



**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

EVELY DANTAS BORGES LOPES

**BUSCA *IN SILICO* DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES NA
ESPÉCIE *EUPHORBIA TIRUCALLI* COMO POTENCIAIS AGENTES
ANTICANCERÍGENOS CONTRA O CÂNCER COLORRETAL.**

**SALVADOR
2024**



**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA**



EVELY DANTAS BORGES LOPES

***BUSCA IN SILICO* DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES NA ESPÉCIE
EUPHORBIA TIRUCALLI COMO POTENCIAIS AGENTES ANTICANCERÍGENOS
CONTRA O CÂNCER COLORRETAL.**

Dissertação de Mestrado Programa de Pós- Graduação
Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia
Molecular (PMBqBM) para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Barbosa da Silva

**SALVADOR
2024**



LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA



L864 Lopes, Evely Dantas Borges
Busca *in silico* de substâncias bioativas presentes na espécie *Euphorbia Tirucalli* como potenciais agentes anticancerígenos contra o câncer colorretal/
Evely Dantas Borges Lopes. – Salvador, 2024.
101 f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Barbosa da Silva; Coorientadora: Prof^ª.
Dr^ª. Luzimar Gonzaga Fernandez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica
e Biologia Molecular, 2024.

Inclui referências.

1. *Euphorbia tirucalli*. 2. Câncer – Cólon. 3. Molecular docking. I. Silva,
Márcia Barbosa da. II. Gonzaga Fernandes, Luzimar. III. Universidade Federal
da Bahia. IV. Título.

CDU 616-006.6



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

EVELY DANTAS BORGES LOPES

“Busca *in silico* de substâncias bioativas presentes na espécie *Euphorbia tirucalli* como potenciais agentes anticancerígenos”

10 de julho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Documento assinado digitalmente
MARCIA BARBOSA DA SILVA
Data: 11/07/2024 11:35:58-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Márcia Barbosa da Silva (UFBA)/Presidente

Prof. Dr. Juan Ricardo Urrego Alvarez



Documento assinado digitalmente
MARCELO BONDARO GOIS
Data: 12/07/2024 16:02:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Biondaro Gois



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que desde o início me fortaleceu, iluminou meu caminho e infundiu em mim a coragem necessária para enfrentar cada desafio ao longo de todas as etapas desta significativa jornada.

Expresso minha profunda gratidão à minha mãe Anilde Dantas e ao meu pai Antonio Bispo, cujo o constante incentivo, apoio incondicional e amor genuíno foram pilares essenciais que sustentaram meu crescimento pessoal e profissional, contribuindo de maneira significativa para o alcance dos meus objetivos e sucesso em minha trajetória.

À minha orientadora Marcia Barbosa da Silva, manifesto minha sincera gratidão por sua orientação precisa que foi fundamental em cada passo do caminho percorrido. Seu apoio constante nos momentos de dúvida e dificuldade, foi verdadeiramente reconfortante e motivador. Além disso, a confiança que depositou em minhas habilidades, incentivando-me a superar desafios e acreditar no meu potencial.

Às minhas queridas professoras Rubia Suely e Ana Clara, agradeço de todo o coração por reconhecerem e incentivarem o meu potencial desde os tempos de graduação, sendo pilares essenciais em minha formação acadêmica.

Ao meu namorado Lázaro, bem como aos meus leais amigos João Pedro e Vitor Manoel, expresso minha eterna gratidão pela presença constante, apoio incansável em cada desafio e pela crença em minha capacidade e inteligência.

Ao excepcional grupo de pesquisa, em especial a Luisa, Mirela, Bianca e Gabriel, dedico minha mais profunda gratidão por todo o apoio incondicional, momentos de descontração e incentivo nos momentos de necessidade. Agradeço imensamente à Amanda e ao Eduardo por todo o suporte e colaboração prestados ao longo do caminho.

Aos meus colegas de laboratório, expresso minha sincera gratidão por estarem ao meu lado, compartilhando risadas, oferecendo apoio inestimável e segurando minha mão nos momentos mais difíceis.

À Luzimar Gonzaga Fernandez, meu reconhecimento pelo apoio valioso oferecido em todos os momentos.

Por fim, manifesto minha profunda gratidão à FAPESB e ao CARREFOUR pela oportunidade concedida através do custeio da bolsa, que foi essencial para a realização deste projeto.



LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA



"Trabalho duro é inútil para aqueles que não acreditam em si mesmos"
Naruto Uzumaki



RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comum de câncer, afetando o intestino grosso e o reto, sendo causado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. A desregulação das vias de sinalização celular, como a PI3K, mTOR, ERK/MAPK, TNF- α e TGF- β , contribui para o desenvolvimento do CCR. A *Euphorbia tirucalli*, planta conhecida como "aveloz", contém flavonoides como kaempferol, isoquercetina e quercetina, com atividades antitumorais. Uma tabela com 63 proteínas importantes na via de sinalização do CCR foi elaborada, selecionando cinco proteínas-alvo. Foi realizado o modelo de alinhamento flexível de flavonoides, resultando na seleção do modelo 4, posteriormente a verificação de pontos farmacofóricos e construção da estrutura única, denominada Flavo1. A molécula Flavo1 foi otimizada para melhorar sua eficácia terapêutica, levando ao desenvolvimento da Flavo2. O volume do Flavo2 é de 378,867 unidades e sua densidade é de 1,04. Ele possui 8,0 aceptores e 6,0 doadores de ligações de hidrogênio, dentro dos limites aceitáveis. O Flavo2 apresenta um QED médio de 0,67 para compostos atrativos, 0,49 para não atrativos e 0,34 para não atrativos altamente complexos. Sua permeabilidade Caco-2 prevista é expressa como $-5,301 \log \text{ cm/s}$, cerca de 0,151 abaixo do valor considerado bom ($>-5,15 \log \text{ cm/s}$). O Flavo2 obteve a permeabilidade Caco-2 abaixo do limite considerado bom e apresentou estabilidade e baixa probabilidade de depuração hepática, mostrando-se como um inibidor da aromatase, podendo afetar o equilíbrio hormonal. Para a validação de complexos, foi necessário realizar o re-docking, exceto do TGF- β , que não estava acoplada com um ligante. A interação entre o Flavo2 e a mTOR resultou em uma energia de ligação de $-8,74$, envolvendo 12 ligantes no sítio de ATP da mTOR. O Flavo2 mostrou uma interação próxima ao medicamento PI-103, com uma energia de ligação de $-8,78$. Com a PI3K, o Flavo2 apresentou uma energia de ligação de $-7,89$, com interação significativa com o resíduo crucial. A interação com a ERK2 resultou em uma energia de ligação de $-7,64$, enquanto com ulixertinibe foi de $-7,65$. A ancoragem com TGF β R1 apresentou uma forte interação, com uma energia de ligação de $-9,80$, enquanto com Galunisertib foi ligeiramente superior, em cerca de 0,15. Com o TNF- α , o Flavo2 teve uma energia de ligação de $-7,69$, enquanto com SPD304 foi de $-7,60$, inferior ao Flavo2. Ao comparar o composto Flavo2 com um fármaco sintético, observou-se que a energia de ligação do Flavo2 foi superior em proteínas como PI3K e TNF- α . Entretanto, não foram observadas diferenças significativas em relação às outras proteínas estudadas. É importante ressaltar que são necessários testes complementares para validar esses resultados e aprimorar as propriedades farmacocinéticas do Flavo2. Essas etapas são cruciais para o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros no tratamento do câncer colorretal.

Palavras chaves: *Euphorbia tirucalli*; Câncer, cólon, molecular docking.



ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer, affecting the large intestine and rectum, caused by the accumulation of genetic and epigenetic alterations. The dysregulation of cellular signaling pathways, such as PI3K, mTOR, ERK/MAPK, TNF- α , and TGF- β , contributes to CRC development. *Euphorbia tirucalli*, a plant known as "aveloz", contains flavonoids like kaempferol, isoquercetin, and quercetin, with anti-tumor activities. A table with 63 important proteins in the CRC signaling pathway was created, selecting five target proteins. Flexible alignment models of flavonoids resulted in the selection of model 4, followed by verification of pharmacophoric points and the construction of a unique structure, named Flavo1. The Flavo1 molecule was optimized to improve its therapeutic efficacy, leading to the development of Flavo2. The volume of Flavo2 is 378.867 units and its density is 1.04. It has 8.0 acceptors and 6.0 hydrogen bond donors, within acceptable limits. Flavo2 has an average QED of 0.67 for attractive compounds, 0.49 for non-attractive, and 0.34 for highly complex non-attractive compounds. Its predicted Caco-2 permeability is expressed as $-5.301 \log \text{ cm/s}$, approximately 0.151 below the considered good value ($> -5.15 \log \text{ cm/s}$). Flavo2 obtained Caco-2 permeability below the considered good limit and showed stability and low likelihood of hepatic clearance, being an aromatase inhibitor that may affect hormonal balance. For complex validation, re-docking was necessary, except for TGF- β , which was not coupled with a ligand. The interaction between Flavo2 and mTOR resulted in a binding energy of -8.74 , involving 12 ligands in the ATP site of mTOR. Flavo2 showed a close interaction to the drug PI-103, with a binding energy of -8.78 . With PI3K, Flavo2 presented a binding energy of -7.89 , with significant interaction with the crucial residue. The interaction with ERK2 resulted in a binding energy of -7.64 , while with ulixertinibe it was -7.65 . The docking with TGF β R1 showed a strong interaction, with a binding energy of -9.80 , while with Galunisertib, it was slightly higher by about 0.15. With TNF- α , Flavo2 had a binding energy of -7.69 , while with SPD304, it was -7.60 , lower than Flavo2. When comparing the compound Flavo2 with a synthetic drug, it was observed that the binding energy of Flavo2 was higher in proteins such as PI3K and TNF- α . However, no significant differences were observed concerning the other studied proteins. It is important to note that additional tests are needed to validate these results and improve the pharmacokinetic properties of Flavo2. These steps are crucial for the development of new, effective, and safe drugs for the treatment of colorectal cancer.

Keywords: *Euphorbia tirucalli*; Cancer; Colon; Molecular Docking.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025.....	12
Figura 2	Microbiota intestinal do Câncer colorretal.	14
Figura 3	Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a progressão do CCR.....	15
Figura 4	Representação esquemática das vias de sinalização presentes no CCR.....	16
Figura 5	<i>Euphorbia tirucalli</i>	26
Figura 6	Modelo encaixe induzido.....	32
Figura 7	Alinhamento flexível com melhor pontuação.....	48
Figura 8	Modelagem de farmacóforo baseada nos flavonoides.....	49
Figura 9	Estrutura Flavo 1.....	50
Figura 10	Otimizada da estrutura da Flavo1, preservando suas atividades farmacológicas, resultando na formação da Flavo2.....	50
Figura 11	Validação das estruturas do PDB. Re-docking das estruturas.....	69
Figura 12	Ancoragem mTOR e Flavo2.....	71
Figura 13	Ancoragem mTOR e PI-103.....	72
Figura 14	Ancoragem de PI3K e Flavo2.....	73
Figura 15	Ancoragem mTOR e PI-103.....	74
Figura 16	Ancoragem de ERK e Flavo2.....	75
Figura 17	Ancoragem ERK e Ulixertinibe.....	76
Figura 18	Ancoragem de TGF β R1 e Flavo2.....	77
Figura 19	Ancoragem TGF β R1 e Galunisertinibe.....	78
Figura 20	Ancoragem de TNF- α e Flavo2.....	79
Figura 21	Ancoragem TNF- α e SPD304.....	80
Figura 22	Heat Map dos compostos.....	81



LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas-alvo relacionadas à progressão do CCR.....	40
Tabela 2	Flavonoides presentes no látex da <i>Euphorbia tirucalli</i>	44
Tabela 3	Fármacos inibidores das proteínas-alvo.....	46
Tabela 4	Termos de pontuações do alinhamento flexível.....	48
Tabela 5	Propriedades físico-química do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	51
Tabela 6	Propriedades Química medicinal do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	54
Tabela 7	Propriedades de Absorção do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	57
Tabela 8	Propriedades do metabolismo de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	59
Tabela 9	Propriedades da Distribuição de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	60
Tabela 10	Propriedades de Excreção de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	63
Tabela 11	Propriedades de Toxicidade de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	63
Tabela 12	Propriedades de Caminho Tox21 de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.....	67



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E CÓDIGOS

ACC	Regiões aceitadores de ligação de hidrogênio
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AhR	Receptor de hidrocarboneto de arila
ABD	Adaptador amino-terminal domínio
ABC	Superfamília de transportadores de cassete de ligação de ATP
AR	Reconhecimento pelo alvo, o centro de anel Pi
ARO	Anel farmacofóro aromático
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BSEP	Bomba de exportação de sais biliares
CADD	Computer Aided Drug Design
CCR	Cancer colorretal
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
CE	Coefficiente de permeabilidade aparente
CL	Depuração plasmática
CEA	Antígeno carcinoembriônico
CYP	Citocromo P450
DDI	Interações medicamentosas clinicamente importantes
DM	Dinâmica molecular
EDCs	Desreguladores endócrinos
EMT	Transição epitelial para mesenquimal
ER	Receptor de estrogênio
fChar	Carga formal
Fluc	Luciferase do vaga-lume
HSFS	Regulada por fatores de transcrição de choque térmico
HYD	Hidrofóbicas
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina



LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA



IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IKK β	I κ B-quinase
logS	Logaritmo da solubilidade aquosa
LBDD	Ligand-Based Drug Design
mSIN1	Proteína ativada por estresse mamífero quinase interagindo proteína 1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDCK	Células renais caninas Madin-Darby
MMP	Membrana mitocondrial
MOE	Molecular Operating Environment
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
nHA	Ligações de hidrogênio
NHBA	Número de ligação de aceitadores de H
NHBD	Número de ligações doadores de H
Nrotb	Número de ligações rotativas
NK	Células natural killer
NAr	Número de anéis aromáticos
nHD	Número de doadores de ligações de hidrogênio
nHet	Número de heteroátomos
nRig	Número de ligações rígidas
PA	Permeabilidade de Membrana Artificial Paralela
PAINS	Pan Assay Interference Compounds
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
Papp	Coefficiente de permeabilidade aparente
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIP2	Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato
PK	Propriedade farmacocinética
PIN	Projeção plana do mencionado
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma



LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA, BIOTECNOLOGIA E BIOPRODUTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA



Protor-1	Proteína observada com RICTOR
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
RBD	Domínio de ligação Ras
Rheb	Homólogo Ras Enriquecido no Cérebro
RICTOR	Companheiro insensível de rapamicina da mTOR
RI	Receptor do fator de necrose tumoral
RTKs	Receptores tirosina quinases
SBDD	Structure-Based Drug Design
SMI	Inibidor oral de pequenas moléculas
SQTL	Síndrome do QT longo
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TdP	Torsade de Pointes
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TPSA	Área Topológica Superficial Polar
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VDss	Volume de distribuição no estado estacionário
Volsurf	Volume-Surface Area
wwPDB	Worldwide Protein Data Bank



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Dados epidemiológicos do câncer	11
2.2 Câncer colorretal	12
2.3 Vias de sinalização envolvidas no CCR.....	15
2.3.1 mtor	17
2.3.2 PI3K	19
2.3.3 ERK/MAPK	21
2.3.4 TNF- α	22
2.3.5 TGF- β	24
2.4 <i>Euphorbia tirucalli</i>	26
2.5 Flavonoides	27
2.6 Métodos computacionais como ferramentas para o planejamento de compostos bioativos	29
2.6.1. Triagem virtual por padrão farmacofórico	30
2.6.2. Docking molecular	31
2.6.3 Quimiometria aplicada aos estudos qsar	33
2.6.4 Dinâmica molecular (dm).....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4. HIPÓTESE.....	36
5. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO.....	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. METODOLOGIA.....	37
6.1 Seleções de proteínas alvo.....	37
6.2 Seleção dos ligantes e fármacos de referência.....	37
6.3 Construção do farmacóforo.....	37
6.4 Otimização do composto.....	38
6.5 Análise de ADMET.....	38
6.6 Validação da ancoragem molecular.....	38



6.7 Ancoragem molecular.....	39
6.8 Análise dos resultados.....	39
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
7.1 Seleções de proteínas alvo.....	40
7.2 Seleções dos ligantes e fármacos de referência.....	43
7.3 Construção do farmacofóro.....	47
7.4 Otimização do composto.....	50
7.5 Análise de ADMET.....	51
7.5.1 Físico-química.....	51
7.5.2 Química medicinal.....	54
7.5.3 Absorção.....	57
7.5.4 Metabolismo.....	59
7.5.5 Distribuição.....	60
7.5.6 Excreção.....	62
7.5.7 Toxicidade.....	63
7.6 Validação da ancoragem molecular.....	69
7.7. Ancoragem molecular.....	70
7.7.1 mTOR e o flavo2.....	70
7.7.2 mTOR e PI-103.....	71
7.7.3 PI3K e flavo2.....	72
7.7.4 PI3K e PI-103.....	73
7.7.5. ERK e flavo2.....	74
7.7.6 ERK e Ulixertinibe.....	75
7.7.7 TGFβ1 e flavo2.....	76
7.7.8 TGFβ1 e Galunisertinibe.....	77
7.7.9 TNF-α e flavo2.....	78
7.7.10 TNF-α e SPD304.....	79
7.8 Heat map da ancoragem molecular.....	80
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	82
10. REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma neoplasia maligna, sendo representado por um conjunto de mais de cem doenças, definido pelo crescimento desordenado de células que se agrupam formando tumores, que invadem tecidos e órgãos vizinhos, ocasionando metástases. O câncer pode se desenvolver por diversos fatores, como o envelhecimento, exposição a poluentes ambientais, sistema imunossuprimido, mudanças estruturais, predisposição genética, tabagismo, fatores sociais, carência de prevenção primária, irradiação, consumo de bebidas alcoólicas e até a alimentação. Sendo um dos principais problemas de saúde pública e representa a segunda causa de morte em todo o mundo, na maior parte em países de baixa e média renda (BRASIL, 2019; SAÚDE; SILVA, 2020).

O uso de plantas para tratamento e cura de doenças é uma prática ancestral. Cerca de 60% dos fármacos utilizados no tratamento do câncer têm origem em produtos naturais. Esses compostos extraídos das plantas, com potencial anticancerígeno, atuam interagindo com proteínas e microtúbulos. A família *Euphorbiaceae* é uma das maiores e mais importantes famílias de plantas angiospermas, compreendendo cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies, distribuídas em praticamente todas as regiões do mundo. Originária do Sul da África, especialmente da região de Madagascar, a espécie *Euphorbia tirucalli* é um exemplo marcante desta família. Introduzida no Brasil por volta de 1892, durante as antigas navegações, ela foi inicialmente plantada no Nordeste do país, onde se adaptou bem a locais de clima quente. Posteriormente, a planta se disseminou por todo o território brasileiro, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (BRANDÃO; DAVID; COUTO; NASCIMENTO *et al.*, 2010; COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; ALVES; MADEIRA *et al.*, 2010).

O látex da *Euphorbia tirucalli* é uma fonte rica em flavonoides, compostos amplamente reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde. Os flavonoides são frequentemente utilizados como corantes naturais e ingredientes em cosméticos, mas além disso, eles também desempenham um papel crucial em uma série de atividades biológicas. Estudos têm demonstrado que os flavonoides presentes na *Euphorbia tirucalli* exibem uma gama impressionante de atividades farmacológicas. Entre elas estão ação antiúlcera, antidepressiva, antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, antidiabética, anti-inflamatória, antiangiogênica, antiproliferativa e atividades anticancerígenas (MAGOZWI; DINALA; MOKWANA; SIWE-NOUNDOU *et al.*, 2021).

O CADD (*Computer-Assisted Drug Design*) estão atraindo cada vez mais atenção, pois podem ajudar a solucionar os problemas de escala, tempo e custo enfrentados pelas abordagens

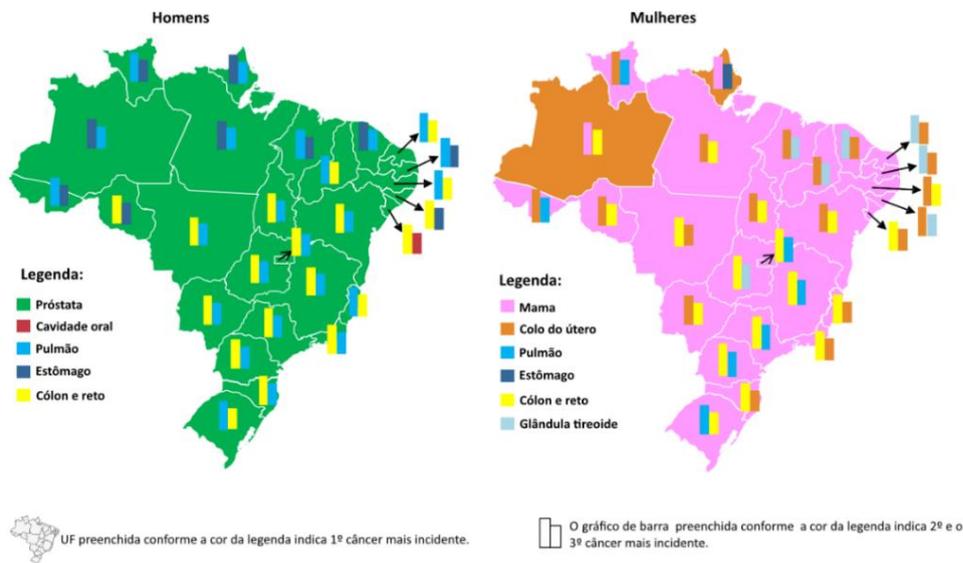
experimentais convencionais. O CADD inclui a identificação computacional de potenciais alvos de medicamentos, a triagem virtual de grandes bibliotecas químicas para encontrar candidatos a medicamentos eficazes, a otimização adicional dos compostos candidatos e a avaliação *in silico* de sua toxicidade potencial, abrindo novas possibilidades para aumentar a precisão e a eficiência da descoberta *in silico* de medicamentos (SHAKER; AHMAD; LEE; JUNG *et al.*, 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER

Nos países com elevado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), as ações de prevenção, detecção precoce e tratamento têm impacto significativo na redução da incidência e das taxas de mortalidade por câncer, sendo assim, cruciais para diminuir as taxas de morbidade e mortalidade. Com a identificação, tratamento rápido e adequado contribuirão para a minimização dos impactos indesejados da doença. No Brasil, as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul possuem os maiores IDHs, enquanto as regiões Nordeste e Norte têm os menores índices. A estimativa para o triênio de 2023 a 2025 no Brasil é de 704 mil casos novos de câncer e a distribuição da incidência por região geográfica mostra que as regiões Sul e Sudeste concentram cerca de 70% dos casos, sendo que metade deles está na Região Sudeste, resultando assim, uma grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do país (figura 1) (DE OLIVEIRA SANTOS; DE LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023; SAÚDE, 2023).

Figura 1: Distribuição dos cânceres mais incidentes (taxa ajustada) por UF e sexo, 2023-2025. Os cânceres de cólon e reto e de cavidade oral estão entre os três principais tipos. Em todos os estados da Região Centro-Oeste, o câncer de cólon e reto é o segundo mais comum, seguido pelo câncer de pulmão. Nas Regiões Sudeste e Sul, o padrão é semelhante, exceto no Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde o câncer de pulmão é o segundo mais comum (INCA, 2023).



