e estendido sua mão a mim, muitíssimo obrigado.

À Universidade Federal do Amazonas que me abraçou desde o PIBIC. Obrigado pelas experiências proporcionadas e por ter me feito crescer. Gratidão a todos os professores e servidores.

## RESUMO

A descoberta de novos fármacos utiliza cada vez mais os métodos *in silico*, os quais têm se demonstrado uma ferramenta importante nos estágios iniciais de pesquisa para a identificação, seleção e otimização de moléculas com potencial terapêutico. Estudos realizados com a biflorina apontam essa orto-naftoquinona como uma molécula promissora na pesquisa de fármacos para o tratamento do câncer, visto que sua atividade citotóxica foi evidenciada sobre células tumorais de diversos tipos de câncer, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste contexto, este estudo correlacionou as propriedades físico-químicas, o potencial toxicológico e farmacológico da biflorina descritos na literatura com os achados *in silico*. Além disso, investigou-se a interação da biflorina com os seguintes alvos biológicos: AKT-1, BRAF, EGFR, topoisomerase I, topoisomerase II $\alpha$  e II $\beta$ . Para a avaliação dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos da biflorina foram utilizados os softwares SwissADME® e PreADMET®, respectivamente. A avaliação dos parâmetros toxicológicos referentes à carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade e efeitos irritativos, foi realizada através dos softwares PreADMET®, Osiris Property Explorer®, admetSAR®, ProTox-II® e Lazar Toxicity Predictions®. A interação da biflorina com os alvos biológicos propostos foi investigada por meio de ancoragem molecular utilizando o software Autodock Vina®. A literatura disponível demonstrou relevantes estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com a biflorina, entretanto, não foram encontrados estudos envolvendo metodologias *in silico*. As análises da biflorina apontaram propriedades físico-químicas que a tornam elegível para o desenvolvimento de um fármaco e os resultados da análise toxicológica *in silico* demonstraram que a biflorina é uma substância segura. A análise por ancoragem molecular da interação da biflorina com os alvos biológicos, indicou que a inibição de AKT-1 pela biflorina não se dá pela interação direta com esta enzima e sim pela interação com N-caderina, que a inibição da expressão de EGFR acontece pela interação da biflorina com as enzimas envolvidas nesta via, e não pela interação direta com este alvo, e que a indução de morte celular em células de melanoma que expressam o BRAF é causada possivelmente pela ligação com outras enzimas envolvidas no ciclo celular e não pela interação direta com este alvo. Em relação às topoisomerasas, foi observada a interação da biflorina com essa enzima *in silico*, mas não com a topoisomerase do tipo II, o que indica que estudos mais robustos precisam ser realizados com este alvo a fim de elucidar o real mecanismo desta interação. Todos esses dados compilados podem contribuir para o estudo do mecanismo de ação dessa promissora molécula com potencial anticâncer, um dos maiores desafios da terapêutica nos dias atuais.

Palavras-chave: ancoragem molecular, biflorina, câncer.

## ABSTRACT

The discovery of new drugs increasingly uses *in silico* methods, which have proven to be an important tool in the early stages of research for the identification, selection and optimization of molecules with therapeutic potential. Studies carried out with biflorin point to this ortho-naphthoquinone as a promising molecule in the research of drugs for the treatment of cancer, since its cytotoxic activity was evidenced on tumor cells of different types of cancer, both *in vitro* and *in vivo*. In this context, this study correlated the physicochemical properties, the toxicological and pharmacological potential of biflorin described in the literature with the *in silico* findings. Furthermore, the interaction of biflorin with the following biological targets was investigated: AKT-1, BRAF, EGFR, topoisomerase I, topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$ . To evaluate the physicochemical and pharmacokinetic parameters of biflorin, the software SwissADME<sup>®</sup> and PreADMET<sup>®</sup>, respectively, were used. The evaluation of toxicological parameters related to carcinogenicity, mutagenicity, genotoxicity, hepatotoxicity and irritant effects was performed using PreADMET<sup>®</sup>, Osiris Property Explorer<sup>®</sup>, admetSAR<sup>®</sup>, ProTox-II<sup>®</sup> and Lazar Toxicity Predictions<sup>®</sup> software. The interaction of biflorin with the proposed biological targets was investigated through molecular anchorage using Autodock Vina<sup>®</sup> software. The available literature showed relevant *in vitro* and *in vivo* studies performed with biflorin, however, no studies involving *in silico* methodologies were found. Biflorin analyzes pointed out physicochemical properties that make it eligible for drug development and the results of the *in silico* toxicological analysis demonstrated that biflorin is a safe substance. Molecular anchoring analysis of the interaction of biflorin with biological targets indicated that the inhibition of AKT-1 by biflorin does not occur by direct interaction with this enzyme, but by interaction with N-cadherin, that the inhibition of EGFR expression occurs by the interaction of biflorin with the enzymes involved in this pathway, and not by direct interaction with this target, and that the induction of cell death in melanoma cells expressing BRAF is possibly caused by binding with other enzymes involved in the cell cycle and not by direct interaction with this target. Regarding topoisomerases, the interaction of biflorin with this enzyme *in silico* was observed, but not with topoisomerase type II, which indicates that more robust studies need to be carried out with this target in order to elucidate the real mechanism of this interaction. All these compiled data can contribute to the study of the mechanism of action of this promising molecule with anticancer potential, one of the biggest challenges in therapy today.

Keywords: docking molecular, biflorin, cancer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A – arbusto de <i>Capraria biflora</i> . B – raízes de <i>Capraria biflora</i> .....	16
Figura 2: Estrutura química da biflorina .....	17
Figura 3: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da AKT-1. B - Interações do GSK3 (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da AKT-1 .....	51
Figura 4: A- Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo do EGFR. B - Interações do dabrafenibe (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo do EGFR .....	52
Figura 5: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo do BRAF. B - Interações do JBJ (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo do BRAF .....	53
Figura 6: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I. B - Interações do topotecano (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I .....	54
Figura 7: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa. B - Interações do etoposídeo (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa .....	55
Figura 8: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta. B - Interações do etoposídeo (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta .....	56

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades moleculares da biflorina.....	38
<b>Tabela 2.</b> Avaliação in silico de parâmetros relacionados à absorção e distribuição da biflorina.....	40
<b>Tabela 3.</b> Predição do parâmetro de <b>carcinogenicidade</b> realizada nas ferramentas PreADMET, OSIRIS, ADMETSAR e PROTOX-II.....	45
<b>Tabela 4.</b> Predição do parâmetro de <b>mutagenicidade</b> realizada nas ferramentas PreADMET, OSIRIS, ADMETSAR, LAZAR e PROTOX-II, em comparação com os resultados dos estudos anteriores in vitro .....	46
<b>Tabela 5.</b> Predição do parâmetro de <b>genotoxicidade</b> realizada na ferramenta OSIRIS, em comparação com os estudos in vitro realizados anteriormente .....	47
<b>Tabela 6.</b> Previsão da <b>hepatotoxicidade</b> da biflorina segundo as ferramentas ADMETSAR e PROTOX-II, em comparação com o estudo in vitro realizado anteriormente .....	48
<b>Tabela 7.</b> Previsão da capacidade de risco para <b>efeitos irritativos</b> da biflorina segundo as ferramentas OSIRIS e PROTOX-II.....	49
<b>Quadro 1.</b> Parâmetros avaliados na regra dos cinco de Lipinski.....	30
<b>Quadro 2.</b> Aminoácidos selecionados para a construção do <i>grid box</i> .....	33
<b>Quadro 3.</b> Dimensões do <i>grid box</i> para a realização da ancoragem molecular.....	34
<b>Quadro 4.</b> Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do <i>redocking</i> .....	35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ABS	Taxa de absorção
cDNA	DNA complementar
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MMFF	<i>Mechanics Molecular Force Field</i>
MYC	Gene MYC
NA	Número de átomos
NALH	Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio
NDLH	Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio
pH	Potencial hidrogeniônico
RM1	<i>Recife Model 1</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
TPSA	Área Superficial Polar Topológica

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Produtos Naturais .....	14
2.2 Biflorina.....	15
2.3. Farmacocinética de Moléculas .....	19
2.3 Alvos Farmacológicos da Biflorina.....	23
2.4 Triagem Virtual e Ancoragem Molecular .....	25
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral .....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Pesquisa Bibliográfica .....	30
4.2 Análise dos Parâmetros Moleculares da Biflorina e da Doxorubicina.....	30
4.3. Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos da Biflorina .....	31
4.4. Análise do Perfil Toxicológico da Biflorina .....	31
4.5 Seleção dos alvos biológicos .....	31
4.6 Preparo dos ligantes .....	32
4.7 Preparo dos alvos .....	32
4.8 Ancoragem molecular.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Trabalhos utilizados nesta pesquisa.....	38
5.2 Propriedades Físico-Químicas da Biflorina.....	38
5.3 Propriedades Farmacocinéticas da Biflorina .....	40
5.4 Perfil Toxicológico da Biflorina.....	43
5.4.1 Carcinogenicidade .....	44
5.4.2 Mutagenicidade .....	45
5.4.4 Genotoxicidade.....	46
5.4.5 Hepatotoxicidade .....	47
5.4.6 Efeitos Irritativos .....	48
5.5 Ancoragem Molecular .....	49
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de descoberta de novos fármacos é considerado caro e demorado, sobretudo a etapa de triagem (DE LEON, FROHLICH, SAAR-BEHZADI, 2021). Para auxiliar nesta etapa, estão sendo utilizados métodos computacionais capazes de prever características toxicológicas e a interação das moléculas com possíveis alvos biológicos, tais métodos servem para nortear futuros estudos adicionais de acordo com a necessidade de aprofundamento (BHAT, CHATTERJEE, 2021).

O uso de ferramentas *in silico* baseadas na estrutura do ligante ou do alvo auxiliam neste rastreamento no que diz respeito ao mecanismo de ação destas novas moléculas, diminuindo a quantidade de compostos a serem testados experimentalmente, reduzindo assim o tempo gasto com essas análises e o custo deste rastreio (DE LEON, FROHLICH, SAAR-BEHZADI, 2021). Essas ferramentas também podem contribuir para o estudo da farmacocinética das substâncias promissoras (FAN et al, 2014), que é uma ciência que utiliza modelos matemáticos para descrever a cinética, mostrando a evolução temporária do fármaco e/ou seus metabólitos no organismo (RUIZ-GARCIA ET AL, 2007).

Há a necessidade de se buscar por novas terapias contra o câncer, pois a eficácia clínica dos esquemas terapêuticos disponíveis nem sempre é satisfatória para o seu tratamento. A palavra câncer tem origem latina e significa “caranguejo”, fazendo referência ao comportamento de crescimento infiltrante, tal como as pernas do crustáceo. O estudo das bases moleculares no desenvolvimento de tumores (tumorigênese) forneceu suporte para o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de alterações moleculares. Este acúmulo de alterações genéticas confere à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação clonal (HANAHAN E WEINBERG, 2011; SHAN et al, 2020).

A resistência aos medicamentos adquirida pelas células tumorais é um problema recorrente, tornando-se um obstáculo para o sucesso da resposta farmacológica. Dada a necessidade de se encontrar novos agentes farmacológicos que sejam eficazes e transcendam os problemas apresentados pelas opções de tratamento atualmente disponíveis, vários pesquisadores têm se dedicado a estudar a atividade farmacológica de substâncias de origem natural. Os produtos naturais são uma das alternativas para o desenvolvimento de novas moléculas e desde muito tempo fornecem substâncias promissoras para novos medicamentos anticâncer (VASCONCELLOS et al, 2011; MONTENEGRO et al, 2013a).

A biflorina é uma substância extraída das raízes de *Capraria biflora* L, a qual demonstra diversas propriedades, entre elas, antibacterianas e antifúngicas. Estudos anteriores revelaram que ela é uma forte candidata a tornar-se um medicamento para o tratamento do câncer, visto que sua atividade citotóxica foi evidenciada sobre células tumorais de diversos tipos de câncer, tanto in vitro como in vivo, contudo seu mecanismo de ação ainda não é esclarecido (VASCONCELLOS et al, 2007; VASCONCELLOS et al, 2011; MONTENEGRO et al, 2013a; BARBOSA-JOBIM et al, 2020).

Diante de resultados tão significativos relacionados a atividade biológica da biflorina, uma substância com potencial citotóxico em células tumorais e com capacidade de interagir com importantes alvos biológicos, e a importância de aprofundar as pesquisas relacionadas a toxicidade, a farmacocinética e o mecanismo de ação desta substância, acredita-se que os testes propostos neste trabalho trarão esclarecimentos capazes de nortear futuros estudos e orientar a aplicação desta substância, sobretudo na terapêutica oncológica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Produtos Naturais

O estudo dos produtos naturais é de extrema importância pois eles representam um grande arsenal de moléculas que contribuirão para a descoberta de novas moléculas, sobretudo, uma fonte notável para novos medicamentos com atividade anticâncer, dentre outras atividades (MONTENEGRO et al, 2013a; DING et al, 2016).