Fonte: INCA,2023

O câncer de mama em mulheres é o mais comum no Brasil, seguido pelo câncer de próstata. Já o câncer de cólon e reto e o câncer do colo do útero alternam a segunda posição na região Centro-Oeste entre as Unidades Federativas (UF). Nas regiões Sudeste e Sul, o câncer de cólon e reto é o segundo mais frequente em todas as UF. Este tipo de câncer apresenta as maiores taxas de incidência nas regiões Sudeste (20,32/100 mil homens; 16,60/100 mil mulheres), Sul (19,44/100 mil homens; 14,99/100 mil mulheres) e Centro-Oeste (17,63/100 mil homens; 13,94/100 mil mulheres). As menores taxas são observadas nas regiões Nordeste (10,44/100 mil homens; 10,31/100 mil mulheres) e Norte (8,30/100 mil homens; 8,50/100 mil mulheres) (DE OLIVEIRA SANTOS; DE LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

2.2 CÂNCER COLORRETAL

O intestino grosso é a parte mais curta do intestino e é dividido em oito partes distintas: ceco, apêndice, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus. O cólon ascendente se inicia como uma continuação do ceco até a flexura direita, onde se conecta com o cólon transverso, se estendendo da flexura direita até a flexura esquerda, onde se encontra com o cólon descendente, que continua até a flexura sigmoide, formando o intestino. O cólon e o reto são as partes finais do intestino grosso, responsáveis pela absorção de água, eletrólitos, pela formação e eliminação das fezes. O reto se estende do cólon sigmoide até o ânus, dividido em junção retossigmoide, que é a transição entre o cólon sigmoide e o reto, o

corpo do reto e a ampola retal (figura 2) (ROSA; DOS REIS; DE OLIVEIRA; DO NASCIMENTO *et al.*, 2023).

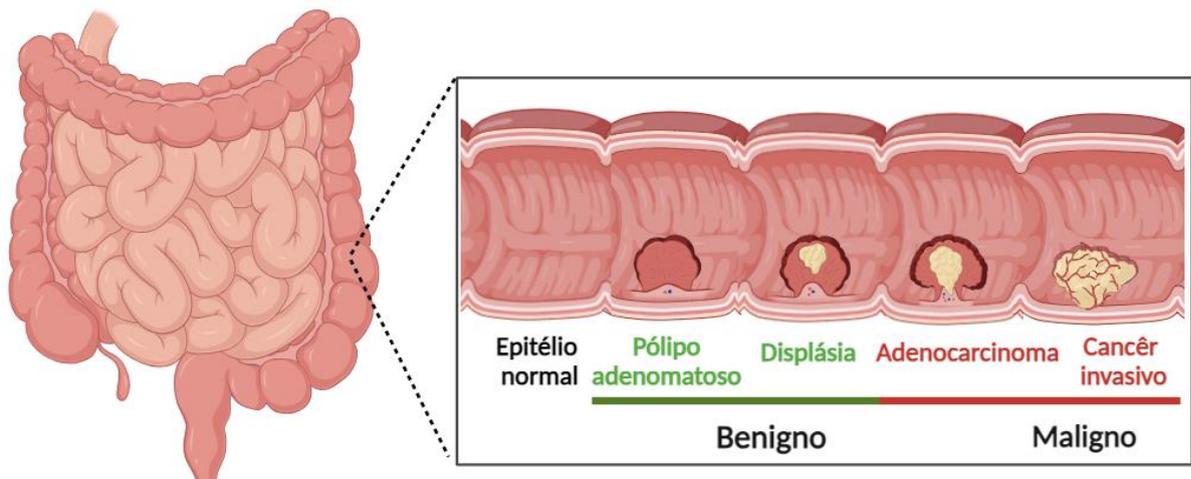
O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comum no Brasil, sendo definido como uma neoplasia maligna que afeta o intestino grosso e o reto, sendo uma consequência decorrente do acúmulo evolutivo de alterações genéticas e epigenéticas. Durante o triênio de 2023-2025, a estimativa é de 45.630 números de casos, representando um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 ocorrem entre homens e 23.660 entre mulheres. Espera-se que até 2040, o câncer colorretal aumente em mais de 50% devido às mudanças demográficas e ao estilo de vida da população (CALLEGARI, 2021; PELEGRINI; BECKER; DE OLIVEIRA; DE MELO, 2023).

Nos últimos anos, países que possuem o Índice de Desenvolvimento Humano médio e baixo, como China e Brasil, têm apresentado um aumento significativo na incidência e mortalidade por CCR. Isso pode estar relacionado com os fatores de risco associados ao desenvolvimento dessa doença, como baixa ingestão de cálcio, idade igual ou superior a 50 anos, obesidade, alimentação pobre em frutas e fibras, raça/etnia negra, sedentarismo, tabagismo, consumo elevado de carne vermelha e processada, consumo excessivo de álcool e fatores ambientais. Por outro lado, países com Índice de Desenvolvimento Humano muito alto, como Estados Unidos, Japão e França, possuem uma tendência de diminuição na incidência de CCR. Isso pode ser estar relacionado com as mudanças no estilo de vida e ao acesso adequado à detecção precoce e tratamento da doença (MELO; DORNELAS, 2023; RAMOS; MENDES; DE AQUINO FONSECA; EULÁLIO *et al.*, 2023; SENGÁ; LIU; FRANGELLA, 2023).

O câncer colorretal geralmente se manifesta entre os 50 e os 70 anos, porém há relatos de casos graves com menos de 50 anos. A maioria dos casos de CCR é esporádica, cerca de 75%, ou seja, sem histórico familiar ou predisposição genética, porém cerca de 20% dos pacientes possuem histórico familiar. Cerca de 3 a 5% dos casos são pacientes portadores de mutações germinativas associadas ao câncer colorretal hereditário sem polipose, mais conhecido como síndrome de Lynch ou à polipose adenomatosa familiar (PAF). A detecção precoce é realizada através de triagem, recomendada para todos os indivíduos maiores de 45 anos, independentemente da presença de sintomas e com risco médio. Essa triagem se estende até os 75 anos e ajuda a reduzir a probabilidade de mortalidade. Os sinais e sintomas do CCR podem variar dependendo do tipo e localização do tumor. Eles se caracterizam por mudanças no hábito intestinal, distensão abdominal, sangramento nas fezes e sangramento anal. Além disso, pode haver perda de peso inexplicada, cansaço, náuseas e vômitos (ALMEIDA; DE OLIVEIRA; ALMEIDA; OLIVEIRA *et al.*, 2023; MELO; DORNELAS, 2023; SENGÁ; LIU;

FRANGELLA, 2023). Os pólipos colônicos (figura 2) são lesões que podem se tornar câncer e, por isso, é crucial identificá-los precocemente e tratá-los de maneira adequada. O adenoma intestinal, uma lesão benigna, tem o potencial de se transformar em displasia grave e, posteriormente, em adenocarcinoma invasivo (NUNES; MESQUITA, 2006).

Figura 2. Microbiota intestinal do Câncer colorretal. Representação das alterações clínico-patológicas frequentemente encontradas durante a progressão do CCR.



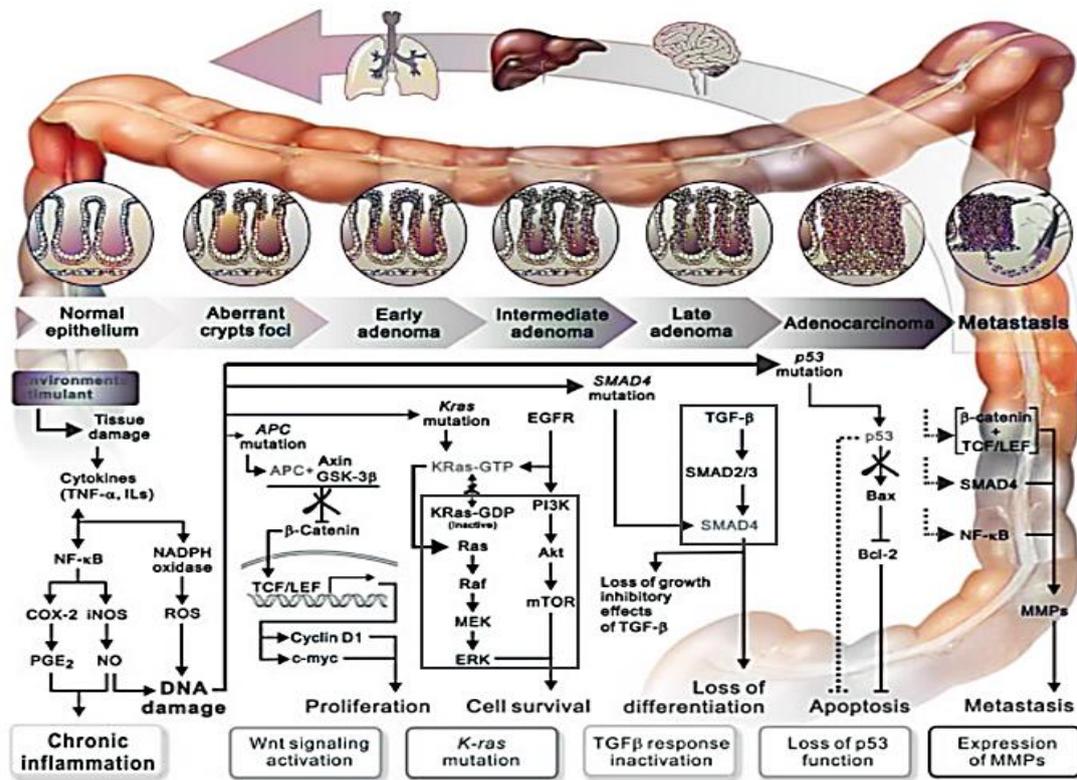
Fonte: Autoria própria (2024)

A progressão para o câncer colorretal tem início com o adenoma-carcinoma é caracterizada por danos nos tecidos causados por fatores como bactérias e agentes cancerígenos, desencadeando inflamação crônica (figura 3). Durante esse processo, células inflamatórias prejudicam os tecidos, resultando em instabilidade cromossômica e danos ao DNA das células em multiplicação, o que contribui para a formação de lesões pré-cancerígenas. O diagnóstico do CCR envolve diferentes métodos, como exame proctológico, pesquisa de sangue oculto nas fezes, colonoscopia e dosagem de CEA (carcinoembryonic antigen). Embora o diagnóstico definitivo seja feito por exame histopatológico, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear são mais eficazes para identificar a doença (MELO; DORNELAS, 2023; NUNES; MESQUITA, 2006).

O tratamento inicial do CCR é cirúrgico, com remoção da parte afetada do intestino e dos gânglios linfáticos abdominais. Em seguida, os pacientes geralmente passam por radioterapia e quimioterapia para reduzir as chances de recidiva. Após a cirurgia, o microbioma dos pacientes pode ser alterado não apenas pela doença, mas também pelo trauma cirúrgico e tratamentos como antibioticoterapia profilática, aumentando o risco de complicações infecciosas pós-operatórias, como infecção do sítio cirúrgico. Além disso, os tratamentos

posteriores, como quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia, podem ter efeitos adversos amplificados pela alteração no microbioma, afetando a resposta ao tratamento (SENGA; LIU; FRANGELLA, 2023).(PAN; LAI; WU; HO, 2011).

Figura 3: Mecanismos e eventos moleculares que caracterizam a progressão do CCR. A transição para o câncer colorretal começa com o adenoma-carcinoma e é marcada por danos, causando inflamação crônica. Durante esse processo, células inflamatórias danificam tecidos, levando a instabilidade cromossômica e danos ao DNA em células proliferativas, contribuindo para a transformação maligna. Isso resulta na formação de lesões pré-cancerígenas conhecidas como ACF (aberrant crypt foci), associadas à perda do gene APC. Conforme o tumor progride, mutações se acumulam em genes como K-ras, p53 e Smad4, e são ativadas as vias de sinalização Wnt/-catenina e EGFR/PI3K/Akt. (PAN; LAI; WU; HO, 2011).



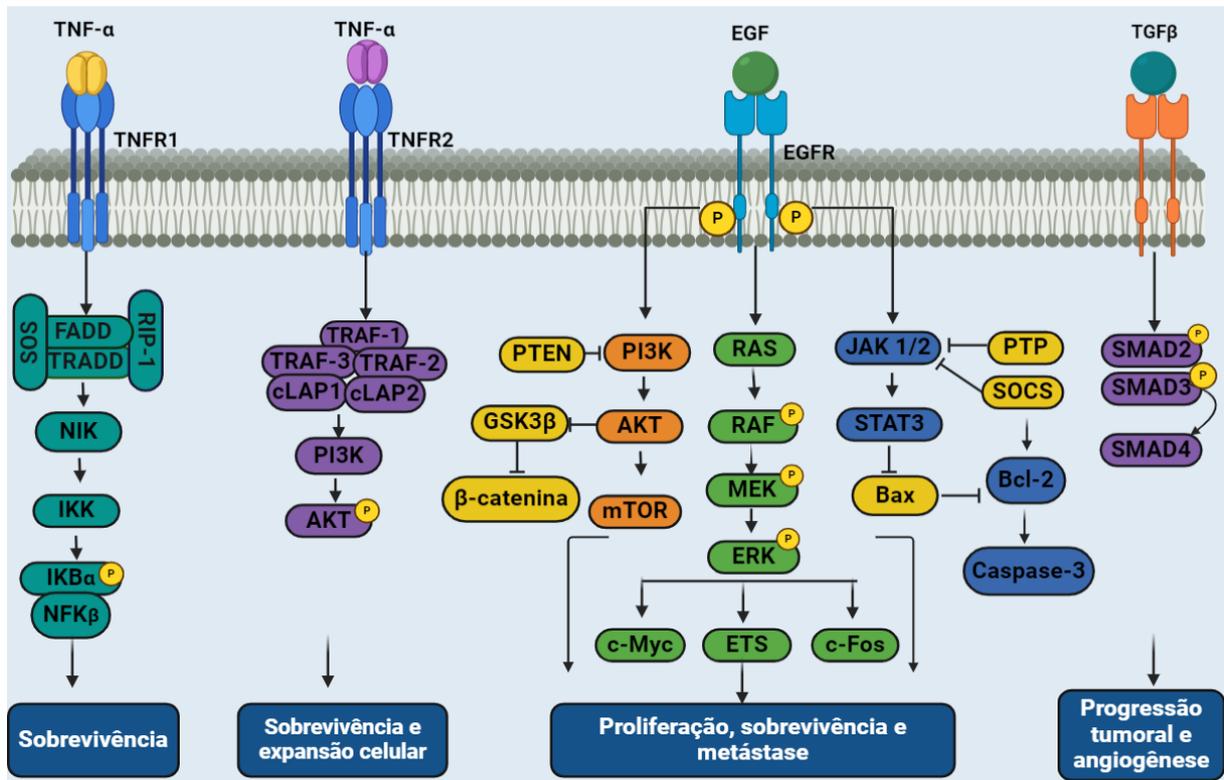
Adaptado de PAN, 2011.

2.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO CCR

A descoberta de vias envolvidas na transdução de sinais desencadeados pela ativação de receptores por seus ligantes nas células tumorais tornou possível a identificação e posterior validação de novos alvos terapêuticos do câncer, levando ao desenvolvimento de novas classes de drogas, comumente conhecidas como terapias alvo. A desregulação das diversas vias de

sinalização celular, aumento e ou diminuição da atividade ou expressão pode culminar no descontrole de eventos fisiológicos, angiogênese, proliferação, metástase, ocasionando patologias diversas, incluindo o CCR (figura 4) (DE OLIVEIRA SANTOS; DE LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023; LEITE; COSTA; CALLADO; TORRES *et al.*, 2012; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Figura 4. Representação esquemática das vias de sinalização presentes no CCR. A ativação dessas vias de sinalização promove sobrevivência, expansão celular proliferação, metástase e angiogênese.



Fonte: Autoria própria (2024)

Durante o desenvolvimento do tumor, vários eventos celulares podem ser desregulados. Dentre eles podemos citar o aumento do crescimento e proliferação, uma maior resistência ao mecanismo de morte celular e maior suscetibilidade à instabilidade genômica e mutações, possibilitando às células tumorais acumular alterações em seu DNA. Essa desregulação é um reflexo principalmente de alterações na atividade ou expressão das proteínas constituintes das vias de sinalização celular. Dessa forma, um melhor entendimento da participação das vias de sinalização celular na progressão do câncer é um passo primordial para o desenvolvimento de metodologias terapêuticas e de diagnóstico para essa doença, em particular do câncer colorretal, que ocupa o terceiro lugar em índice de incidência na população brasileira (PAN; LAI; WU; HO, 2011).

2.3.1 mTOR

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina treonina quinase pertencente à família 1 de proteínas quinases relacionadas à Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Ela é considerada um marcador específico para a progressão tumoral e desempenha um papel central na fisiologia humana, regulando a atividade de pelo menos 800 proteínas. A mTOR coordena o metabolismo celular, o crescimento e a sobrevivência em resposta a hormônios, fatores de crescimento, nutrientes, energia e sinais de estresse. A mTOR, ou "target of rapamycin" (alvo da rapamicina), é uma proteína que desempenha um papel crucial na regulação do crescimento celular, controlando processos como tradução, biogênese do ribossomo e autofagia. Ela está presente em dois complexos distintos: mTORC1 e mTORC2 (AZEVEDO, 2022; YANG; RUDGE; KOOS; VAIDIALINGAM *et al.*, 2013).

O complexo mTORC1 é ativado pela presença de nutrientes, o que leva ao recrutamento do complexo para lisossomos e endossomos tardios. Ele é composto por cinco componentes principais: mTOR, que é a subunidade catalítica do complexo; RAPTOR, a proteína associada à regulação de mTOR; mLST8, uma subunidade regulatória positiva; e as subunidades regulatórias negativas PRAS40 e DEPTOR. Esses componentes desempenham papéis específicos na regulação da atividade do complexo mTORC1. (YIP; MURATA; WALZ; SABATINI *et al.*, 2010).

O mTORC2 responde principalmente aos fatores de crescimento, promovendo a entrada no ciclo celular, a sobrevivência celular, a polarização do citoesqueleto de actina e a produção anabólica. Ele é composto por várias proteínas, incluindo mTOR, proteína ativada por estresse mamífero quinase interagindo proteína 1 (mSIN1), companheiro insensível de rapamicina da mTOR (RICTOR) e proteína observada com RICTOR (Protor-1). O mTOR possui quatro domínios: FAT e o FATC esses domínios se aproximam, expondo sequências funcionais que interagem de forma estável, formando uma estrutura semelhante a um andaime no complexo proteico quando estão dobrados, o FRB é o sítio de ligação do complexo FKBP12-Rapamicina ao mTOR, localizado em proximidade ao sítio de ligação do ATP no domínio quinase e um domínio catalítico (kinase domain - KD), que contém dois lobos, N-terminal e C-terminal (AZEVEDO, 2022; CHEN; ZHOU, 2020).

Os componentes mTORC1 e mTORC2 estão superexpressos e atuam na tumorigênese do CCR. Estudos demonstraram um aumento na expressão de mRNA de mTOR, Raptor e Rictor em estágios avançados de CCR, sugerindo uma associação de mTOR com a progressão e metástase, além disso, os níveis de, Raptor e Rictor também foram significativamente

elevados em CCR (GULHATI; BOWEN; LIU; STEVENS *et al.*, 2011).

Os principais reguladores de atividade de mTOR são PI3K/PTEN/AKT e Ras/Raf/MEK/ERK (figura 4). Na via PI3K/Akt/mTOR, a Akt é regulada por dois supressores de tumor: o PTEN, que antagoniza a PI3K e, portanto, inibe a Akt, e o heterodímero TSC1/TSC2, que inibe o mTOR ao inibir a atividade de Rheb. A Akt ativa o mTOR por meio da fosforilação direta de TSC2 (hamartina-tuberina) e inibindo a AMPK, o que ativa a atividade de Rheb (homólogo Ras enriquecido no cérebro) e mTOR-Raptor. Essa via regula diversos eventos celulares, como crescimento, proliferação, metabolismo, síntese de proteínas e lipídios, e autofagia. Além disso, a ativação anormal da via PI3K/AKT/mTOR é comum em ambientes cancerígenos, inclusive no câncer colorretal. Estudos demonstraram queo tratamento com inibidores de mTORC1 reduziu a carga tumoral em modelos de camundongos com FAP (polipose adenomatosa familiar), mostraram sinalização de mTORC1 pode ser induzida nos pólipos intestinais (DE OLIVEIRA, 2013; HAY, 2005; PROSSOMARITI; PIAZZI; ALQUATI; RICCIARDIELLO, 2020).

O sítio de ATP de mTOR está localizado entre dois lobos e é composto pelos resíduos Leu2185, Lys2187, Asp2195, Tyr2225, Ile2237, Trp2239, Val2240, Cys2243, Asp2244, Thr2245, Met2345, Ile2356 e Phe2358, sendo Val2240 e Trp2239 resíduos cruciais para inibir a atividade do mTOR. Nas células tumorais, o mTOR anormalmente ativado desempenha um papel crucial no estímulo ao crescimento, metástase e invasão de tecidos saudáveis. A via principal de ativação do mTORC1 inclui a homologia PI3K/fosfato e mutações deletérias no gene supressor de tumor do cromossomo 10 (PTEN)/AKT/TSC. Mutação genética nesta via pode resultar em tumores malignos. Ademais, a expressão do PTEN é frequentemente suprimida por modificações epigenéticas, genéticas e pós-transcricionais, promovendo a ativação da via PI3K/Akt/mTOR em muitos tumores malignos. Essa via regula a proliferação e sobrevivência das células-tronco do câncer de cólon (CCSC), contribuindo para a recorrência e metástase no câncer de cólon esporádico. O mTOR é constantemente estimulado nos tumores, mantendo o crescimento, sobrevivência e proliferação das células tumorais, desempenhando um papel fundamental na biologia tumoral (XIE; WANG; PROUD, 2016; ZOU; TAO; LI; ZHU, 2020).

Em condições de nutrientes adequados, o mTOR é ativado, promovendo processos anabólicos como a síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, além de estimular o armazenamento e a utilização eficiente de energia. Por outro lado, em condições de escassez de nutrientes, o mTOR é inibido, o que ajuda a preservar a energia celular e os materiais necessários para a sobrevivência. A regulação anormal da via mTOR está associada a diversas

condições patológicas, incluindo o câncer, em até 70% de todos os tumores humanos. As células tumorais frequentemente apresentam uma demanda aumentada por nutrientes e energia para sustentar seu crescimento descontrolado. Por essa razão, a atividade desregulada do mTOR é observada com frequência em diversos tipos de tumores (XIE; WANG; PROUD, 2016; ZOU; TAO; LI; ZHU, 2020).

Um dos inibidores mais conhecidos da via mTOR é a rapamicina, que recebeu seu nome devido à sua capacidade de se ligar à proteína mTOR. Inicialmente desenvolvida como um imunossupressor para prevenir a rejeição de enxertos, a rapamicina foi posteriormente identificada como um potente inibidor da mTOR. A rapamicina se liga a uma proteína chamada FKBP12, formando um complexo que se une especificamente ao mTORC1, mas não ao mTORC2, inibindo seletivamente algumas das funções do mTORC1. Estudos indicam que a rapamicina afeta principalmente substratos mais fracos do mTORC1, como a proteína ribossômica rpS6 quinase, tendo um efeito limitado sobre outros substratos. Essa especificidade na inibição de alvos do mTORC1 torna a rapamicina uma ferramenta valiosa para estudar a função e a regulação da via mTOR em diferentes contextos fisiológicos e patológicos (ALI; MITRA; AKTER; RAMPROSHAD *et al.*, 2022; XIE; WANG; PROUD, 2016).