Muitos estudos têm demonstrado que os produtos naturais podem ser utilizados no tratamento de uma infinidade de doenças. Vários medicamentos vêm surgindo a partir de compostos químicos naturais isolados que possuem determinadas estruturas e funcionam como uma base na química combinatória, que quando ligadas com outras moléculas dão origem a novas moléculas com potencialidades terapêuticas (LIU et al, 2019). Os produtos naturais continuam representando a melhor opção de fonte para novos princípios ativos, que aliada à química combinatória pode promover o desenvolvimento de novas estruturas com potencial para combater uma variedade de doenças (NEWMAN & CRAGG, 2020).

Os produtos naturais provenientes de microrganismos, animais e plantas possuem características biológicas bem interessantes e por isso, pesquisadores têm investido no estudo destas moléculas, a fim de suscitar novas terapêuticas para diversas doenças. Um exemplo disso foi o avanço excepcional no estudo de produtos naturais no campo da oncologia, especialmente no século XX, propiciando a descoberta de diversos medicamentos utilizados atualmente (NEWMAN & CRAGG, 2007; CRAGG et al, 2009). De acordo com Newman & Cragg (2020), dos agentes antitumorais descobertos entre 1946 e 2019, quase 80% originaram-se a partir de produtos naturais.

Dentre esses compostos que possuem atividade citotóxica está a biflorina, uma substância extraída das raízes de *Capraria biflora* L., uma planta que pode ser encontrada na Amazônia Peruana. A Amazônia, bem como outros biomas, são celeiros de produtos naturais que necessitam cada vez mais ser estudados, principalmente no que diz respeito às terapias tradicionais. A investigação destes tratamentos empíricos pode render várias descobertas relacionadas ao tratamento de diversas doenças. Um fator que contribui bastante para o estudo de novas substâncias na Amazônia é a enorme biodiversidade deste ecossistema, por meio dele vários compostos com atividades citotóxicas em células tumorais já foram descritos (ODONNE, 2017; GALÚCIO et al, 2019).

## **2.2 *Capraria biflora* L. e Biflorina**

*Capraria biflora* L. (figura 1), é uma espécie de arbusto perene, pertencente à família Scrophulariaceae, podendo ser encontrada em zonas temperadas e áreas de clima tropical, sendo original das Antilhas e América do Sul. Pode ser encontrada ainda em países da Ásia, como Índia e China, nas Américas Central, do Norte e do Sul em países como Bahamas, Panamá e Guatemala, Estados Unidos, México, Peru, Guiana Francesa e Brasil, respectivamente. Em território brasileiro pode ser encontrada em estados como o Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais Ceará e Piauí (VASCONCELLOS et al, 2005; AQUINO et al., 2006; MONTENEGRO et al, 2013a). O uso popular de *Capraria biflora* L. inclui várias indicações como alívio da dor, febre, gripe, recuperação do parto, reumatismo, inchaço e distúrbios gastrintestinais, tais como, vômito e diarreia (AQUINO et al., 2006).

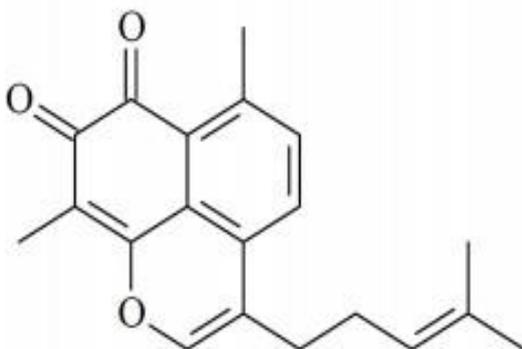


Figura 1: A – arbusto de *Capraria biflora*. B – raízes de *Capraria biflora*.  
Fonte: Vasconcellos MC, 2007.

*Capraria biflora* L têm como principais contituíntes químicos as quinonas, que representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Sua importância se destaca nos processos bioquímicos vitais e em estudos farmacológicos por apresentarem propriedades antitumorais, microbicidas, tripanomicidas, viruscidas e inibição do complexo das topoisomerasas, as quais vem sendo estudadas como alvo para várias moléculas usadas no tratamento do câncer. Quimicamente, as quinonas são divididas em vários grupos por suas diferenças moleculares, tendo como principal critério o tipo de anel quinonoídico (VASCONCELLOS et al., 2016).

Entre as quinonas, as naftoquinonas caracterizam-se por possuírem um anel naftalênico e têm como principal representante o lapachol, apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e possuem compostos bastante promissores com atividade antitumoral, como a juglona e a plumbagina (VASCONCELLOS, 2007). A biflorina (figura 2), uma orto-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil) nafta[1,8-bc]-pran-7,8-diona) de origem natural, é um composto ativo extraído facilmente das raízes de *C. biflora*. No primeiro estudo

fitoquímico realizado após a extração e isolamento da biflorina, foram demonstradas suas atividades bactericida e fungicida (GONÇALVES DE LIMA et al., 1953). Um estudo recente também revelou que a biflorina demonstrou efeitos positivos na disfunção cognitiva, apoiando a possibilidade de que possa ser usada no tratamento de doenças como o Alzheimer (JEON et al., 2017).



**Figura 2:** Estrutura química da biflorina.

A atividade citotóxica *in vitro* da biflorina vem sendo relatada por diversos estudos em em diferentes linhagens celulares tumorais, a saber, melanoma murino (B16), melanoma humano (UACC-62; UACC-257; MDA-MB-435; M14; SK-Mel 19, SK-Mel 28 e SK-Mel 103; A-375), câncer de mama humano (MCF7; MDA-MB-231; MX1; SK-Br3), carcinoma de laringe (Hep-2), câncer de pulmão humano (NCI H23; NCI H266), câncer gástrico (ACP02; AGP01; PG100), leucemia humana (CEM; HL60; K562), carcinoma de cólon (HCT-8; HT-29), carcinoma de próstata (PC-3), adenocarcinoma cervical (HeLa), glioblastoma (SF-295), linhagem não tumoral V79 (pulmão de hamster) e linfócitos humanos (PBMC) (VASCONCELLOS et al., 2005; VASCONCELLOS et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 2011; MONTENEGRO et al., 2013a; MONTENEGRO et al., 2013b; WINSINTAINER et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2016; RALPH et al., 2016; BARBOSA-JOBIM et al., 2020).

Vasconcellos e colaboradores (2005), investigaram a atividade citotóxica da biflorina em ovos de ouriço-do-mar, demonstrando que esta substância não é capaz de inibir o desenvolvimento desses embriões. E, ainda, sua capacidade de induzir hemólise em hemácias de camundongos demonstrando que essa substância não possui atividade hemolítica, o que sugere que sua citotoxicidade não está relacionada à ruptura da membrana plasmática.

Quanto ao seu mecanismo de ação, a biflorina mostrou-se capaz de diminuir a expressão de N-caderina, via inibição da expressão de AKT1, em células de melanoma (MDA-MB-435) (MONTENEGRO et al., 2013a) e dos genes BRAF, MELK, TYMS e RAD também em melanoma (SK-Mel 28 - expressa TP53R273H e BRAFV600E) (RALPH et al., 2016), além de diminuir a expressão do gene EGFR em células neoplásicas de mama (SK-Br3) (MONTENEGRO et al., 2013b) e a expressão e amplificação do gene MYC em células de câncer gástrico (AGP02) (BARBOSA-JOBIM et al., 2020), no entanto, é capaz de aumentar a expressão gênica de TYMS, RAD e MGMT em linhagens geneticamente diferentes de melanoma (SK-Mel 103 - expressa BRAF tipo selvagem e NRASQ61R) (RALPH et al., 2016).

A atividade antitumoral *in vivo* da biflorina foi demonstrada em camundongos transplantados com Sarcoma 180, carcinoma de Erlich e com células de melanoma murino B16, no entanto, sem uma expressiva toxicidade sistêmica nos animais tratados, mas com expressiva diminuição do volume tumoral nos animais transplantados com Sarcoma 180 e carcinoma de Erlich, principalmente quando associada ao quimioterápico 5-fluorouracil (VASCONCELLOS et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2011). Além disso, a biflorina foi associada a uma diminuição no volume tumoral e à diminuição da formação de metástase em melanoma murino B16 e B16-F10, respectivamente, e ao aumento da sobrevivência de camundongos transplantados com estas células (VASCONCELLOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2013).

Somado a esses resultados, a biflorina revelou potencial genotóxico em linfócitos humanos, porém, sem induzir danos cromossômicos ou alterações numéricas nas diferentes

fases do ciclo celular sugerindo que o dano causado no DNA dos linfócitos pôde ser reparado, não induzindo a mutação (VASCONCELLOS et al., 2010). Seu potencial genotóxico ou mutagênico também foi testado em outros modelos biológicos como, por exemplo, em 5 linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA97a; TA98; TA100; TA102 e TA1535), em 2 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (XV-18514c e XS2316) e em medula óssea de camundongos, e foi demonstrado que a biflorina não foi capaz de induzir genotoxicidade, mutagenicidade, e clastogenicidade, respectivamente (VASCONCELLOS et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2010).

### **2. 3. Importância da Farmacocinética no desenvolvimento de fármacos**

A área da farmacologia que estuda o comportamento das moléculas após a sua administração por meio dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) é a farmacocinética. Para se desenvolver terapêuticas seguras e eficazes, é importante que se compreendam estes determinantes dos processos farmacocinéticos, que são altamente integrados, permitindo explicar e prever variados eventos e os efeitos relacionados à eficácia e a toxicidade dos fármacos (GLASSMAN & BALTHASAR, 2019; SHIKOV et al., 2020; ZHANG, 2019).

O estudo da farmacocinética é essencial dentro do processo de formulação dos medicamentos. Dados relacionados à absorção fornecem informações sobre a via de administração mais adequada. A análise da distribuição dos fármacos é útil na determinação da atividade farmacológica e permite a identificação de possíveis efeitos tóxicos provenientes do acúmulo da molécula em órgãos específicos, também é importante que se utilize recursos a fim de avaliar e entender em qual órgão ou tecido a molécula é metabolizada, bem como os metabólitos produzidos e as atividades desenvolvidas por eles. Todo esse conjunto de

informações contribuí para o desenvolvimento de moléculas altamente eficazes (SHIKOV et al., 2020).

Dentre os diferentes parâmetros que determinam a concentração da molécula ao longo dos processos ADME, estão a meia vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ), intervalo de tempo em que ocorre a perda de metade da concentração do fármaco após sua administração; a área sobre a curva (AUC), que indica a concentração do fármaco no plasma sanguíneo ao longo do tempo; depuração (Cl), que é a medida da capacidade do organismo em eliminar um fármaco; concentração máxima ( $C_{máx}$ ), alcançada quando a taxa de eliminação do fármaco se iguala à taxa de absorção; e o tempo em que a  $C_{máx}$  é observada ( $T_{máx}$ ); o volume de distribuição no sangue ( $V_{ss}$ ); e a biodisponibilidade (F), que indica a extensão e a velocidade em que o fármaco adentra a circulação sistêmica e alcança o local de ação (SAHIN & BENET, 2008; SHIKOV et al., 2020).

Um medicamento só pode ser considerado absorvido depois de ter entrado nos capilares sanguíneos, ou seja, atingir a circulação sistêmica. Essa absorção depende de vários fatores físico-químicos, entre eles, a lipofilicidade e a solubilidade. A passagem de fármacos depende de suas características de permeabilidade para penetrar na bicamada lipídica da membrana das células epiteliais. Uma baixa lipofilicidade, por exemplo, pode resultar em uma baixa absorção, enquanto moléculas lipofílicas são mais absorvidas. Para medicamentos que tenham como alvo o sistema nervoso central (SNC), esses parâmetros devem ser cuidadosamente observados, visto que para que os medicamentos cruzem a barreira hematoencefálica, eles precisam possuir uma lipofilicidade suficiente (ALAVIJEH et al., 2005; PAI, BHANDARI & SHUKLA, 2017).

Moléculas transportadoras, em conjunto com enzimas metabolizadoras, são essenciais para a resposta farmacológica pois medeiam a absorção, a distribuição e a eliminação dos fármacos dos tecidos. Portanto, para alcançar um melhor resultado terapêutico, é fundamental que se conheça o papel dos transportadores como um determinante da concentração do fármaco

no local de ação (RIZK et al., 2017). A maioria destas enzimas metabolizadoras é encontrada no fígado, porém também podem ser encontradas em outros tecidos como o pulmão. O metabolismo oxidativo pelas enzimas do citocromo p450 é o principal método de metabolização da molécula (ALAVIJEH et al., 2005).

As enzimas do citocromo p450 estão envolvidas em aproximadamente 75% das reações enzimáticas que ocorrem no metabolismo das moléculas utilizadas clinicamente e são indispensáveis dentro desse processo. As enzimas desta família facilitam a eliminação de moléculas e modificam as suas atividades, e a inibição dessas enzimas causadas pela coadministração ou pelo abuso de substâncias pode aumentar o risco de efeitos adversos (GUENGERICH, WATERMAN e EGLI, 2016; WANG et al., 2020).

A família CYP2 é a maior família CYP, representando cerca de 30% das isoformas humanas. Existem cinco subfamílias de CYP2 que metabolizam moléculas (A-E), das quais genes importantes farmacologicamente exibem altos níveis de interação. A subfamília CYP2C possui quatro genes, CYP2C8, 2C9, 2C18 e 2C19. A CYP2C9 é a isoenzima mais expressa das quatro no fígado e a 2C19 compreende 16% da família CYP2C. a família CYP3 consiste em apenas uma subfamília, a CYP3A, e possui quatro genes funcionais, CYP3A4, 3A5, 3A7 e 3A43. Dentre as enzimas metabolizadoras mais importantes está a CYP3A4, a principal P450 hepática e intestinal em humanos (GUENGERICH, WATERMAN e EGLI, 2016; AHMAD, VALENTOVIC & RANKIN, 2018; WANG et al., 2020).