2.3.2 PI3K

Um dos alvos cruciais no curso do CCR é a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), uma quinase que faz parte de uma família única e conservada de enzimas, frequentemente desregulada no câncer. A ativação da via de sinalização começa com a ligação de fatores de crescimento, como o IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina), ou RTKs na membrana, ativando PI3K, que fosforila o PIP2 (fosfatidilinositol-3,4-bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) recrutando proteínas com domínio PH, como Akt e Pdk1, à membrana. A ligação ao PIP3 induz uma mudança conformacional na Akt, expondo os resíduos Thr308 e Ser473. Esses resíduos são fosforilados por Pdk1 e mTORC2, ativando completamente a Akt para fosforilar múltiplos substratos (figura 4). Existem oito enzimas PI3K em mamíferos, agrupadas em três classes. As mais relevantes no contexto do câncer são as quatro enzimas da classe I, denominadas PI3K α , PI3K β , PI3K γ e PI3K δ . Estas são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica de 110 kDa (p110 α , p110 β , p110 γ ou p110 δ) e uma subunidade reguladora (DANIELSEN; EIDE; NESBAKKEN; GUREN *et al.*, 2015; MATSUO, 2015).

As PI3Ks da classe I são as mais estudadas e importantes em relação ao câncer. A

ativação da via PI3K/AKT é controlada por quatro tipos principais de sensores; os receptores tirosina quinases (RTKs), que coletam amostras de fatores de crescimento, os receptores acoplados a citocinas e proteínas G, que são ativados por uma ampla gama de ligantes diferentes, e as integrinas, que detectam a adesão célula-célula e célula-matriz após a ligação apropriada, esses sensores, em conjunto com seus cofatores, ativam quinases a jusante na família fosfatidilinositídeo 3-quinase (DANIELSEN; EIDE; NESBAKKEN; GUREN *et al.*, 2015; VARA; CASADO; DE CASTRO; CEJAS *et al.*, 2004; WONG; ENGELMAN; CANTLEY, 2010).

A família PI3Ks desempenham papéis essenciais em muitos processos celulares, incluindo metabolismo, proliferação, diferenciação e sobrevivência e classe PI3K regula múltiplos processos celulares. Uma super ativação da via está frequentemente presente em malignidades humanas e desempenha um papel fundamental na progressão do câncer e consequentemente, sua inibição tornou-se uma abordagem promissora na terapia do câncer. Por isso há uma extensa pesquisa em busca de inibidores de PI3K (VANHAESEBROECK; PERRY; BROWN; ANDRÉ *et al.*, 2021).

As vias PI3K/Akt são consideradas como uma estratégia promissora para a terapia de diversos tipos de câncer. Uma análise tecidual de pólipos colorretais demonstrou que mutações no gene PIK3CA, que codifica a subunidade p110 α , foram encontradas em 6% das lesões não malignas. Isso sugere que essas alterações genéticas podem ser eventos primários na tumorigênese do CCR (DE SOUZA; DÍAZ, 2013; PAPADATOS-PASTOS; RABBIE; ROSS; SARKER, 2015).

A maioria dos inibidores PI3K são competitivos com ATP, a bolsa de ligação ao ATP está em uma fenda entre os dois lóbulos do domínio quinase, com um resíduo de valina na extremidade da fenda. O bolso de ligação do ATP de PI3K está localizado em uma fenda entre os lóbulos N e C-terminal do domínio catalítico da quinase de p110 α , formado pelos resíduos Trp780, Ile-800, Lys802, Asp810, Tyr-836, Ile848, Glu849, Val851, Gln859, Met922, Ile932, Asp933 e Phe-934, porém o resíduo Val851 é o aminoácido chave para a inibição de PI3K α (FAES; DORMOND, 2015; VANHAESEBROECK; PERRY; BROWN; ANDRÉ *et al.*, 2021; ZHAO; ZHANG; CHEN; LU *et al.*, 2014).

O PI-103 é um fármaco recentemente sintetizado que atua como inibidor tanto da mTOR quanto da PI3K, duas proteínas com sítios de ATP semelhantes. Ele pertence à classe piridofuropirimidina, competindo com o ATP, que é essencial para a atividade enzimática das quinases, ligando-se ao bolso de ligação dentro do domínio catalítico. Isso, por sua vez, interrompe a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e afeta diversos processos celulares, como

crescimento, proliferação, sobrevivência e metabolismo (LUO; ZHONG; GUO; ZHANG *et al.*, 2020; PARK; CHAPUIS; BARDET; TAMBURINI *et al.*, 2008).

2.3.3 ERK/MAPK

A quinase regulada por sinal extracelular (ERK) via, também chamada de via da proteína quinase ativada por mitógeno de 42/44 kDa (MAPK) pertence a uma grande família de serina-treonina quinases que desempenham um papel crucial na proliferação celular e apoptose induzida por alguns antiinflamatórios não esteróides. A via Ras/Raf/MEK/ERK regulam o complexo TSC2, sendo que a ativação do Ras leva à fosforilação da TSC2, agindo como um "interruptor" para importantes oncoproteínas. Inicialmente, a molécula Ras é ativada pela ligação de fatores de crescimento, hormônios ou citocinas, e então ativa a cinase Raf, que, por sua vez, fosforila a MEK, que ativa a ERK. A ERK, por fim, fosforila substratos citosólicos e nucleares essenciais para a regulação da expressão gênica, metabolismo e rearranjos do citoesqueleto. As quinases ERK1/2 ativadas fosforilam substratos que regulam a progressão, diferenciação e sobrevivência do ciclo celular. Mutações presentes em Ras e Raf são comuns em diversos tipos de câncer humano, incluindo cólon (figura 4) (DE OLIVEIRA, 2013; FANG; RICHARDSON, 2005; KOHNO; POUYSSEGUR, 2006).

A cascata de sinalização ERK possui efeito antiapoptótico. A cascata ERK ativa a transcrição de várias redes de sinalização proliferativa impulsionadas pelos fatores de transcrição da família FOS, Elk-1, Jun e ETS, bem como Myc. Esses fatores apoiam a proliferação de células cancerígenas, promovendo a entrada no ciclo celular, a angiogênese e a sobrevivência. A ativação elevada da via de sinalização ERK MAPK foi detectada em vários tumores humanos, como câncer de ovário, cólon, mama, tireoide, pâncreas, cérebro e pulmão. A ativação contínua da via de sinalização ERK-MAPK pode promover a transformação de células normais em tumores, enquanto a inibição da via de sinalização ERK-MAPK pode inibir o crescimento do tumor *in vivo*. Além disso, a via de sinalização ERK desempenha um papel em várias etapas do desenvolvimento tumoral, incluindo invasão tumoral e metástase, degradação da matriz extracelular tumoral, angiogênese e migração de células tumorais (KOHNO; POUYSSEGUR, 2006; SUGIURA; SATOH; TAKASAKI, 2021).

ERK1 e ERK2 humanos são cerca de 84% idênticos em sequência e possuem muitas funções em comum. ERK1/2, como quase todas as proteínas quinases, contém extensões N e C-terminais separados por uma fenda catalítica onde o MgATP se liga para a transferência de fosforil no sítio ativo que fornecem especificidade de sinalização. Os lóbulos N contêm cinco

folhas β , bem como uma alça rica em glicina conservada altamente flexível que atua no posicionamento do ATP ligado para clivagem e transferência de fosforil. O lóbulo N possui uma hélice α C sensível à conformação que desempenha um papel crucial na ativação da quinase (AGRAWAL; DILLON; DENNING; PULENDRAN, 2006; BARBOSA; ACEVEDO; MARMORSTEIN, 2021).

Após a alça em glicina que é a parte mais flexível do lóbulo N, ajudando a posicionar os fosfatos β e γ do ATP para catálise, encontra-se uma valina conservada (V81/85 no MEK1/2 e V56/39 no ERK1/2) que interage hidrofobicamente com a adenina do ATP, há um glutamato conservado próximo ao centro da hélice α C (E88/71 em ERK1/2) nas proteínas quinases. No lobo C-terminal, existem quatro folhas β e seis hélices α conservadas. Dentro da cadeia β 3 do lóbulo N, há um motivo Ala-XXX-Lys (resíduos 95–97/99–101 no MEK1/2 e 69–71/52–54 no ERK1/2). Essa lisina da cadeia β 3 forma uma ponte salina importante com um glutamato conservado da hélice α C (resíduo 114/118 no MEK1/2 e 88/71 no ERK1/2), sendo essencial, mas não suficiente, para a ativação da quinase (BARBOSA; ACEVEDO; MARMORSTEIN, 2021; ROSKOSKI JR, 2012).

Nos estágios iniciais do CCR são impulsionados, em parte, por mutações no KRAS e no BRAF, que resultam na ativação da cascata de sinalização ERK1/2, regulando a proliferação celular, metástase, a transição epitelial para mesenquimal (EMT), migração e invasão. Estudos recentes revelam que a ativação de ERK2, desempenha um papel central na metástase hepática em modelos de xenoenxerto de CCR em camundongos e um aumento significativo na fosforilação de ERK2 em relação a ERK1 em tumores primários de cólon humano associados ao desenvolvimento de metástases. A inibição seletiva de ERK é uma abordagem potencial para o tratamento do câncer, no entanto, não há nenhum inibidor seletivo de ERK disponível atualmente. Em muitas células tumorais, a mutação de Ras ou Raf causa a hiperativação de ERK seguida de proliferação celular desregulada, sugerindo que a inibição de ERK representa uma abordagem potencial para o tratamento do câncer (OHORI; KINOSHITA; OKUBO; SATO *et al.*, 2005; UROSEVIC; NEBREDA; GOMIS, 2014).

2.3.4 TNF- α

A inflamação é considerada um fator crucial para a patogênese do câncer e por isso, o polimorfismo dos genes relacionados tem sido objeto de estudo nos últimos anos. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina multifuncional produzida principalmente por macrófagos e células tumorais. Envolvida na inflamação, apoptose, sobrevivência celular e

imunidade, atuando através de dois receptores. Possui massa molecular de 26 kDa, 157 aminoácidos, sendo considerado um homotrímero. Foi originalmente encontrada sendo expressa em macrófagos e atualmente foi descoberta a expressão por uma ampla variedade de células. O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células natural killer (NK). A expressão suprimida é conhecida por uma variedade de outras células, incluindo fibroblastos, células musculares lisas e células tumorais (ROȘU; MIHNEA; ARDELEAN; MOLDOVAN *et al.*, 2022; SETHI; SUNG; AGGARWAL, 2008; VAN HORSSSEN; TEN HAGEN; EGGERMONT, 2006).

O TNF- α faz parte da superfamília de citocinas TNF/TNFR, considerada uma proteína transmembrana do tipo II, podendo atuar como uma proteína integrada à membrana quanto como uma molécula solúvel, interagindo com seus dois receptores específicos: TNFR1 (TNFRSF1A) e TNFR2 (TNFRSF1B). O TNFR1 é expresso na superfície de diversos tipos de células, incluindo células epiteliais tumorais, enquanto o TNFR2 é principalmente encontrado como uma proteína transmembrana em células hematopoiéticas (MERCOGLIANO; BRUNI; ELIZALDE; SCHILLACI, 2020).

Após a ligação do TNF- α , o TNFR1 recruta a proteína adaptadora TRADD para seu domínio de morte citoplasmático, isso resulta na ativação das vias NF- κ B e JNK, após interação de TRADD com RIP-1 e TRAF-2, promovendo a sobrevivência celular. O complexo NF- κ B, que está inativado no citoplasma da célula, se liga à I κ B-quinase (IKK β), que contém IKK- α e IKK- β . A proteína inibitória I κ B- α é fosforilada, ubiquitinada e degradada por proteassomas, liberando NF- κ B para translocar para o núcleo, ativando genes como o Muscle Ring Finger-1 (MuRF-1). Por outro lado, na via de sinalização para sobrevivência, a TRAF2 atrai as proteínas inibidoras da apoptose 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2), que bloqueiam a ativação da caspase 8. A ligação do TRAF2 também inicia uma cascata de fosforilação, levando à ativação dos fatores de transcrição cFos/cJun, por meio da MAPK e JNK. (figura 4) (BARBOSA; CARNEIRO; MARTELLI; TRIGO, 2018; RODRIGUES, 2013).

O TNF- α é codificado por um único gene localizado no cromossomo 6 humano, próximo aos genes do complexo principal de histocompatibilidade. Este gene possui três íntrons e quatro éxons, sendo o último éxon responsável pela maior parte da codificação da proteína, enquanto os primeiros contêm a sequência peptídica líder. O TNF α é sintetizado como uma proteína de membrana tipo II de 26 kDa que forma um homotrímero, conhecida como TNF α transmembrana (tmTNF α). Produzido por células tumorais ou células inflamatórias no microambiente tumoral pode promover a sobrevivência das células tumorais, componente crítico do sistema imunológico, eficaz vigilância, possui papel fundamental para a proliferação

e função de células NK, células T, células B, macrófagos e células dendríticas. No entanto, a desregulação de TNF-alfa tem sido associada a uma ampla variedade de câncer. O papel do TNF-alfa tem sido associado a todas as etapas envolvidas no tumorigênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (SETHI; SUNG; AGGARWAL, 2008).

O TNF- α é encontrado em níveis elevados em tumores sólidos e no soro de pacientes com CCR, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento metastático. A perda da expressão da E-caderina é um ponto crucial na mudança do tumor benigno para o tumor maligno, desempenhando um papel essencial na transição epitelial-mesenquimal. O TNF- α promove essa transição ao diminuir a presença da E-caderina em células de câncer, resultando no aumento da capacidade de movimento, migração e invasão nas células do cólon. Em busca de inibir TNF- α , os anticorpos sintéticos etanercepte, infliximabe e adalimumabe, ligam-se diretamente ao TNF- α , evitando sua associação com o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), porém esses anticorpos podem causar efeitos colaterais graves, como provocar uma resposta autoimune anti-anticorpos ou o enfraquecimento das defesas imunológicas do corpo a infecções oportunistas (ALOTAIBI; LI; GOODERHAM, 2023; CHAN; LEE; YANG; CHE *et al.*, 2010; CRUCERIU; BALDASICI; BALACESCU; BERINDAN-NEAGOE, 2020).

2.3.5 TGF- β

A família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) faz parte de uma família de citocinas de 25 kDa que estão envolvidas no crescimento, diferenciação, apoptose e expressão da matriz celular. Existem três isoformas de TGF- β em mamíferos, nomeadamente TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são membros da superfamília de ligantes secretados, incluindo as activinas, inibinas e proteínas morfogenéticas ósseas. Os ligantes secretados iniciam os sinais a jusante, estimulando os receptores transmembranares e os domínios das serina-treonina quinases citoplasmáticas intrínsecas. O TGF- β interage primeiro com o receptor TGF- β tipo II (TGF- β II) e depois com o receptor TGF- β tipo I (TGF- β I), levando ao arranjo de um complexo receptor heterotetramérico (HALDER; BEAUCHAMP; DATTA, 2005; KUMAR; ATHAVAN; LOGANATHAN; SARAVANAN *et al.*, 2018).

As proteínas da superfamília TGF- β compartilham uma estrutura dimérica, na qual a hélice central de 3-1/2 voltas de um monômero se encaixa contra a superfície côncava formada pelas fitas β do outro monômero. A maioria dos membros da família é estabilizada por uma ligação dissulfeto entre cadeias que conecta os monômeros. TGF- β tipo I e tipo II, são expressas

no epitélio de mamíferos, sendo cada uma codificada por um gene único, a isoforma mais abundante e onipresente é o TGFB1. Após a ligação ao TGF- β , o TGFB2 recruta e fosforila o receptor TGF- β tipo I (TGFB1), o que ativa a atividade da proteína quinase. Possuem uma estrutura semelhante, com pequenos ectodomínios ricos em dissulfeto que adotam uma dobra de toxina de três dedos (~120 resíduos), domínios transmembranares de uma única extensão (~30 resíduos) e domínios citoplasmáticos de serina-treonina quinase (~400 resíduos) (HINCK, 2012).

A sinalização de TGF- β é mediada pela família de proteínas Smad, recentemente identificada. Quando o TGF- β se liga, forma-se um complexo ligante-receptor que ativa o receptor tipo I. Esse receptor, por sua vez, fosforila Smad2 e Smad3. Smad4 forma complexos com Smad2 e Smad3 fosforilados, e juntos acumulam-se no núcleo. Enquanto Smad3 e Smad4 têm atividades de ligação ao DNA, Smad2 não pode se ligar diretamente ao DNA. Geralmente, os Smads são recrutados para promotores responsivos interagindo com parceiros de transcrição (LIU, 2003; MASSAOUS; HATA, 1997).

É relatado que o TGF- β suprime o crescimento de células epiteliais normais e pré-malignas. No entanto, o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas nas células cancerígenas muda a função do TGF- β e contribui para a disseminação de tumores para outras células. As células cancerígenas produzem e secretam TGF- β , o que promove seu potencial invasivo e metastático. Nas células epiteliais normais, o TGF- β atua como um supressor de tumores e regula a proliferação celular, apoptose, diferenciação, senescência, adesão e motilidade (GELDENHUYS; NAKAMURA, 2010; HINCK, 2012; SYED, 2016; XU; PASCHE, 2007).

O TGF- β transita de ser um inibidor do crescimento de células tumorais para se tornar um estimulador de crescimento e invasão durante a progressão do CCR. Embora não se compreenda completamente o mecanismo por trás dessa mudança de efeito do TGF- β , estudos demonstraram que ele aumenta a produção de diversos fatores de crescimento mitogênicos, como TGF- α , FGF e EGF. Além disso, o TGF- β pode ativar vias independentes dos SMAD, como a via Ras/MAPK, JNK e PI3K/AKT (XU; PASCHE, 2007).

Dessa forma, o TGF- β pode estimular a proliferação de células cancerígenas colorretais em conjunto com essas vias oncogênicas e também desempenha um papel importante na regulação da adesão celular, da motilidade e da composição da matriz extracelular, processos esses que estão relacionados à invasão tumoral e à formação de metástases, angiogênese e a imunossupressão. Células de carcinoma de cólon metastático responderam à proliferação induzida por TGF- β , enquanto carcinomas de cólon de sítio primário moderado a bem diferenciado tiveram crescimento inibido por TGF- β . Pacientes com altos níveis de proteína

TGF- β em seus tumores primários de CCR têm maior probabilidade de recorrência da doença em comparação com pacientes cujos tumores apresentavam baixos níveis de TGF- β (LAMPROPOULOS; ZIZI-SERMPETZOGLOU; RIZOS; KOSTAKIS *et al.*, 2012a; b).

2.4 EUPHORBIA TIRUCALLI

Conhecida popularmente no Brasil como aveloz, árvore-do-lápis, cega-olho ou espinho-italiano apresenta-se como arbusto com pequenos caules que apresentam em torno de 2 metros, possui um látex leitoso com propriedades tóxicas e presença de inflorescências especializadas chamada ciátio, sendo de interesse humano desde os tempos antigos por conter um látex utilizado como medicamento tradicional, como agente anti-helmíntico, anti-sifilítico e anti-tumoral (DO NASCIMENTO; PAZ; LIMA, 2020; ERNST; GRACE; SASLIS-LAGOUDAKIS; NILSSON *et al.*, 2015).

Euphorbia tirucalli L., é uma dicotiledônea com uso medicinal documentado em várias partes do mundo. Por exemplo, povos indígenas da África e da Ásia utilizam o látex como purgante e para tratar reumatismo, neuralgia e dor de dente, em Taiwan, os caules são fervidos em água para fazer uma bebida anticâncer. No Brasil, a *E. tirucalli* é utilizada para o tratamento de úlceras, inflamações e verrugas, é facilmente obtida pela quebra do caule e é consumida principalmente por via oral, após dissolução em água, por pessoas com diversos tipos de câncer. Há vários relatos de efeitos antineoplásicos positivos em tumores experimentais ou células humanas. Extratos de *E. tirucalli* de três regiões do Brasil apresentaram atividade antiproliferativa contra leucemia (HL-60), linfoma (células de linfoma de Daudi Burkitt) e células de melanoma B16/F10. Altas diluições de látex de *E. tirucalli* foram eficazes na inibição do crescimento de células de melanoma humano (MV3) e linhas celulares de cólon HCT-116, além de células de câncer de mama humano (MCF7) (CARDIAL; MACIEL; ALMEIDA; CARDOSO *et al.*, 2023; MARTINS; APPEL; COUTINHO; SOARES *et al.*, 2020).

O látex da planta *Euphorbia tirucalli* é considerado tóxico, especialmente ao entrar em contato com a pele e as mucosas, causando irritação e danos, a exposição ocular ao látex é considerada uma emergência médica que pode levar à cegueira sem tratamento adequado. A ingestão do látex é rara e geralmente causa sintomas leves relacionados à irritação da cavidade oral, esôfago e estômago. A toxicidade desse látex ainda não foi completamente compreendida, mas acredita-se que seus efeitos tóxicos sejam mediados pelo pH, por mecanismos pró-inflamatórios e imunomediados, levando à necrose. Estudos mostraram que o látex da *Euphorbia tirucalli* é capaz de diminuir a expressão de proteínas como as ciclinas A, B1 e D1,

assim como a fosforilação da proteína Rb (proteína do retinoblastoma). Essa última regula a expressão da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), enquanto estimula as proteínas p21 e p27, conhecidas por inibir a CDK. Esses resultados sugerem que o látex pode ajudar a modular o ciclo celular, afetando a proliferação celular e, potencialmente, tendo aplicações promissoras no tratamento do câncer, especificamente nas fases S e G2 do ciclo celular (BINCKLEY; ZAHRA, 2021; CARDIAL; MACIEL; ALMEIDA; CARDOSO *et al.*, 2023; WACZUK; PEREIRA; MACHADO; DE OLIVEIRA, 2012).

Figura 5: *Euphorbia tirucalli*.



Fonte: Castro, 2022

2.5 FLAVONOIDES

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos derivados da via dos fenilpropanóides e do acetato, que são precursores de diversos tipos de substâncias, como aminoácidos alifáticos, terpenoides e ácidos graxos, entre outros. Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, e mais de 4200 variedades de flavonoides são conhecidas até agora. Os flavonoides podem ser divididos em 12 subgrupos, incluindo chalconas, estilbenos, auronas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flobafenos, diidroflavonóis, flavonóis, leucoantocianidinas, proantocianidinas e antocianinas, dependendo do grau de oxidação do anel heterocíclico e do número de grupos hidroxila ou metila no anel benzênico.