Parâmetros farmacocinéticos podem ser afetados por doenças graves e comorbidades. Já foi demonstrado que a absorção de azóis e outros antifúngicos administrados por via oral pode ser afetada em pacientes com comprometimento gastrointestinal causado por quimioterapia anticâncer ou perfusão gastrointestinal, por exemplo. O metabolismo de medicamentos também pode ser comprometido em casos de disfunção hepática e renal. A distribuição e a eliminação também podem ser afetadas em casos de suporte de órgãos extracorpóreos (BELLMANN &

SMUSZKIEWICZ, 2017). Diante disso, é importante que a farmacocinética das moléculas esteja profundamente caracterizada, a fim de que se estabeleçam as doses corretas e que seja selecionado o melhor esquema de tratamento, resultando em uma melhor aplicação do medicamento (SHIKOV et al., 2020).

Estudos farmacocinéticos voltados para compostos naturais da classe das naftoquinonas vem sendo realizados a fim de melhorar a aplicabilidade de suas propriedades biológicas no tratamento de doenças. O lapachol, uma naftoquinona com diversas atividades descritas, entre elas, a antitumoral, apresentou baixa solubilidade em água, o que resulta em uma baixa biodisponibilidade. Entretanto, estratégias vêm sendo utilizadas para superar essas desvantagens, como o uso de sistemas de liberação de medicamentos, que foi bem-sucedido e apresentou características adequadas para a sua administração (MIRANDA et al., 2021).

Em um estudo voltado para a farmacocinética de um derivado de uma naftoquinona, a acetilsiconica, foi demonstrado que a molécula possui uma ampla distribuição, sendo distribuída principalmente no estômago e intestino e na vesícula biliar, fígado, rins e pulmões. Neste mesmo estudo, foi detectado que a substância possui uma alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (ZHANG et al., 2020).

Embora haja poucos estudos envolvendo a caracterização farmacocinética da biflorina, sabe-se que ela é uma substância fotossensível e que possui características hidrofóbicas, o que pode dificultar a sua aplicação na terapêutica (GONÇALVES et al, 1961). Porém, estudos já foram realizados com o intuito de promover uma melhor veiculação do fármaco utilizando nanoestruturas micelares, o que melhorou a sua aplicabilidade (SANTANA et al., 2015).

### 2.3 Alvos Farmacológicos da Biflorina

Estudos anteriores realizados com linhagens celulares de melanoma (incluir a linhagem) demonstraram que a biflorina diminuiu a expressão de N-caderina de maneira dose-dependente. Essa proteína tem uma elevada expressão em células de melanoma, câncer de mama e próstata. Os achados sugerem que inibidores de N-caderina podem ser utilizados na terapia, visto que esses medicamentos demonstraram causar apoptose em diversos tipos celulares (MONTENEGRO et al, 2013a).

Neste mesmo estudo, sugere-se que a biflorina foi capaz de promover a inibição de AKT-1, por intermédio da regulação negativa de N-caderina. A AKT é uma proteína quinase específica de serina/treonina e possui isoformas, tais como, a AKT-1, AKT-2, AKT-3 e estão envolvidas em etapas cruciais da tumorigênese, a angiogênese, invasão do tecido e metástase. De acordo com dados na literatura, a inibição de AKT-1 resulta em inibição da motilidade, invasão e migração celular (MONTENEGRO et al, 2013a).

As topoisomerases tipo I e II são enzimas cruciais no controle e modificação do estado topológico do DNA, sendo fundamentais na regulação do ciclo celular. Com a descoberta deste mecanismo, estudos voltados para a quimioterapia passaram a considerar as topoisomerases como alvos viáveis e validados para moléculas com atividade anticâncer. Inibidores de topoisomerase I, como a camptotecina e seus derivados belotecano, topotecano e irinotecano, são amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer. A doxorubicina e a daunorubicina agem inibindo a topoisomerase II, e também contribuem na terapia oncológica (WU et al, 2010; CHEN et al, 2016). A biflorina também foi submetida ao teste de inibição de topoisomerase I em DNA purificado, visto que ela interage com as fitas simples e duplas do DNA, entretanto, constatou-se que esta interação não se dá pela inibição desta enzima (VASCONCELLOS MC, 2007).

A biflorina também demonstrou a capacidade de inibir a expressão de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) em ensaios realizados com a linhagem tumoral SK-Br3 (câncer de mama). Este efeito inibitório da biflorina foi observado na redução da proliferação de células submetidas ao tratamento com esta substância e se deve em parte pela via de sinalização do EGFR regulada negativamente (MONTENEGRO et al, 2013b).

Um estudo realizado por Ralph e colaboradores, 2016 com diferentes linhagens de melanoma demonstrou que a biflorina induziu a morte celular por sua interação com o DNA causando apoptose nas células neoplásicas. Observou-se que a biflorina exerce atividade citotóxica em linhagens celulares de melanoma que expressam o gene BRAF, um importante regulador do crescimento celular, tornando-se uma alternativa para o tratamento de tumores com essas características mutagênicas. Além disso, o estudo revelou que a biflorina consegue superar a resistência pela presença de mutações nos genes NRAS e TP53. Neste mesmo estudo, também foi relatado que a substância reduziu significativamente a expressão dos genes MELK e TYMS, envolvidos na proliferação e regulação do ciclo celular.

A biflorina tem demonstrado citotoxicidade em várias linhagens de câncer, porém um estudo de Barbosa-Jobim e colaboradores, 2020 demonstrou pela primeira vez a atividade citotóxica in vitro da biflorina em células de câncer gástrico. As linhagens celulares utilizadas foram ACP02 (adenocarcinoma gástrico humano), PG100 (adenocarcinoma gástrico humano) e AGP01 (ascite gástrica humana). Outro efeito in vitro demonstrado em células gástricas neoplásicas foi a inibição da proliferação celular, onde os resultados dos ensaios clonogênicos revelaram uma expressiva inibição da formação de colônias de células.

No estudo de Barbosa-Jobim e colaboradores, 2020 foi demonstrado uma redução significativa na expressão e na amplificação do MYC nas células de câncer gástrico tratadas com biflorina, tal oncogene está fortemente envolvido no processo de regulação do crescimento celular. Este gene encontra-se geralmente desregulado no carcinoma gástrico, favorecendo

também alguns aspectos do tumor como a angiogênese, redução da adesão celular e a desdiferenciação. Os pesquisadores sugeriram que ao inibir ou inativar a expressão do MYC, o ciclo celular sofre uma estagnação, dessa forma, as células tumorais param de se proliferar.

Somado a isso, a biflorina também reduz o comprimento dos telômeros. Na maioria das células neoplásicas, a atividade da telomerase encontra-se aumentada resultando no aumento dos telômeros, esta expressão exacerbada torna-se um importante alvo farmacológico na terapia anticâncer, reduzindo a imortalização destas células (BARBOSA-JOBIM et al, 2020).

#### **2.4 Triagem Virtual e Ancoragem Molecular**

O processo de descoberta de novos medicamentos constitui-se de diversas etapas demoradas e que demandam grande aporte financeiro, sobretudo quando estas substâncias partem de origem natural. Ainda na fase inicial dos ensaios clínicos, estima-se que 50% dos compostos considerados promissores falham em aspectos farmacocinéticos e toxicológicos, configurando assim num desperdício de tempo e de capital. Antes da investigação dos efeitos de uma substância chegarem à etapa clínica é necessário garantir a segurança do uso destes fármacos. (DA CUNHA et al., 2016).

. Diante desta problemática, as análises *in silico* vem se tornando uma alternativa fundamental para preceder os estudos *in vitro* e *in vivo*. Essa abordagem pode prever os aspectos toxicológicos reduzindo tempo, recursos e diminuindo a aplicação de bioensaios utilizando animais. possibilitando a triagem de diversos compostos considerados promissores para o tratamento de várias doenças. Dessa forma, são consideradas abordagens perfeitas na otimização do processo de compreensão da atividade destas novas moléculas em relação aos seus alvos biológicos (CUNHA et al., 2016; RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2017).

No estudo de novos fármacos é importante que informações sobre a estrutura da molécula e seus efeitos farmacológicos e toxicológicos sejam determinados para seu sucesso em estudos clínicos, por atuarem de forma complexa em transportadores e enzimas metabolizadoras, permitindo reduzir o tempo e os gastos com seu desenvolvimento e ainda permitir que sejam feitas modificações para otimizar sua atividade (LI et al., 2019; VARMA et al., 2012; ZHANG; TANG, 2018; ANDRADE et al., 2016; GALLO, 2010).

Os parâmetros farmacocinéticos são igualmente importantes para avaliação de candidatos a medicamentos. Os ensaios não clínicos tendem a ser realizados *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, visando avaliar tanto a permeabilidade intestinal como também a estabilidade metabólica, identificar e quantificar metabólitos, identificar rotas metabólicas por catálise enzimática, bem como avaliar a inibição e indução de enzimas envolvidas no metabolismo (ISSA et al., 2017; TYZACK, KIRCHMAIR, 2019; VOLPE, 2020).

Com o passar dos anos, os processos para a descoberta de novos fármacos foram evoluindo e se modernizando. Após a incorporação de metodologias de ancoragem molecular, ou *docking* molecular, tornou-se possível predizer o comportamento de determinadas moléculas em sítios de ligação específicos por meio de *softwares*. Essas abordagens podem ser incorporadas em todas as etapas do processo de descoberta de novas moléculas (EKINS, MESTRES E TESTA, 2007; MOHD HASSAN et al, 2014; PAGADALA, SYED E TUSZYNSKI, 2017). O uso de métodos computacionais (*in silico*) envolvendo ferramentas de encaixe molecular são cada vez mais sendo utilizados a medida em que mais pesquisadores determinam as estruturas proteicas utilizando cristalografia por raios-x ou através de ressonância magnética nuclear (RMN) (EKINS, MESTRES E TESTA, 2007; MOHD HASSAN et al, 2014; PAGADALA, SYED E TUSZYNSKI, 2017; PIÑERO, FURLONG E SANZ, 2018; KHAN et al, 2019).

Nestas últimas décadas, uma infinidade de programas de ancoragem molecular foi desenvolvida, entre eles, o DOCK, AutoDock, CDock, Autodockvina, LeDock entre outros. Tais programas possuem algumas diferenças entre eles, como por exemplo, o tipo de algoritmo e as estratégias para a realização do acoplamento (PAGADALA, SYED E TUSZYNSKI, 2017).

As ferramentas *in silico* estão sempre associadas com testes *in vitro*, objetivando a criação e a avaliação do método (EKINS, MESTRES E TESTA, 2007). Por meio de estudos de acoplamento molecular, os alvos moleculares de determinada substância podem ser avaliados com eficiência previamente, tais alvos podem ser o DNA, RNA ou proteínas, onde se incluem enzimas, receptores, canais iônicos e proteínas transportadoras (MOHD HASSAN et al, 2014; KHAN et al, 2019).

Esta pesquisa prévia sobre os sítios de ligação antes de realizar a ancoragem molecular é muito importante e deve ser uma das primeiras tarefas, para isso vários programas de detecção de cavidades foram desenvolvidos no intuito de detectar os supostos sítios ativos dentro de proteínas. GRID, POCKET e SURFNET são programas validados e muito utilizados, e tem essa finalidade de detectar possíveis locais onde podem ocorrer as ligações. Existe também o PASS, que permite a busca por sítios de ligação com esferas, e o MMC, que realiza o mapeamento da topografia macromolecular (MOHD HASSAN et al, 2014; PAGADALA, SYED E TUSZYNSKI, 2017).

O desenvolvimento de medicamentos a partir destes métodos que avaliam a estrutura da substância e a estrutura dos receptores, sem dúvidas, resulta em uma rápida identificação da efetividade de dada molécula em relação a determinado alvo. A incorporação desta técnica representa um grande avanço no processo de desenvolvimento de novas opções terapêuticas para várias patologias. É importante que se utilize *softwares* confiáveis e validados a fim de se obter resultados com níveis suficientes de confiança e com relevância farmacológica (MOHD HASSAN et al, 2014; PAGADALA, SYED E TUSZYNSKI, 2017).

Os métodos in silico são muito importantes na descoberta de novos medicamentos, a ancoragem molecular contribui significativamente para a identificação e avaliação de alvos farmacológicos. Nesse sentido, este trabalho propôs a utilização de métodos in silico, com a intenção de prever a potencial atividade da biflorina sobre possíveis alvos descritos previamente na literatura.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Determinar parâmetros toxicológicos e farmacológicos da biflorina in silico e correlaciona-los à achados in silico descritos na literatura.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar um levantamento bibliográfico dos achados toxicológicos e farmacológicos da biflorina com foco na oncologia;
- Determinar as propriedades físico-químicos da biflorina in silico;
- Determinar as propriedades farmacocinéticas da biflorina in silico;
- Investigar a interação da biflorina com os seguintes alvos biológicos in silico: AKT-1, EGFR, BRAF, topoisomerase I, topoisomerases II $\alpha$  e II $\beta$ , e correlacioná-los aos achados da literatura.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Pesquisa Bibliográfica

Realizou-se a busca nas bases de dados PUBMED e Science Direct por artigos que continham a substância biflorina como objeto de estudo nos modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Foram selecionados artigos em inglês, que continham as palavras-chave: ancoragem molecular, biflorina e câncer.

### 4.2 Análise dos Parâmetros Moleculares da Biflorina e da Doxorrubicina

Para prever as propriedades moleculares da biflorina, utilizou-se o *software* SwissADME®. Através do cálculo das propriedades moleculares foi possível estimar a área de superfície polar, o número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e o coeficiente de partição (log P). Os parâmetros para a predição do perfil de absorção oral, importantes para a estrutura da molécula, foram determinados seguindo os critérios da regra dos cinco de Lipinski. Esta metodologia permite uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral da substância em teste, onde as moléculas que descumprem mais do que uma destas regras, não são absorvidas adequadamente (LIPINSKI, 2004). Os parâmetros estão dispostos no quadro 1.

**Quadro 1.** Parâmetros avaliados na regra dos cinco de Lipinski.

Propriedade molecular	Parâmetro
Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio	$\leq 10$
Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio	$\leq 5$
Massa molecular	$\leq 500$ Da

Coeficiente de partição	$\leq 5$
Área de superfície polar	$\leq 140 \text{ \AA}^2$

### 4.3. Análise dos Parâmetros Farmacocinéticos da Biflorina

Utilizando o *software* PreADMET®, foram calculados para a biflorina os parâmetros farmacocinéticos, empregando bancos de dados de compostos que já passaram por testes pré-clínicos *in vitro* e/ou *in vivo* associados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, sendo fundamentados por meio de comparação estrutural mistos e descrição de estrutura e atividade (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) (LEE et al., 2004).

### 4.4. Análise do Perfil Toxicológico da Biflorina

A predição dos parâmetros toxicológicos foi realizada utilizando as plataformas online PreADMET®, Osiris Property Explorer®, admetSAR®, ProTox-II® e Lazar Toxicity Predictions®. Foram avaliados os riscos de carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e efeitos reprodutivos, genotoxicidade, hepatotoxicidade e efeitos irritantes.

### 4.5 Seleção dos alvos biológicos

Os alvos biológicos definidos para o estudo *in silico* foram escolhidos baseados na sua importância farmacológica e na disponibilidade nos bancos de dados de proteínas. Foram selecionadas as enzimas AKT-1, BRAF, EGFR, topoisomerase I, topoisomerases II $\alpha$  e II $\beta$ , disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB) com os códigos 3OCB, 4XV2, 6DUK, 1K4T, 5GWK, e 3QX3, que possuem, respectivamente, resolução de 0,7 $\text{\AA}$ , 1,24 $\text{\AA}$ , 0,4 $\text{\AA}$ , 2,10 $\text{\AA}$ , 3,15 $\text{\AA}$  e 2,16 $\text{\AA}$ , determinadas pelo método de difração de raios-x.

#### 4.6 Preparo dos ligantes

A estrutura da biflorina foi desenhada no formato bidimensional no *software* Chemdraw ultra® versão 12.0 e salvas no formato (.mol).

Uma busca sistemática pelo método de mecânica molecular utilizando o Campo de Força de Mecânica Molecular (*Mechanics Molecular Force Field*, MMFF) foi realizada utilizando o *software* Spartan'10®, a fim de realizar uma análise conformacional das estruturas moleculares para a determinação do confôrmero mais estável, que foi aperfeiçoado geometricamente no vácuo, sem qualquer restrição geométrica, pelo método semiempírico RM1 (*Recife Model 1*).

Após a otimização da estrutura foi realizado o cálculo de energia pelo método de Hartree-Fock através do conjunto de base 6-31G\*, com função de polarização para átomos pesados, isto é, átomos diferentes de hidrogênio. Após as modificações, as ligações  $\sigma$  dos ligantes permaneceram como flexíveis e as ligações  $\pi$  permaneceram fixas.

#### 4.7 Preparo dos alvos

Os arranjos das proteínas foram obtidos no formato (.pdb) do banco RCSB *Protein Data Bank* (PDB), e estes foram avaliadas através do *software* PyMOL® permitindo a visualização e exclusão das moléculas de água cristalina da estrutura, do ligante nativo e de outros compostos, como o glicerol, que posam ter contribuído para o processo de cristalização da proteína durante a avaliação de ancoragem molecular.

Devido a possibilidade de divergência no número de hidrogênios, os mesmo foram inseridos as proteínas e as cargas foram adicionadas as enzimas, para que assim se tornassem

rígidas, encontrando as estruturas alvos com um inibidor ou substrato ligado, já que esta é obrigada a manter a conformação mais relevante à ligação dos compostos (COSCONATI et al., 2010).

#### 4.8 Ancoragem molecular

A ancoragem molecular foi executada utilizando o *software* AutodockVina®. Manteve-se rígido o receptor e flexível o ligante, para girar e explorar os possíveis encaixes. As conexões torcionais dos ligantes foram todas liberadas pelo módulo ligante no *software* AutoDock Tools®. O *Grid*, grade que demarca o sítio ativo, foi colocado na região ativa do receptor, abrangendo todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas, ou que possuísse alguma relação com sua atividade, de modo a prover uma região de busca conformacional apropriada para a realização da ancoragem molecular (Quadro 2). As medidas para comparações foram salvas e então organizadas em um arquivo de texto abrangendo 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 1Å, e aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano para a análise das interações.

**Quadro 2.** Aminoácidos selecionados para a construção do *grid box*.

Enzima	Aminoácidos	Referências
AKT-1	Serina 50, serina 21, serina 09, serina 83, serina 939, treonina 1462, treonina 24, serina 256, serina 319, serina 454, serina 273, serina 318, treonina 291.	Rena et al. (1999); Kim et al. (2001); Kane et al. (2002); Manning et al. (2002); Thomas et al. (2002)

BRAF	Treonina 372, lisina 483, isoleucina 463, leucina 505, triptofano 531, glutamina 530, cisteína 532, fenilalanina 583, fenilalanina 595, ácido aspártico 594.	Stephens et al. (1992); Campos et al. (2019)
EGFR	Leucina 788, treonina 790, metionina 790, leucina 777, leucina 788, lisina 745, leucina 788, ácido aspártico 855, cisteína 797, glicina 857, ácido aspártico 813.	Hadda et al. (2020); Du et al. (2021)
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 et al. (2002)
Topoisomerase II- $\alpha$	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- $\beta$	Metionina 782, glutamina 778, arginina 503, leucina 502, glicina 478, aspartato 479 e tirosina 821	Ju et al. (2006); Kumar e Bora (2014)

O *grid box* foi construído para a realização da ancoragem molecular e posteriormente validado. As dimensões estão dispostas no quadro 3.

**Quadro 3.** Dimensões do *grid box* para a realização da ancoragem molecular.

PROTEÍNA	CÓDIGO PDB	DIMENSÕES	ESPAÇAMENTO (Å)
AKT-1	3OCB	32X22X24	1
EGFR	6DUK	14X16X16	1
BRAF	4XV2	32X22X24	1
TOPOISOMERASE I	1K4T	39X36X29	1
TOPOISOMERASE II ALFA	5GWK	20X17X18	1

<b>TOPOISOMERASE II BETA</b>	3QX3	3X34X34	1
------------------------------	------	---------	---

Foi realizada a validação do método com os alvos estabelecidos, 3OCB, 4XV2, 6DUK, 1K4T, 5GWK, e 3QX3, respectivamente, com os seus respectivos ligantes cocristalizados obtidos na plataforma PDB por meio da análise do redocking. Os resultados estão expressos no quadro 4.

**Quadro 4.** Validação do método in silico de ancoragem molecular pelo método do *redocking*.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>LIGANTE</b>	<b>RESOLUÇÃO (Å)</b>	<b>RMSD (Å)</b>	<b>ENERGIA DE LIGAÇÃO (KCAL/MOL)</b>
<b>AKT-1</b>	GSK3	2,70	0,7	-8,5
<b>EGFR</b>	DABRAFENIBE	2,20	0,4	-13,7
<b>BRAF</b>	JBJ	2,50	1,24	-12,4
<b>TOPOISOMERASE I</b>	TOPOTECANO	2,10	0,93	-12,5
<b>TOPOISOMERASE II ALFA</b>	ETOPOSÍDEO	3,15	0,53	-13,0
<b>TOPOISOMERASE II BETA</b>	ETOPOSÍDEO	2,16	0,52	-13,5

Legenda: RMSD – desvio médio quadrático.

O *redocking* foi realizado, os métodos foram considerados adequados e com isso, as condições utilizadas para a ancoragem foi validada. Todos os valores de RMSD, desvio entre a posição da molécula cocristalizada e a posição do ligante, foram menores que 2,0 Å, representando um alto grau de superposição e orientação relativa da conformação da estrutura cristalográfica. De acordo com diversos estudos in silico, 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).

Os resultados obtidos foram visualizados no AutoDock Tools® e as correlações foram analisadas em condições de energia mínima de ligação (Kcal/mol), número de ligações de

hidrogênio e outras interações obtidas 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.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos voltados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos fármacos fazem parte do processo inicial após a descoberta destes compostos. Essa fase é importante e não pode ser excluída, tendo em vista que muitos medicamentos são retirados do mercado por conta de metabólitos tóxicos gerados por estas moléculas (SOLTANI et al, 2021).

Ao longo dos anos, algumas ferramentas foram sendo criadas para facilitar e dar agilidade ao processo de avaliação destes fármacos. Campos como a biologia molecular, ciência da computação, biofísica, estatística e química farmacêutica avançaram significativamente e aceleraram os processos voltados ao desenvolvimento de fármacos com um design mais racional focados em alvos conhecidos (SOLTANI et al, 2021). Estas novas tecnologias tornaram o processo mais rápido e mais barato (WU et al., 2020; ASHA, NAYAGAM e BHUVANESH, 2021).

Visando a avaliação *in silico* da biflorina, foram realizadas tanto as análises das propriedades físico-químicas, toxicológicas e farmacocinéticas quanto a ancoragem molecular tendo como alvo, estruturas cuja atividade já fora descrita na literatura e sua interação com a biflorina já foi avaliada em estudos *in vitro*. Esta avaliação é fundamental, já que uma substância necessita apresentar características como atividade farmacológica, baixa toxicidade e boas propriedades farmacocinéticas no sistema biológico humano a fim de ser considerada um potencial candidato a tornar-se um medicamento (MABKHOT et al., 2016).

## 5.1 Trabalhos utilizados nesta pesquisa

Foram selecionados 13 artigos científicos nas bases de dados PUBMED e Science Direct, publicados entre 2005 e 2020, que estudaram a biflorina em modelos *in vitro* e *in vivo*, a fim de comparar com os achados *in silico* apresentados neste trabalho.

## 5.2 Propriedades Físico-Químicas da Biflorina

Os métodos *in silico* de predição dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos representam um grande avanço no processo de descoberta dos fármacos, as ferramentas utilizadas apresentam métodos eficientes, fáceis e rápidos, permitindo a descoberta de fármacos mais eficazes e predizendo características essenciais para moléculas candidatas a tornarem-se medicamentos (DATTA, DAS e DAS, 2021).

As propriedades moleculares da biflorina foram determinadas utilizando o *software* online SwissADME® e encontram-se dispostas na tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades moleculares da biflorina.

Molécula	Log <i>P</i>	TPSA	NA	MM	NALH	NDLH	ABS
Biflorina	3,14	43,37	23	308	3	0	94,03
Doxorrubicina	0,57	206,0	39	543,52	12	3	37,90

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.

A biflorina apresentou um bom perfil lipofílico, com um balanço entre solubilidade e permeabilidade. Quando comparada a doxorrubicina, um quimioterápico amplamente utilizado, demonstrou um comportamento mais lipofílico, visto que a doxorrubicina apresenta uma

natureza mais polar com  $\log P$  de 0,57, onde  $P$  é o coeficiente de partição de uma molécula entre n-octanol e água, dois solventes não miscíveis. Esse parâmetro que contribui para inferir que esta substância é uma boa candidata a tornar-se um medicamento. Moléculas lipofílicas apresentam boas características de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (DATTA, DAS e DAS, 2021).

A biflorina apresentou um TPSA (área de superfície polar topológica) de  $43,37 \text{ \AA}^2$ , dentro do intervalo que é preconizado na regra de Lipinski (abaixo de  $110 \text{ \AA}^2$ ), o que indica um bom perfil de permeabilidade. Esse é um importante descritor para a absorção intestinal, permeabilidade pelas células Caco-2, penetração na barreira hematoencefálica e biodisponibilidade. Este resultado também sugere que a substância apresenta uma boa absorção intestinal, pois apresentou um TPSA abaixo de  $160 \text{ \AA}^2$  (AHSAN et al., 2012; DA SILVA et al., 2015; PARAMASHIVAM et al., 2015).

Quanto ao peso molecular, a biflorina apresentou um peso de 308, indicando que ela pode ser transportada, difundida e absorvida facilmente, por ter um peso molecular abaixo de 500 Da. De acordo com a literatura, moléculas grandes possuem uma certa dificuldade para ultrapassar membranas celulares e afetam alguns processos como a absorção, a penetração na barreira hematoencefálica e a sua interação com os alvos biológicos (LIPINSKI, 2004; TIHANYI; VASTAG, 2011; PARAMASHIVAM et al., 2015; LAGORCE et al., 2017).