Além disso, várias modificações, como glicosilação, acilação e outras, assim como a polimerização molecular, resultam em uma grande variedade de compostos flavonoides. Até o momento, mais de 9.000 flavonoides vegetais foram isolados e identificados (DORNAS; OLIVEIRA; DORES; SANTOS *et al.*, 2007; DOS SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Na subclasse dos flavonoides encontra-se a rutina, um heterosídeo glicosilado, que contém a quercetina como precursora e a isoquercetina como molécula intermediária. A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxiflavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana, é um flavonol abundante em uma grande variedade de plantas e alimentos, sendo encontrada em alimentos na forma de glicosilada, ligada covalentemente a uma molécula de açúcar. A isoquercetina, também chamada de quercetina-3-glicosídeo é formado pela união da quercetina com uma molécula de glicose. A semelhança estrutural entre a quercetina, a Q3G e a rutina é evidente, o que resulta em atividades biológicas semelhantes entre os três compostos. A isoquercetina, uma substância complementar na biossíntese da rutina, também se destaca pelo seu potencial de aplicação industrial. A isoquercetina é mais biodisponível pelo organismo do que a quercetina e a rutina em termos de absorção (ARAUJO, 2012; COSTA, 2020; MORAES; JORGE; GONZAGA; DOS SANTOS, 2022).

O kaempferol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona), possui um peso molecular de 286,23 e o ponto de fusão entre 276-278 graus Celsius. Sua aparência é de um pó amarelo puro, translúcido e cristalino, com uma leve solubilidade em água devido às suas propriedades hidrofóbicas derivadas da estrutura de difenilpropano, sendo presente em várias partes de plantas, como folhas, flores e sementes. O composto químico conhecido como kaempferol possui uma estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6), que é comum em diversos flavonoides. A formação desse composto ocorre a partir da combinação de três moléculas de malonil-CoA (C6) com uma molécula de 4-cumaril-CoA (C3-C6) (MELCHIADES, 2019; MORAES; JORGE; GONZAGA; DOS SANTOS, 2022; SILVA, 2021).

Os flavonoides presentes no látex da *Euphorbia tirucalli*, são amplamente utilizados como corantes naturais e para cosmético, apresentam ação antiúlcera, antidepressiva, antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, antidiabética, antiinflamatória, antiangiogênica, antiproliferativa e atividades anticancerígenas, contendo um papel terapêutico nas doenças intestinais nos mecanismos de câncer e apoptose (MAGOZWI; DINALA; MOKWANA; SIWE-NOUNDOU *et al.*, 2021).

2.6 MÉTODOS COMPUTACIONAIS COMO FERRAMENTAS PARA O PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O CADD surgiu como uma alternativa para reduzir o tempo e os custos das operações envolvidas no processamento de fármacos, evitando a interrupção precoce do fármaco durante as avaliações clínicas e a realização de experimentos desnecessários. Além disso, a utilização desses recursos otimiza a pesquisa em busca de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças. Essas ferramentas fornecem resultados preditivos que possibilitam a identificação das características estruturais essenciais das moléculas investigadas, as quais determinam sua atividade biológica, isto é, o farmacóforo. (BAIG; AHMAD; RABBANI; DANISHUDDIN *et al.*, 2018; DOS SANTOS NETO; DA SILVA AGUIAR; DA SILVA NETO; AGUIAR *et al.*, 2024; RIBEIRO, 2018; SHANMUGAM; JEON, 2017).

As ferramentas de CADD são classificadas em duas categorias principais: planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*) e planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*). O LBDD é caracterizado por sua independência em relação ao receptor/enzima, utilizando métodos como QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*), Volsurf (*Volume-Surface Area*) e Meteor, sendo estes últimos os mais comuns. Por outro lado, o SBDD é dependente do receptor/enzima, com o Docking e a Dinâmica Molecular emergindo como os métodos computacionais mais proeminentes para essas análises (BAIG; AHMAD; RABBANI; DANISHUDDIN *et al.*, 2018; LIMA; LIMA; 3, 2021). Essas abordagens computacionais têm revolucionado a descoberta de medicamentos, permitindo a identificação e o desenvolvimento de candidatos a fármacos de forma mais rápida, importante para a economia tanto de tempo quanto de recursos financeiros e eficiente do que os métodos tradicionais (PANIAGO, 2018).

O LBDD utiliza informações sobre as propriedades físicas, químicas, eletrônicas, estéricas e topológicas de compostos com atividade biológica conhecida para aprimorar as moléculas sob uma perspectiva farmacodinâmica. Essa estratégia se destaca em situações em que a estrutura do alvo não é identificada previamente. Para isso, é fundamental compreender as características estruturais e químicas necessárias para a ligação das moléculas ao alvo desejado. O LBDD desenvolve um modelo denominado modelo farmacofórico com base nesse entendimento das moléculas que se ligam ao alvo, utilizando-o para criar novos candidatos a fármacos. Adicionalmente, o LBDD pode estabelecer uma relação quantitativa e preditiva entre a estrutura e a atividade (QSAR) (SHANMUGAM; JEON, 2017; TAVARES, 2022).

A abordagem LBDD é amplamente empregada na área de Química Medicinal e tem sido essencial no desenvolvimento de diversos medicamentos. Esse método apresenta diversas vantagens, como a exigência de menos recursos computacionais e taxas de sucesso superiores no processo de design de fármacos. Contudo, uma de suas limitações é a capacidade limitada de identificar compostos candidatos a medicamentos com estruturas significativamente distintas daquelas já conhecidas. Para contornar essa restrição, o SBDD surge como uma abordagem complementar que se destaca na identificação de compostos candidatos a medicamentos com estruturas únicas, porém similares aos medicamentos já existentes (PEREIRA, 2022; TAGUCHI; TURKI, 2020).

2.6.1. TRIAGEM VIRTUAL POR PADRÃO FARMACOFÓRICO

O conceito de "farmacóforo" foi introduzido por Paul Ehrlich em 1909, é uma técnica que utiliza o alinhamento de estruturas moleculares em 3D para identificar as características essenciais necessárias para que um composto se ligue e ative um alvo biológico. O farmacóforo é descrito como um conjunto de propriedades estéricas e eletrônicas que são essenciais para que o composto interaja de forma ideal com o alvo biológico, influenciando sua resposta de maneira positiva ou negativa. Nesse método, os grupos funcionais responsáveis pelas interações específicas entre o fármaco e o receptor são investigados por meio de alinhamentos no espaço tridimensional. Essa abordagem é fundamental no processo de design de novos fármacos, incluindo todas as principais características envolvidas na interação do ligante com o sítio receptor. Na abordagem baseada em ligantes, o método de superposição de moléculas ativas é utilizado para identificar características químicas essenciais comuns que são necessárias para a bioatividade desses compostos. O farmacóforo, na prática, abrange atributos químicos específicos, como a capacidade de formar ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, propriedades hidrofóbicas, entre outros (BAIG; AHMAD; ROY; ASHRAF *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2022; SILVA, 2012).

Scaffold Hopping, também conhecido como salto de andaime, foi cunhado por Gisbert Schneider e colegas em 1999, cujo os principais objetivos do scaffold hopping na química medicinal são contornar a atual posição de propriedade intelectual, gerar novas séries de leads com melhor seletividade e/ou melhorar as propriedades farmacocinéticas de ativos conhecidos, modificando seus esqueletos químicos, retendo características moleculares essenciais. É uma estratégia de design molecular que consiste na modificação do núcleo de uma molécula bioativa existente para criar uma nova molécula patenteável, visando aprimorar seu potencial.

(ACHARYA; YADAV; NAGPURE; KUMARSAN *et al.*, 2023; BÖHM; FLOHR; STAHL; WU; ZHENG; LIU; LI *et al.*, 2022).

Outra ferramenta importante é o Design DE NOVO que utiliza programas de encaixe para conceber novas estruturas candidatas a fármacos, que se encaixam em um sítio-alvo específico, visando gerar novos compostos com propriedades farmacológicas e físico-químicas desejáveis. Esse processo visa explorar o espaço químico, criando novas moléculas a partir do zero para complementar as bibliotecas químicas já existentes. O termo "de novo" significa "desde o início", indicando a capacidade de gerar novas entidades moleculares sem um modelo prévio. As vantagens do design de medicamentos de novo incluem a exploração de um espaço químico mais amplo, a criação de compostos que representam nova propriedade intelectual, o potencial para terapias novas e aprimoradas, e o desenvolvimento eficiente de candidatos a medicamentos em termos de custo e tempo. (HOQUE; CHATTERJEE; BHATTACHARYA; BISWAS, 2017; MOUCLIS; AFANTITIS; SERRA; FRATELLO *et al.*, 2021; POPOVA; ISAYEV; TROPSHA, 2018; WANG; WANG; SUN; WANG *et al.*, 2022; XIONG; XIONG; CHEN; JIANG *et al.*, 2021).

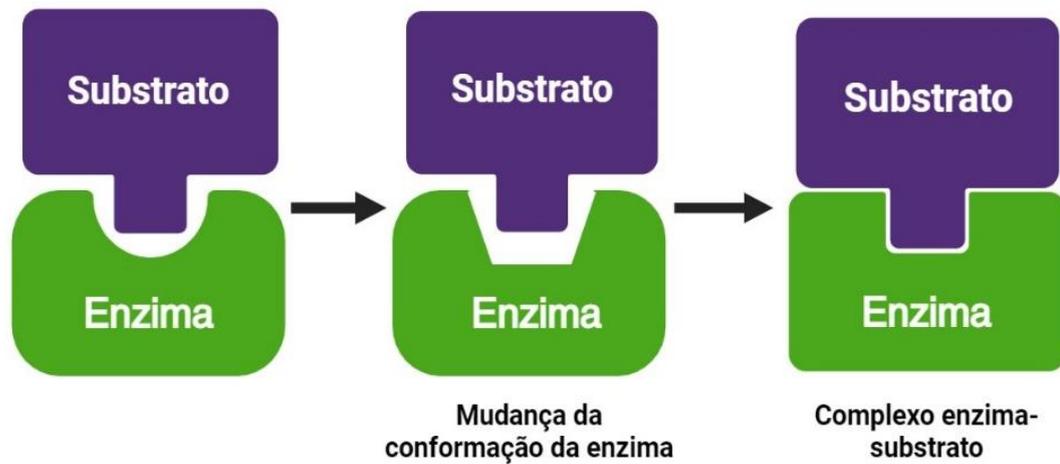
2.6.2. DOCKING MOLECULAR

O encaixe molecular está entre um dos métodos *in silico* baseados em estrutura, que cria um modelo tridimensional de um potencial ligante e o encaixa em uma macromolécula-alvo usando interações calculadas. Desde seu surgimento em 1970, o *docking molecular* tem se destacado como uma ferramenta crucial para compreender a interação entre compostos químicos e seus alvos moleculares, desempenhando um papel fundamental na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos. Seu principal objetivo é prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um receptor de interesse. Esse processo utiliza softwares disponíveis gratuitamente para uso acadêmico e algoritmos que procuram sítios de ligação para encaixar o ligante no espaço 3D definido na macromolécula-alvo, sem a necessidade de experiência em programação de computadores ou comandos digitados (PINZI; RASTELLI, 2019; S SCHWEIKER; L TAUBER; M LEVONIS, 2020).

A acoplamento molecular, simula o encaixe entre duas moléculas, baseando-se na atualização do conceito "chave-fechadura" de Emil Fischer, surgindo o conceito "encaixe induzido". O encaixe induzido sugere que o substrato, ao se ligar à enzima, induz uma mudança conformacional que pode ser transmitida às subunidades vizinhas, influenciando o processo catalítico. Essa teoria também se aplica à interação de inibidores com enzimas ou agonistas e

antagonistas com receptores (figura 6) (SANTOS, 2021; VERLI; BARREIRO, 2005).