A taxa de absorção foi calculada através do método relatado por Zhao e colaboradores (2002) a partir da fórmula:  $\% \text{ ABS} = 109 - (0,345 \times \text{TPSA})$ . A partir da análise da absorção, sugere-se que a biflorina apresenta um bom perfil absorptivo pelas membranas biológicas, visto que os resultados apontaram uma taxa de absorção de 94,03%.

O número de receptores de ligação de hidrogênio (átomos de oxigênio e nitrogênio), bem como o número de doadores de ligação de hidrogênio (NH e OH) também foi avaliado,

indicando que a biflorina está dentro dos padrões de polaridade e permeabilidade. De acordo com Lipinski (2004), uma molécula deve apresentar um número de doadores menor que 5 e o número de doadores menor que 10, tais parâmetros influenciam na biodisponibilidade do fármaco.

### 5.3 Propriedades Farmacocinéticas da Biflorina

Os resultados da avaliação das características farmacocinéticas da biflorina estão dispostos na tabela 2, a análise foi realizada no *software* PreADMET® e os parâmetros avaliados incluem a penetração na barreira hematoencefálica, absorção por células Caco2, absorção intestinal humana, ligação às proteínas plasmáticas (distribuição) e inibição de enzimas da família CYP.

**Tabela 2.** Avaliação in silico de parâmetros relacionados à absorção e distribuição da biflorina

Parâmetros Avaliados	Resultados
Penetração na barreira hematoencefálica	0,4069
Permeabilidade em Caco-2 (nm/seg)	44,2567
Inibidor da CYP2C19	Sim
Inibidor da CYP2C9	Sim
Inibidor da CYP2D6	Não
Substrato da CYP2D6	Não
Inibidor da CYP3A4	Não
Substrato da CYP3A4	Sim
Absorção intestinal (%)	97,5989
Ligação as proteínas plasmáticas (%)	100,0

Os resultados obtidos demonstraram que a biflorina possui baixa predição de penetração na barreira hematoencefálica, apresentando o nível de concentração cérebro/ concentração sangue abaixo de 1. Sabe-se que a barreira hematoencefálica está localizada na parede endotelial da microvasculatura cerebral e impede a passagem de grande parte dos medicamentos no cérebro, representando um problema para o tratamento de doenças cerebrais. Embora haja uma presunção de que moléculas pequenas atravessam esta barreira, os achados na literatura sugerem que aproximadamente 98% de moléculas pequenas não conseguem ser transportadas facilmente (PARDRIDGE, 2012).

De acordo com Nau, Sorgel e Eiffert, 2010, dentre as características ideais para uma molécula atravessar a barreira hematoencefálica e tratar o Sistema Nervoso Central (SNC) estão o pequeno tamanho molecular, possuir média lipofilicidade e um baixo nível de ligação às proteínas plasmáticas. Alguns testes já foram realizados a fim de avaliar a atividade da biflorina a nível cerebral, onde experimentos *ex vivo* utilizando o cérebro de camundongos tratados com a molécula, constataram que a biflorina é capaz de inibir a acetilcolinesterase. Neste mesmo estudo, os efeitos da biflorina na disfunção cognitiva foram avaliados e os resultados demonstraram que a molécula melhorou significativamente o comprometimento da memória em camundongos por meio da sua ação agonista no receptor NMDA, sugerindo que ela pode ser utilizada no tratamento da Doença de Alzheimer (JEON et al., 2016).

Em relação a permeabilidade em células Caco-2, a biflorina apresentou média permeabilidade conforme a classificação de Yazdanian e colaboradores (1998). Estudos de permeabilidade *in vitro* utilizando células Caco-2 representam uma das técnicas mais utilizadas para a avaliação da dissolução e permeação de moléculas. Tal modelo é utilizado na predição da absorção oral de fármacos por transporte passivo em humanos. As células Caco-2 são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano e durante o seu cultivo elas se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma membrana composta de células em

monocamada aderidas por junções e que se multiplicam rapidamente (SOUZA, FREITAS & STORPITIS, 2007; NAGAYASU, OZEKI & ONOUE, 2019).

Além da predição farmacocinética apontar que a biflorina possui média permeabilidade em células Caco-2, os resultados da análise da absorção intestinal sugerem que ela apresenta uma boa absorção de acordo com a escala de Yee (1997), onde o *software* se baseia em cálculos utilizando pH 7,4, para simular as condições *in vivo*. Tais dados sugerem que a molécula pode tornar-se um medicamento que poderá ser administrado por via oral, visto que compostos administrados oralmente devem possuir permeabilidade intestinal. É importante destacar que, embora os estudos relacionados às vias de administração de fármacos tenham avançado, a via oral ainda possui certa preferência, por conta de sua conveniência, baixo custo e maior adesão ao tratamento por parte do paciente (SOUZA, FREITAS & STORPITIS, 2007).

Na análise da predição relacionada a interação com as enzimas da família CYP, a biflorina apresentou atividade inibitória em CYP2C19, CYP2CP9 e demonstrou que pode ser substrato da CYP3A4. A inibição destas enzimas metabolizadoras pode levar a um aumento na concentração plasmática dos fármacos, prolongando o efeito farmacológico, bem como a indução das enzimas pode acarretar o aumento da formação de metabólitos e redução do tempo de meia-vida do fármaco. Dentro desse contexto, é interessante observar o uso concomitante de moléculas que também apresentem capacidades de interação com estas enzimas, pois essa competitividade pode levar a ocorrência de interações medicamentosas (MARCOLIN, CANTARELLI & GARCIA-JUNIOR, 2004; ECHEVERRIA-VILLALOBOS et al., 2019)

A biflorina apresentou uma taxa de ligação a proteínas plasmáticas de 100%, indicando que ela pode se ligar fortemente a estas proteínas. A ligação às proteínas plasmáticas impacta significativamente na farmacocinética e farmacodinâmica da molécula. Por um lado, esta ligação contribui na distribuição do fármaco para os locais de ação, porém, para atuar em sítios fisiológicos de ação, o fármaco precisa estar livre e disponível para realizar esta ligação. Vários

estudos farmacológicos já demonstraram que o fármaco não ligado é ativo em termos de produção de efeitos desejáveis e indesejáveis (GIACOMINI & BLASCHKE, 1984; SMITH & WATERS, 2019).

#### **5.4 Perfil Toxicológico da Biflorina**

As pesquisas voltadas para o desenvolvimento farmacêutico estão cada vez mais focadas na incorporação de novas tecnologias a fim de acelerar todas as etapas do processo de descoberta de novos medicamentos. Dentre estas etapas, está a fase da avaliação toxicológica, essencial, onde tem-se observado um aumento no uso de metodologias computacionais baseadas na estrutura molecular para a previsão da toxicidade (GANORKAR et al., 2020).

Há um esforço da indústria biofarmacêutica em revisar as recomendações regulatórias para a avaliação da segurança de novos medicamentos, inclusive a incorporação de novas metodologias *in silico* e *in vitro*. Estes novos métodos surgem como uma oportunidade para substituir, refinar e reduzir (3Rs) o uso de animais em laboratórios, principalmente nos testes de toxicidade (PRIOR et al., 2020; GUNES et al., 2021).

Estima-se que em breve os métodos *in silico* de previsão de toxicidade substituirão e/ou reduzirão os testes com animais à medida em que modelos mais precisos e confiáveis forem sendo lançados e tornando-se disponíveis à comunidade científica. Muitos pesquisadores já têm recomendado que a utilização destas ferramentas obrigatoriamente anteceda a síntese de novas moléculas para reduzir o tempo e os custos financeiros dos estudos (GUNES et al., 2021).

Neste estudo, avaliamos o perfil toxicológico da biflorina observando os parâmetros de carcinogenicidade, mutagenicidade, efeitos no sistema reprodutivo, genotoxicidade, hepatotoxicidade e efeitos irritantes. Dentre os objetivos, uma das propostas foi de comparar

nossos achados com os resultados de testes *in vitro* e *in vivo* realizados anteriormente e validar as ferramentas utilizadas neste estudo.

#### 5.4.1 Carcinogenicidade

Os testes de carcinogenicidade fazem parte dos estudos não clínicos e são fundamentais para a avaliação da segurança farmacológica. A predição do parâmetro de carcinogenicidade foi realizada utilizando as ferramentas PreADMET®, OSIRIS®, ADMETSAR® e PROTOX-II®. Os resultados obtidos da biflorina são apresentados na tabela 3 em comparação com o benzeno, um dos padrões de referência de carcinogenicidade (SUAREZ-TORRES, OROZCO, CIANGHEROTTI; 2021).

**Tabela 3.** Predição do parâmetro de **carcinogenicidade** realizada nas ferramentas PreADMET, OSIRIS, ADMETSAR e PROTOX-II

	PreADMET	OSIRIS	ADMETSAR	PROTOX-II
<b>BIFLORINA</b>	Carcinogênica	Não carcinogênica	Não carcinogênica	Não carcinogênica
<b>BENZENO</b>	Carcinogênico	Carcinogênico	Carcinogênico	Carcinogênico

Na análise da carcinogenicidade, apenas uma ferramenta apontou que a biflorina é uma substância carcinogênica. Ainda não foram descritos na literatura ensaios de carcinogenicidade *in vitro* e *in vivo* utilizando a biflorina, tais testes são realizados a longo prazo (entre 18 e 24 meses), utilizando ratos e camundongos. Este processo de avaliação de risco para carcinógenos

é baseado atualmente na indução de tumores em animais submetidos a altas doses da substância testada (CALABRESE, PRIEST e KOZUMBO, 2021).

Durante este ensaio, avalia-se a morbidade ou mortalidade e todo o processo que compreende o desenvolvimento de tumores (ANVISA, 2013). Este ensaio é fundamental para avaliar a segurança da administração da substância e é critério para a submissão do relatório toxicológico que deve ser apresentado às agências reguladoras de medicamentos, portanto, há uma necessidade de que se realize este teste futuramente.

Um estudo *in silico* de Nascimento, 2020 utilizando naftoquinonas avaliou as propriedades toxicológicas do lapachol,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona, revelando resultados positivos para todos os compostos testados dentro do parâmetro de carcinogenicidade. O mesmo resultado foi observado no nosso estudo, visto que na maioria das ferramentas utilizadas, a predição apontou que a biflorina não é carcinogênica.

#### **5.4.2 Mutagenicidade**

Com o auxílio das ferramentas PreADMET®, OSIRIS®, ADMETSAR®, LAZAR® e PROTOX-II®, foram realizadas as predições *in silico* do potencial mutagênico, baseando-se no teste de Ames. Este ensaio biológico compreende a indução de mutação em bactérias de *Salmonella tifimurium*, a fim de observar se os compostos testados são capazes de promover mutagênese (AMES, 1979). Os resultados da avaliação *in silico* da biflorina estão apresentados na tabela 4 em comparação com a aflatoxina B1, composto utilizado como controle positivo em ensaios de mutagenicidade com *Salmonella tifimurium* (VASCONCELLOS, 2010).

**Tabela 4.** Predição do parâmetro de **mutagenicidade** realizada nas ferramentas PreADMET, OSIRIS, ADMETSAR, LAZAR e PROTOX-II, em comparação com os resultados dos estudos anteriores in vitro.

	PreADMET	OSIRIS	ADMETSAR	LAZAR	PROTOX-II	Estudo in vitro
<b>BIFLORINA</b>	Não mutagênica	Através da realização do teste de Ames, nenhum efeito de mutagenicidade foi detectado, mesmo em altas concentrações (Vasconcellos et al., 2010).				
<b>AFLATOXINA B1</b>	Mutagênica	Mutagênica	Mutagênica	Mutagênica	Mutagênica	

As ferramentas utilizadas sugerem que a biflorina não é mutagênica, esses achados corroboram com os resultados dos ensaios de mutagenicidade in vitro descritos no estudo de Vasconcellos (2010), onde nenhum efeito mutagênico foi observado, mesmo nas concentrações mais altas, frente às cepas TA97a, TA98 ou TA100, seja na presença ou na ausência de ativação metabólica. A biflorina também não induziu mutagenicidade em células TA102, sugerindo que ela não é mutagênica em bactérias e leveduras.

#### 5.4.4 Genotoxicidade

Para a avaliação da genotoxicidade, utilizou-se a ferramenta ADMETSAR®. Este software utiliza algoritmos baseados em dados baseados no ensaio de micronúcleo, um teste bastante utilizado para avaliar a genotoxicidade. Conforme demonstrado na tabela 5, nenhum efeito genotóxico foi predito para a biflorina. A ciclofosfamida, uma substância comprovadamente genotóxica, foi utilizada como controle positivo (DECIGA-CAMPOS et al., 2016).

**Tabela 5.** Predição do parâmetro de **genotoxicidade** realizada na ferramenta OSIRIS, em comparação com os estudos in vitro realizados anteriormente.

Substância	OSIRIS	Estudos in vitro
------------	--------	------------------

<b>BIFLORINA</b>	Não genotóxica	Através do teste do micronúcleo, a biflorina não apresentou efeito genotóxico e clastogênico em medula óssea de camundongos (Vasconcellos MC, 2007)	A biflorina não promoveu a quebra das fitas de DNA em células V79 em baixas concentrações, porém induziu dano ao DNA nas concentrações mais altas (Vasconcellos et al., 2010)	A biflorina exerceu atividade genotóxica em células de melanoma humano (Ralph et al., 2016).	A biflorina induziu dano ao DNA, porém não apresentou atividade clastogênica ou aneuploidogênica em células mononucleares do sangue periférico (Vasconcellos et al., 2016).
<b>CICLOFOSFAMIDA</b>	Genotóxica				

Acoplado aos estudos *in silico* voltados à toxicidade, a análise da genotoxicidade *in vitro* é essencial para determinar a segurança de uma molécula para uso humano (SANTOS et al., 2011). O teste do cometa 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)

Nenhum efeito genotóxico foi observado nos resultados da análise *in silico* da genotoxicidade. Estes resultados apoiam os achados *in vitro* que demonstram que a biflorina pelo ensaio do cometa alcalino não apresenta a capacidade de quebrar as fitas de DNA em concentrações menores que 10 µg/ml em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês). Entretanto, nas concentrações de 20 e 30 µg/ml, a biflorina induziu dano significativo ao DNA, porém reversível (VASCONCELLOS et al, 2010). Um outro estudo voltado para a avaliação de dano a nível cromossomal também reforçou a segurança da biflorina ao demonstrar por meio do teste do micronúcleo, em medula óssea de camundongo, que a biflorina não possui atividade clastogênica e aneuploidogênica (VASCONCELLOS M.C, 2007).

#### 5.4.5 Hepatotoxicidade

A avaliação da hepatotoxicidade é fundamental visto que os danos ao fígado são uma das principais causas que fazem com que um medicamento seja descontinuado (BANERJEE et al., 2018). A análise *in silico* deste parâmetro foi realizada utilizando as ferramentas ADMETSAR® e PROTOX-II®. Como controle positivo foi utilizado o Tolcapone, um

medicamento que age como inibidor de catecol o-metiltransferase e é comprovadamente hepatotóxico (BANERJEE et al., 2018). O resultado da análise encontra-se na tabela 6.

**Tabela 6.** Previsão da **hepatotoxicidade** da biflorina segundo as ferramentas ADMETSAR e PROTOX-II, em comparação com o estudo in vitro realizado anteriormente.

	<b>ADMETSAR</b>	<b>PROTOX-II</b>	<b>Estudo in vitro</b>
<b>BIFLORINA</b>	Hepatotóxica	Não hepatotóxica	Por meio da análise histopatológica de órgãos retirados de animais tratados com a biflorina, observou-se que a substância apresenta hepatotoxicidade fraca e reversível (Vasconcellos et al., 2007).
<b>TOCALPONE</b>	Hepatotóxico	Hepatotóxico	

A predição da hepatotoxicidade apresentou resultados divergentes de acordo com a ferramenta utilizada. Na análise feita pelo ADMETSAR®, a biflorina é considerada hepatotóxica, enquanto o PROTOX-II® sugere que a biflorina não apresenta risco de hepatotoxicidade. Possivelmente, a divergência encontrada pode ser baseada no fato de que os estudos in vivo demonstraram que a biflorina possui uma hepatotoxicidade fraca e reversível evidenciada pela análise histopatológica de órgãos (fígado, baço e rim) retirados de animais tratados com a biflorina nas doses de 25 e 50mg/kg de peso do animal. Através destas análises, algumas alterações foram observadas, como a presença de esteatose microvesicular acompanhada de degeneração em balão dos hepatócitos (VASCONCELLOS et al., 2007). O fígado é o local central do metabolismo de medicamentos, portanto, uma lesão hepática causada por medicamentos na maioria das vezes é inevitável (PENG et al., 2019).

#### **5.4.6 Efeitos Irritativos**

A partir dos resultados obtidos e demonstrados na tabela 7, foi possível prever que a biflorina não apresenta risco de causar irritação. A análise se deu nas ferramentas OSIRIS® e

ADMETSAR®. A doxorubicina foi utilizada como padrão irritativo, pois já foi relatado na literatura a sua capacidade de causar lesões locais dependendo da concentração utilizada (KONYA e VIGVARY, 1992).

**Tabela 7.** Previsão da capacidade de risco para **efeitos irritativos** da biflorina segundo as ferramentas OSIRIS e PROTOX-II.

	<b>OSIRIS</b>	<b>ADMETSAR</b>
<b>BIFLORINA</b>	Sem risco de efeitos irritativos	Sem risco de efeitos relacionados a corrosão e irritação ocular
<b>DOXORRUBICINA</b>	Alto risco	Risco de efeitos relacionados a corrosão e irritação ocular

A avaliação da irritabilidade faz parte dos protocolos de avaliação da toxicidade, os testes de tolerância à molécula devem anteceder a exposição humana ao produto (ANVISA, 2013). Nossos achados sugerem que a biflorina não apresenta risco de causar efeito irritativo de forma geral, e não apresenta a capacidade de causar lesões oculares. Ainda não foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a tolerância local à biflorina, portanto, há uma necessidade de que estudos futuros foquem nestes protocolos, visto que eles são essenciais para a regulamentação de medicamentos.

A avaliação da sensibilização da pele deve ser considerada fundamental dentro dos protocolos de avaliação da toxicidade. Este parâmetro pode ser analisado por meio de testes *in vitro* e com ensaios de sensibilização cutânea em roedores. Métodos *in silico* também vem sendo desenvolvidos para facilitar esta previsão (JOHNSON et al., 2020).

### **5.5 Ancoragem Molecular**

A utilização de métodos computacionais, com *softwares* voltados para a triagem virtual baseada em sítios ativos, *docking* molecular modelagem de relação quantitativa estrutura-

atividade (QSAR), mineração de dados e simulações de dinâmica molecular (MD), têm sido amplamente utilizados para tornar o processo de descoberta de moléculas promissoras mais eficiente e preciso. Estas análises já renderam oportunidades para a descoberta de fármacos promissores no tratamento do Alzheimer, câncer e doenças negligenciadas (WU et al., 2020).

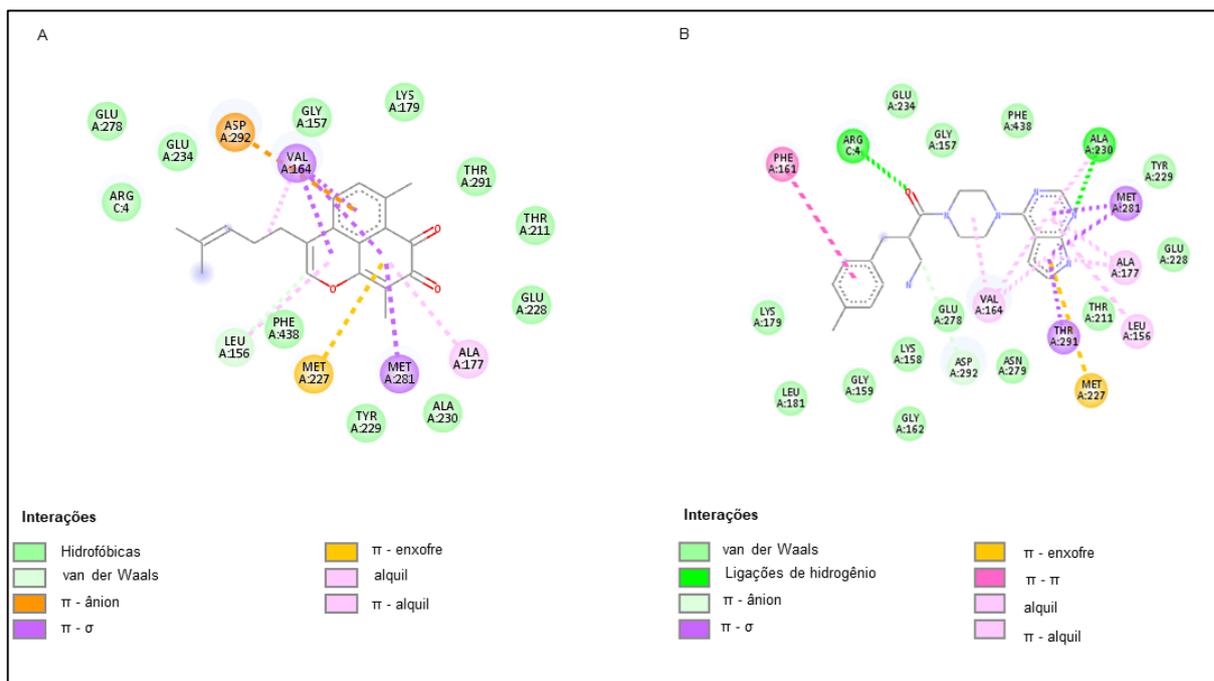
Diante disso, neste trabalho utilizamos o método *in silico* visando a realização da ancoragem molecular com alvos biológicos descritos na literatura com potencial de interação com a substância testada, bem como a caracterização dos aspectos moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos da biflorina.

A ancoragem molecular foi realizada por meio do *software* Autodock Vina®. Dentre os parâmetros que foram observados estão a energia de ligação e a presença de ligações de hidrogênio com os aminoácidos presentes no sítio de ligação.

No *docking* realizado com a proteína AKT-1, a energia de afinidade de ligação foi -8,6 kcal/mol, valor bem próximo da energia do ligante original (-8,5 kcal/mol). A biflorina apresentou ligação hidrofóbica com leucina 156, bem como interação  $\pi$  – ânion com o ácido aspártico 292, ligação  $\pi$ - $\sigma$  com valina 164, uma interação específica  $\pi$ -enxofre com metionina 227 e ligação alquil com alanina 177.

Figura 3: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da AKT-1.

## B - Interações do GSK3 (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da AKT-1

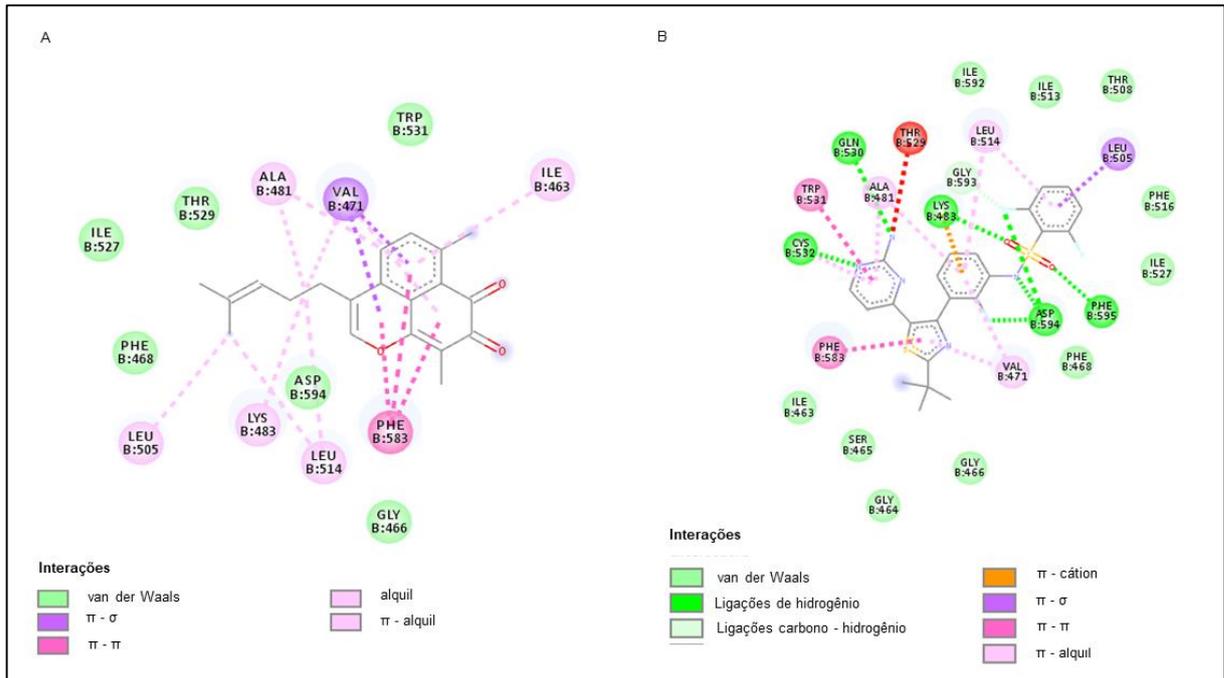


Não foi observada uma forte interação entre a biflorina e os aminoácidos cruciais para a atividade da enzima (figura 3A), em comparação com o ligante original (figura 3B). Estudos *in vitro* sugerem que a biflorina foi capaz de promover a inibição de AKT-1 por intermédio da regulação negativa de N-caderina resultando na inibição da motilidade, invasão e migração celular (MONTENEGRO et al, 2013a). Esses resultados apontam para a ideia de que esta inibição de AKT-1 não se dá pela ligação direta com a biflorina e sim pela interação com a N-caderina, que consequentemente resulta na inibição de AKT-1.

Na análise realizada com a ligação entre a biflorina e o EGFR (figura 4A), a energia de afinidade de ligação foi de -9,9 kcal/mol, consideravelmente melhor do que a energia de ligação do ligante original (-13,7kcal/mol) (figura 4B), verificou-se ligações  $\pi$ -alquil dos anéis aromáticos com leucina 858 e leucina 788, bem como ligações alquil com os aminoácidos lisina 745, leucina 747, metionina 790, valina 726, leucina 777, metionina 766 e isoleucina 759.



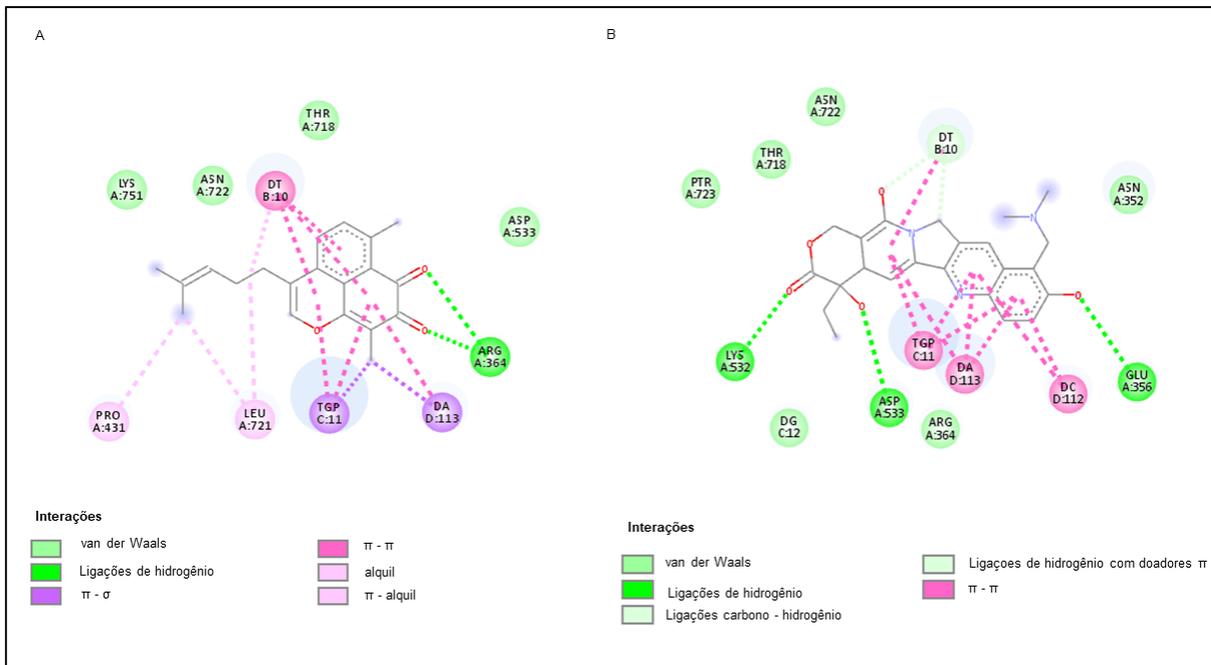
Figura 5: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo do BRAF. B - Interações do JBJ (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo do BRAF.



Nos estudos de Ralph (2016), foi demonstrado que a biflorina induziu a morte celular causando apoptose em células de melanoma com mutações do gene BRAF, um regulador do crescimento celular. Na ancoragem molecular, foi possível observar que houve interação com aminoácidos do sítio ativo, porém ligações fracas. Sugerimos, portanto, que essa indução de morte celular não se deu pela interação direta com o alvo estudado, e sim pela ligação com outras enzimas envolvidas no ciclo celular.

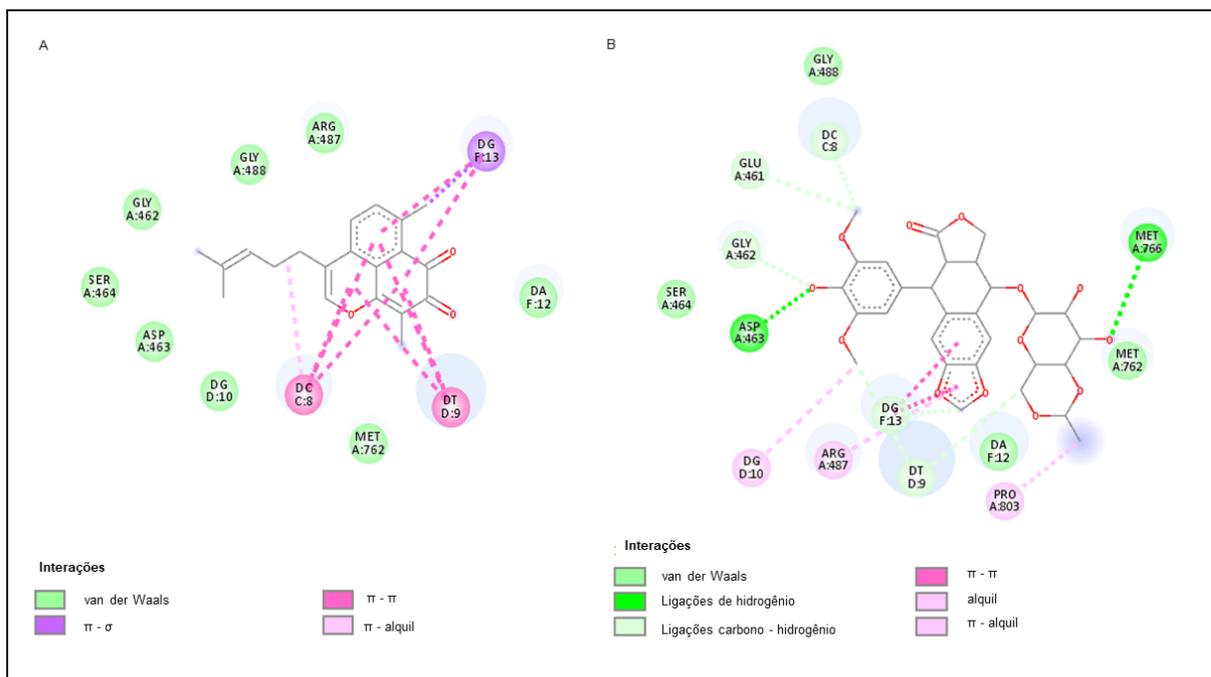
Na ancoragem da biflorina com a enzima topoisomerase I (figura 6A), observou-se a presença de ligação de hidrogênio dos grupos carbonila com a arginina 364, bem como interação de van der Waals com lisina 751, asparagina 722 e 533, e treonina 718. Também foram observadas interações  $\pi$ - $\pi$  com o DT10 e interações  $\pi$ - $\delta$  com TGP11 3 DA113.

Figura 6: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I. B - Interações do topotecano (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase I.



Na representação da interação da biflorina com a enzima topoisomerase II $\alpha$  (figura 7A), observa-se que há ligações de van der Waals com os aminoácidos arginina 487, glicina 488 e 462, serina 464, aspartato 463, DG10, DA12 e metionina 762, também se observam interações  $\pi$ - $\pi$  em DC8 e DT9 e interações  $\pi$ - $\delta$  em DG13.

Figura 7: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa. B - Interações do etoposídeo (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II alfa.

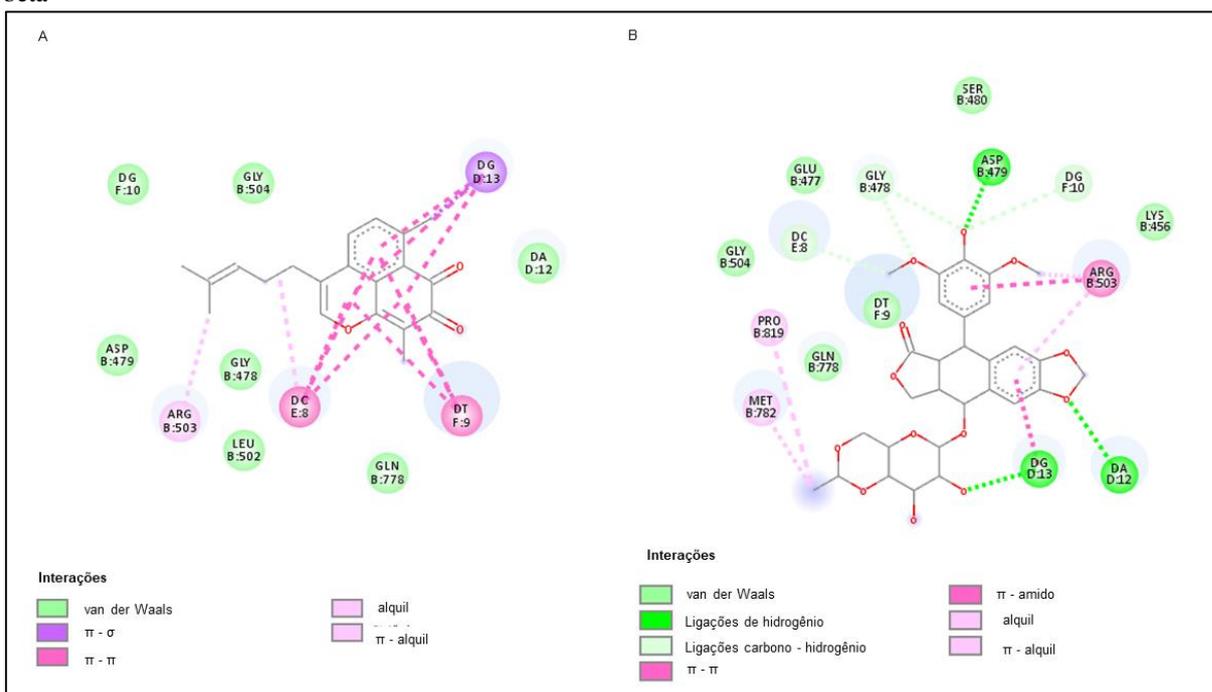


Os inibidores da topoisomerase têm ganhado notoriedade e estão sendo cada vez mais utilizados na terapia do câncer. A doxorubicina, o etoposídeo e os derivados de camptotecina, são exemplos de quimioterápicos que têm como alvo as topoisomerases, e são muito utilizados como tratamento de primeira escolha em vários tipos de neoplasias. As pesquisas com estes medicamentos vêm evoluindo e reforçam a importância destas moléculas dentro da terapêutica oncológica. Eles podem ser utilizados isoladamente e em associação com outros medicamentos (BURGESS et al, 2008; FERGUSON et al, 2015).

A terapia com inibidores de topo I, principalmente os análogos da camptotecina como o irinotecano e o topotecano, é essencial no tratamento de diversos tipos de câncer, especialmente câncer de cólon (YAO et al, 2015). Estudos demonstram que várias substâncias de origem natural possuem atividade inibitória sobre a topoisomerase tipo I, além de revelarem que estes mesmos compostos têm efeito citotóxico e induzem apoptose em linhagens celulares de leucemia e melanoma, sendo o sucesso da resposta farmacológica altamente dependente dos níveis de expressão desta enzima (BURGESS et al, 2008; KIKUCHI et al, 2011).

Na ancoragem molecular realizada com a biflorina e a enzima topoisomerase II $\beta$  (figura 8A) verifica-se interações de van der Waals em glicina 504, 478, DG10, DA12, aspartato 479, leucina 502 e glutamina 778, também se observa ligações  $\pi$ - $\delta$  em DG13, bem como ligações  $\pi$ - $\pi$  em DC8 e DT9 e ligações  $\pi$ -alquil em arginina 503.

Figura 8: A - Representação 2D das interações da biflorina com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta. B - Interações do etoposídeo (ligante original) com os aminoácidos do sítio ativo da topoisomerase II beta



Na análise da predição, observou-se que a biflorina apresentou potencial de interação com a topoisomerase I (figura 6A), porém foi menor quando comparado com o padrão, topotecano (figura 6B). Em relação a topoisomerase II alfa e beta, não foi observado potencial de ligação visto que só foram observadas apenas interações inespecíficas (interações hidrofóbicas em maioria) entre a molécula e as enzimas.

A interação da biflorina com a enzima topoisomerase I já foi avaliada por meio de testes in vitro que submeteram a substância a ensaios de inibição desta enzima. Embora a

biflorina interaja com as fitas simples e duplas do DNA, constatou-se que a substância não atua inibindo as topoisomerasas do tipo I (VASCONCELLOS MC, 2007).

## 6 CONCLUSÃO

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

- A biflorina apresenta características físico-químicas e farmacocinéticas que a tornam elegível como molécula líder para o desenvolvimento de novos fármacos, embora sejam necessárias modificações para a melhoria de sua característica hidrofóbica;
- A biflorina pode ser considerada uma substância segura quanto aos parâmetros referentes a carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade e efeitos irritativos. No entanto, são necessários estudos adicionais que envolvam testes de carcinogenicidade e estudos de tolerância *in vivo*;
- Combinado os resultados *in silico* deste trabalho, com resultados *in vitro* obtidos previamente, pode-se sugerir que a inibição de AKT-1 pela biflorina não se dá pela interação direta com esta enzima, e sim pela interação com N-caderina;
- De forma similar a inibição da expressão de EGFR não acontece pela interação direta com este gene;
- A indução de morte celular em células de melanoma que expressam BRAF não é causada pela interação direta com este alvo;
- A biflorina interage com a topoisomerase do tipo I, mas não com a topoisomerase do tipo II, sugerindo a necessidade de estudos mais robustos relacionados a este alvo a fim de elucidar o real mecanismo desta interação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Taha; VALENTOVIC, Monica A.; RANKIN, Gary O. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. **Biochemical pharmacology**, v. 153, p. 196-204, 2018.

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

ALAVIJEH, Mohammad S. et al. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 554-571, 2005.

AMES, Bruce N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. **Science**, v. 204, n. 4393, p. 587-593, 1979.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Brasília: 2013.

AOYAMA, Hiroshi et al. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.

ASHA, R. Nandini; NAYAGAM, B. Ravindran Durai; BHUVANESH, Nattamai. Synthesis, molecular docking, and in silico ADMET studies of 4-benzyl-1-(2, 4, 6-trimethyl-benzyl)-piperidine: Potential Inhibitor of SARS-CoV2. **Bioorganic chemistry**, v. 112, p. 104967, 2021.

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.

BAN, Tomohiro; OHUE, Masahito; AKIYAMA, Yutaka. 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, 2018.

BANERJEE, Priyanka et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W257-W263, 2018.

BARBOSA-JOBIM, Gleyce S. et al. Biflorin inhibits the proliferation of gastric cancer cells by decreasing MYC expression. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104735, 2020.

BELLMANN, Romuald; SMUSZKIEWICZ, Piotr. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737-779, 2017.

BHAT, Varsha; CHATTERJEE, Jhinuk. The use of in silico tools for the toxicity prediction of potential inhibitors of SARS-CoV-2. **Alternatives to Laboratory Animals**, p. 02611929211008196, 2021.

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.

BURGESS, Darren J. et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9053-9058, 2008.

CALABRESE, Edward J.; PRIEST, Nicholas D.; KOZUMBO, Walter J. Thresholds for carcinogens. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109464, 2021.

CAMPOS, Ludmila E. et al. Searching new structural scaffolds for BRAF inhibitors. An integrative study using theoretical and experimental techniques. **Bioorganic chemistry**, v. 91, p. 103125, 2019.

CARVALHO, Adriana Andrade et al. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. **Life sciences**, v. 93, n. 5-6, p. 201-207, 2013.

CHEN, Chun et al. Antitumor effects and mechanisms of Ganoderma extracts and spores oil. **Oncology letters**, v. 12, n. 5, p. 3571-3578, 2016.

COLLINGRIDGE GL, Volianskis A, Bannister N, France G, Hanna L, Mercier M, Tidball P, Fang G, Irvine MW, Costa BM, Monaghan DT, Bortolotto ZA, Molnar E, Lodge D, Jane DE. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology*. 2013;64:13–26, 2013.

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.

CRAGG, Gordon M.; GROTHAUS, Paul G.; NEWMAN, David J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

DA CUNHA, Marcos Guilherme et al. Prediction of pharmacokinetic and toxicological parameters of a 4-phenylcoumarin isolated from geopropolis: In silico and in vitro approaches. **Toxicology letters**, v. 263, p. 6-10, 2016.

DA SILVA, F. M. A. et al. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 77–80, 2015.

DATTA, Riya; DAS, Dibyendu; DAS, Srinjoy. Efficient lipophilicity prediction of molecules employing deep-learning models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 213, p. 104309, 2021.

DE LEÓN, Gerardo; FRÖHLICH, Eleonore; SALAR-BEHZADI, Sharareh. Bitter taste in silico: A review on virtual ligand screening and characterization methods for TAS2R-bitterant interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 120486, 2021.

DÉCIGA-CAMPOS, Myrna et al. Complementary pharmacological and toxicological characterization data on the pharmacological profile of N-(2, 6-dichlorophenyl)-2-(4-methyl-1-piperidiny) acetamide. **Data in brief**, v. 8, p. 1007-1012, 2016.

DING, Ye et al. Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 122, p. 102-117, 2016.

DU, Xiaojing et al. The evolving horizon: acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors. **The Innovation**, p. 100103, 2021.

ECHEVERRIA-VILLALOBOS, Marco et al. Perioperative care of cannabis users: a comprehensive review of pharmacological and anesthetic considerations. **Journal of clinical anesthesia**, v. 57, p. 41-49, 2019.

EKINS, Sean; MESTRES, Jordi; TESTA, Bernard. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 9-20, 2007.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol*, v. 87, n. 1, p. 93- 120, Jan. 2014.

FERGUSON, David M. et al. Targeting topoisomerase II activity in NSCLC with 9-aminoacridine derivatives. **Anticancer research**, v. 35, n. 10, p. 5211-5217, 2015.

GALÚCIO, João Marcos et al. In silico identification of natural products with anticancer activity using a chemo-structural database of Brazilian biodiversity. **Computational biology and chemistry**, v. 83, p. 107102, 2019.

GANORKAR, Saurabh B. et al. Pharmaceutical analysis combined with in-silico therapeutic and toxicological profiling on zileuton and its impurities to assist in modern drug discovery. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 179, p. 112982, 2020.

GIACOMINI, Kathleen M.; BLASCHKE, Terrence F. Effect of concentration-dependent binding to plasma proteins on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disopyramide. **Clinical pharmacokinetics**, v. 9, n. 1, p. 42-48, 1984.

GLASSMAN, Patrick M.; BALTHASAR, Joseph P. Physiologically-based modeling of monoclonal antibody pharmacokinetics in drug discovery and development. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 34, n. 1, p. 3-13, 2019.

GONÇALVES, de Lima O. et al. A Ação da Luz Sobre a Biflorina. **Rev Inst Antibiot**, v. 3, p. 97-100, 1961.

GUENGERICH, F. Peter; WATERMAN, Michael R.; EGLI, Martin. Recent structural insights into cytochrome P450 function. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, n. 8, p. 625-640, 2016.

GÜNEŞ, Serdar Sinan et al. Primum non nocere: In silico prediction of adverse drug reactions of antidepressant drugs. **Computational Toxicology**, v. 18, p. 100165, 2021.

GUO, Yan-Jun et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 19, n. 3, p. 1997-2007, 2020.

HADDA, Yazan et al. Toward structure-based drug design against the epidermal growth factor receptor (EGFR). **Drug discovery today**, 2020.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, p.646-674, 2011.

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.

JACOBS, Roberts S.; WILSON, L. Fertilized sea urchin eggs as a model for detecting cell division inhibitors. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 27, p. 481-493, 1986.

JEON, Se Jin et al. Biflorin ameliorates memory impairments induced by cholinergic blockade in mice. **Biomolecules & therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 249, 2017.

JOHNSON, Candice et al. Skin sensitization in silico protocol. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 116, p. 104688, 2020.

KANE, Susan et al. A method to identify serine kinase substrates: Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 25, p. 22115-22118, 2002.

KHAN, Tahmeena et al. Computational Drug Designing and Prediction Of Important Parameters Using in silico Methods-A Review. **Current computer-aided drug design**, v. 15, n. 5, p. 384-397, 2019.

KIKUCHI, Takashi et al. 3-O-(E)-p-coumaroyl tormentic acid from *Eriobotrya japonica* leaves induces caspase-dependent apoptotic cell death in human leukemia cell line. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 3, p. 378-381, 2011.

KIM, Albert H. et al. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 3, p. 893, 2001.

KONYA, A.; VIGVARY, Z. Neoadjuvant intraarterial chemotherapy of soft tissue sarcomas. **Annals of oncology**, v. 3, p. S127-S129, 1992.

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.; ALMERICI, 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.

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, Man-Yu et al. Selective and effective targeting of chronic myeloid leukemia stem cells by topoisomerase II inhibitor etoposide in combination with imatinib mesylate in vitro. **Cell biology international**, v. 41, n. 1, p. 16-23, 2017.

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.

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.

MANNING, Brendan D. et al. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Molecular cell**, v. 10, n. 1, p. 151-162, 2002.

MARCOLIN, Marco Antonio; CANTARELLI, Maria da Graça; GARCIA JUNIOR, Manoel. Drug interactions among clinical and psychiatric drugs. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 2, p. 70-81, 2004.

MOHD HASSAN, K. A. et al. Drug discovery and in silico techniques: a mini-review. **Enzym. Eng**, v. 4, p. 1-3, 2014.

MONTENEGRO, Raquel C. et al. Biflorin, a naphthoquinone, inhibitsegfr in breast cancer cells. **Med. Chem**, v. 3, p. 179-182, 2013b.

MONTENEGRO, Raquel Carvalho et al. A novel o-napthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 7, p. 2076-2083, 2013a.

NAU, Roland; SÖRGEL, Fritz; EIFFERT, Helmut. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 858-883, 2010.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

ODONNE, Guillaume et al. Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 199, p. 211-230, 2017.

PAGADALA, Nataraj S.; SYED, Khajamohiddin; TUSZYNSKI, Jack. Software for molecular docking: a review. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 2, p. 91-102, 2017.

PAI, Varadraj; BHANDARI, Prasana; SHUKLA, Pankaj. Topical peptides as cosmeceuticals. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 83, n. 1, 2017.

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

PARDRIDGE, William M. Drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, v. 32, n. 11, p. 1959-1972, 2012.

PEARSON, Gray et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.

PENG, Yayuan et al. Insights into mechanisms and severity of drug-induced liver injury via computational systems toxicology approach. **Toxicology letters**, v. 312, p. 22-33, 2019.

PIÑERO, Janet; FURLONG, Laura I.; SANZ, Ferran. In silico models in drug development: where we are. **Current opinion in pharmacology**, v. 42, p. 111-121, 2018.

PRIOR, Helen et al. Opportunities for use of one species for longer-term toxicology testing during drug development: A cross-industry evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 113, p. 104624, 2020.

RALPH, Ana Carolina Lima et al. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 237-245, 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.

RENA, Graham et al. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 24, p. 17179-17183, 1999.

RIZK, M. L. et al. Importance of drug pharmacokinetics at the site of action. **Clinical and translational science**, v. 10, n. 3, p. 133-142, 2017.

RUIZ-GARCIA, A. et al. Pharmacokinetics in drug discovery. *J Pharma Sci*, v. 97, n. 8, p. 654-90, Mar. 2007.

RUIZ-RODRÍGUEZ, Manuel A. et al. In silico prediction of the toxic potential of lupeol. **Chemical research in toxicology**, v. 30, n. 8, p. 1562-1571, 2017.

SAHIN, Selma; BENET, Leslie Z. The operational multiple dosing half-life: a key to defining drug accumulation in patients and to designing extended release dosage forms. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 12, p. 2869-2877, 2008.

SANTANA, Edson RB et al. Biological Activity and Photostability of Biflorin Micellar Nanostructures. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8595-8604, 2015.t

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.

SHAN, Xinzhu et al. Ferroptosis-driven nanotherapeutics for cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, 2020.

SHIKOV, Alexander N. et al. Pharmacokinetics of marine-derived drugs. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 557, 2020.

SOLTANI, et al. A comprehensive review of in silico approaches for the prediction and modulation of aldehyde oxidase-mediated drug metabolism: The current features, challenges and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021.

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.

STEPHENS, R. M. et al. 95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site. **Molecular and cellular biology**, v. 12, n. 9, p. 3733-3742, 1992.

SUAREZ-TORRES, Jose D.; OROZCO, Camilo; CIANGHEROTTI, Carlos E. The 2-year rodent bioassay in drug and chemical carcinogenicity testing: Panorama of its concordance, utility, configuration, and provisional regulatory role. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, p. 107070, 2021.

THOMAS, Christine C. et al. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate. **Current Biology**, v. 12, n. 14, p. 1256-1262, 2002.

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

ULLAH, Rahim et al. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2021.

VASCONCELLOS, M. C. de. Estudo do potencial antineoplásico da biflorina, o-naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora* L. 2007. 182 f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

VASCONCELLOS, Marne C. et al. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 5-6, p. 394-398, 2004.

VASCONCELLOS, Marne C. et al. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1, 4 o-naphthoquinone isolated from *Caprariabiflora* L. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 10, p. 799-810, 2010.

VASCONCELLOS, Marne C. et al. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma research**, v. 21, n. 2, p. 106-114, 2011.

VASCONCELLOS, Marne Carvalho et al. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Caprariabiflora*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VASCONCELLOS, Marne Carvalho et al. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 765, p. 168-178, 2016.

WANG, Yiran et al. Cytochrome P450-based drug-drug interactions of vonoprazan in vitro and in vivo. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 53, 2020.

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.

WISINTAINER, Gabrielle GNS et al. Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1907-1914, 2014.

WU, Ning et al. A novel DNA topoisomerase I inhibitor with different mechanism from camptothecin induces G2/M phase cell cycle arrest to K562 cells. **Biochemistry**, v. 49, n. 47, p. 10131-10136, 2010.

WU, Jiaofeng et al. In silico study reveals existing drugs as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: Structure-based virtual screening validated by experimental investigation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1218, p. 128532, 2020.

YAMREUDEEWONG, Weeranuj et al. Probable interaction between warfarin and marijuana smoking. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, n. 7-8, p. 1347-1353, 2009.

YAO, Bing-Lei et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 7-alkylamino substituted benzo [a] phenazin derivatives as dual topoisomerase I/II inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 92, p. 540-553, 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.

ZHANG, Liang. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine. **Drug delivery**, v. 26, n. 1, p. 860-869, 2019.

ZHANG, Wei; LIU, Hui Tu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell research**, v. 12, n. 1, p. 9-18, 2002.

ZHANG, Zhiqin et al. Pharmacology, toxicity and pharmacokinetics of acetylshikonin: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 950-958, 2020.