Figura 6. Modelo encaixe induzido



Fonte: Autoria própria (2024)

O acoplamento molecular compreende duas etapas essenciais: a amostragem e a avaliação. Durante a amostragem, ocorre uma minuciosa exploração do espaço conformacional das moléculas participantes do processo de acoplamento. A flexibilidade tanto do receptor quanto do ligante contribui para a vastidão desse espaço conformacional, permitindo que cada molécula se ajuste de acordo com a outra. Para restringir essa ampla gama de possibilidades conformacionais, é comum manter o receptor em uma conformação rígida. A avaliação, parte crucial do acoplamento molecular, consiste na análise de cada posição amostrada por meio de uma função de pontuação para determinar sua adequação. Essa pontuação é fundamental para decidir quais conformações serão mantidas durante a amostragem e classificar as posições retidas com base na probabilidade de estarem corretas (ASIAMA; OBIRI; TAMEKLOE; ARMAH *et al.*, 2023; MCNUTT; FRANCOEUR; AGGARWAL; MASUDA *et al.*, 2021).

Ao final do processo de acoplamento, obtemos um conjunto de poses da molécula acoplada, ordenadas de acordo com sua probabilidade de sucesso. O acoplamento molecular desempenha um papel fundamental em programas de descoberta de medicamentos, auxiliando na seleção entre um grande número de pequenas moléculas para identificar possíveis candidatos. Essas previsões não apenas otimizam o tempo e os custos envolvidos, mas também podem fornecer informações sobre os usos tradicionais das plantas medicinais e revelar potenciais novas aplicações (ASIAMA; OBIRI; TAMEKLOE; ARMAH *et al.*, 2023; MCNUTT; FRANCOEUR; AGGARWAL; MASUDA *et al.*, 2021).

Esse método possui como vantagens a exploração de um espaço químico mais amplo, o projeto de compostos que constituem nova propriedade intelectual, o potencial para terapias novas e melhoradas e o desenvolvimento de candidatos a medicamentos de maneira eficiente em termos de custo e tempo (MOUCHLIS; AFANTITIS; SERRA; FRATELLO *et al.*, 2021).

2.6.3 QUIMIOMETRIA APLICADA AOS ESTUDOS QSAR

A Análise (QSAR) do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship*, são modelos matemáticos geralmente quantitativos, relacionando a propriedades estruturais e eletrônicas das moléculas com sua atividade biológica, busca estabelecer modelos baseados em descritores físico-químicos de moléculas com atividade biológica conhecidas e similares. Em QSAR, existem duas abordagens principais para construir modelos matemáticos. Uma delas utiliza o método de regressão linear múltipla (RLM), a segunda abordagem emprega métodos quimiométricos, como a análise de componentes principais. A RLM é sensível à colinearidade entre os descritores, o que pode tornar os coeficientes de regressão instáveis e sem significado em conjuntos de variáveis altamente correlacionadas, ou seja, quando os descritores estão altamente correlacionados, a RLM pode produzir resultados instáveis e pouco confiáveis. Já a Quimiometria emprega métodos matemáticos e estatísticos para analisar e interpretar sistemas químicos complexos descritos por múltiplas variáveis (ALENCAR FILHO, 2012; FERREIRA; MONTANARI; GAUDIO, 2002; PEREIRA, 2014).

Os métodos quimiométricos, como a PCA, são mais robustos nesse aspecto e podem aproveitar a colinearidade para melhorar a modelagem. Esses métodos são especialmente úteis em sistemas complexos com muitos descritores, como o QSAR3D, onde centenas ou milhares de variáveis são geradas. Além disso, os métodos quimiométricos podem auxiliar na seleção de variáveis, sendo vantajosa a combinação de diferentes metodologias (ALENCAR FILHO, 2012; FERREIRA; MONTANARI; GAUDIO, 2002; PEREIRA, 2014).

2.6.4 DINÂMICA MOLECULAR (DM)

A história da Dinâmica Molecular teve início nos anos 1950, quando os primeiros computadores realizaram simulações de sistemas simples com as contribuições inovadoras de Fermi, Pasta e Ulam em 1955, seguidas por Alder e Wainwright em 1957. A dinâmica molecular (DM) evoluiu para se tornar uma ferramenta robusta e amplamente empregada na análise das propriedades termodinâmicas e dinâmicas clássicas de sistemas nas áreas de

química, biologia e ciência dos materiais. Nas últimas décadas, houve um crescimento exponencial dessa técnica, culminando em 2013 com pesquisadores Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel sendo laureados com o Prêmio Nobel de Química. A Simulação de Dinâmica Molecular destaca-se como uma das técnicas computacionais mais versáteis para a investigação de macromoléculas biológicas. No planejamento racional de medicamentos com base na estrutura, as simulações de DM têm desempenhado um papel significativo em várias etapas do processo, a metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e proporciona informações sobre o comportamento dinâmico microscópico dos átomos individuais que compõem o sistema, ao longo do tempo (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; PALMA; PIERDOMINICI SOTTILE, 2023; ZHANG; LIU; YAN; TUCKERMAN *et al.*, 2019).

O estudo da dinâmica molecular em escala atômica desperta grande interesse devido à sua importância no entendimento de diversos fenômenos, tais como a movimentação de domínios, o impacto de pequenas moléculas na estrutura de enzimas, o dobramento de proteínas, a rotação de grupos laterais, a dissociação de complexos, entre outros. Esses processos são comumente explorados por meio de simulações que utilizam campos de força moleculares, compostos por conjuntos de parâmetros e funções de energia potencial empregados para calcular a energia do sistema. É fundamental ressaltar que tais simulações também têm a capacidade de prever como as biomoléculas irão reagir, em nível atômico, a perturbações como mutações, fosforilações, protonações, adições ou remoções de ligantes. Essa abordagem possibilita a simulação de condições experimentais *in vitro* e fornece detalhes conformacionais abrangentes sobre complexos moleculares (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018; SARTORI, 2017)

3. JUSTIFICATIVA

Os casos de tumores diagnosticados estão aumentando a cada ano, tornando-se um problema de saúde pública em todo o mundo. O câncer colorretal é uma das neoplasias malignas mais comuns no ocidente, com cerca de metade dos pacientes morrendo em menos de cinco anos após o tratamento. O tratamento do câncer continua sendo um desafio, apesar dos grandes avanços e das extensas pesquisas, as opções terapêuticas ainda se limitam à cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. É comum a ocorrência de falhas, como a capacidade das células tumorais de desenvolver mecanismos intracelulares de resistência a medicamentos, com uma etiologia multifatorial, além da toxicidade e dos inúmeros efeitos colaterais dos tratamentos, que frequentemente prejudicam a qualidade de vida dos pacientes (COSTA; SILVA, 2017; FANG CHIA, 2002; PEROVANO FILHO; RINHEL; DE OLIVEIRA; DE MELO *et al.*, 2024).

Os estudos *in silico* apresentam como vantagens a rapidez na execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios, trazendo economia de recursos financeiros. Essas abordagens computacionais têm revolucionado a descoberta de medicamentos, permitindo a identificação e o desenvolvimento de candidatos a fármacos mais seguros (DE MACEDO; DE MELO FILHO; ANDRADE, 2013; PANIAGO, 2018).

A quimioterapia, uma das formas de tratameto do câncer , que utiliza drogas que atuam em células, interferindo no seu processo de crescimento e divisão celular, possui diversos efeitos adversos, entre eles, alterações gastrintestinais, hematológicas, náuseas, vômitos e diarreia, além disso esses medicamentos podem causar várias toxicidades, como neurotoxicidade da oxaliplatina, mielossupressão, neuropatias periféricas (CUPERTINO; MARCONDES; GATTI, 2008).

Assim, torna-se imprescindível a descoberta de novos biocompostos para reduzir os efeitos adversos, a resistência a medicamentos e consecutivamente aumentar a expectativa de vida dos pacientes acometidos com CCR, Esse esforço contribui significativamente para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras no combate a essa doença. Avanços nesse campo são essenciais para proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes, bem como para avançar no conhecimento científico e na prática clínica, impulsionando assim a evolução da medicina e da saúde como um todo.

4. HIPÓTESE

As substâncias bioativas presentes nos constituintes do látex de *Euphorbia tirucalli* possuem potencial anticancerígeno, podendo ser utilizadas no tratamento do câncer de colorretal.

5. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

5.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a busca *in silico* de compostos bioativos presentes na espécie *Euphorbia tirucalli* com propriedades anticancerígenas contra o câncer colorretal .

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar proteínas presentes na via de sinalização do câncer colorretal;
2. Selecionar compostos bioativos presentes na *Euphorbia tirucalli* com atividade anticancerígena;
3. Realizar o levantamento bibliográfico da estrutura tridimensional das proteínas selecionadas;
4. Realizar estudos de ancoragem molecular e analisar as principais interações intermoleculares que resultam na formação do complexo proteína-ligante;
5. Construir o design molecular de novos compostos com perfis de propriedades desejáveis
6. Avaliar a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade modelos construídos;

6. METODOLOGIA

6.1 SELEÇÕES DE PROTEÍNAS ALVO

As estruturas co-cristalizadas foram baixadas do Protein Data Bank (PDB) e selecionadas as que possuíam organismos *Homo sapiens*, ausência de mutações e melhores resoluções. Após a avaliação da validação da estrutura no wwPDB (Worldwide Protein Data Bank) presente no PDB e avaliação da qualidade da estrutura do ligante para assegurar a qualidade e a integridade dos dados, as estruturas mTOR (ID:4JT5) e PI3K (ID:4L23) ERK (ID:7AUV), TGF β R1 (ID:5E8S) e TNF- α (ID:2AZ5) foram baixadas em formato PDB para o processo de ancoragem molecular.

6.2 SELEÇÃO DOS LIGANTES E FÁRMACOS DE REFERÊNCIA

A seleção de compostos foi realizada após uma busca em dados como, como PubMed, Scielo e ScienceDirect de compostos presentes na *Euphorbia tirucalli* com atividades antitumorais, comprovadas em estudos *in vitro* e *in vivo* e posteriormente foi construído uma tabela. Foi realizado uma triagem das classes mais documentadas em estudos *in vitro* e *in vivo* em relação ao câncer colorretal, onde foi selecionados os flavonoides para a construção desse trabalho. O download dos flavonoides selecionados foi realizado nos bancos de dados PubChem, Lotus e *DrugBank*. O Kaempferol (PubChem ID: 5280863), Quercetina (PubChem ID: 5280343) e Isoquercetina (PubChem ID: 5280804) e posteriormente foram selecionados fármacos que atuam na inibição do sítio das proteínas alvo, eles serão referência para avaliação de resultados, entre eles, PI-103 (PubChem ID: 9884685) Ulixertinib (PubChem ID: 11719003), Galunisertinib (PubChem ID: 10090485) e SPD304 (PubChem ID: 5327044). Os ligantes e fármacos foram baixados em formato SDF e utilizado o software OpenBabel versão 3.1.1 para conversão para formato PDB.

6.3 CONSTRUÇÃO DO FARMACÓFORO

Para a construção do farmacóforo utilizamos o software MOE (*Molecular Operating Environment*) versão 2015.10, onde primeiramente foi construído uma base de dados com os flavonoides escolhidos e posteriormente foi realizado o alinhamento flexível para detectar o scaffold, que gerou 4 variações, sendo escolhida a 4 devido ao melhor alinhamento. Posteriormente foi realizado a busca por pontos farmacofóricos e apos a detecção dos pontos

de atividades farmacológicas foi realizado a construção da molécula híbrida e adição de grupos funcionais presentes nas moléculas de mesma família, conjugadas à um só ligante.

6.4 OTIMIZAÇÃO DO COMPOSTO

Observou-se que a presença de um grupo de glicose ligado à posição 3 do anel C por meio de uma ligação glicosídica, proveniente da isoquercetina, impactou significativamente as propriedades físico-químicas e interações biológicas com as proteínas-alvo. Então foi realizada uma otimização de leads no software MOE, essa mudança foi crucial para a otimização da molécula Flavo1 e manteve os pontos de atividade farmacológica.

6.5 ANÁLISE DE ADMET

Para análise ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), foi utilizado o *OpenBabel* para conversão das estruturas em *SMILES* e posteriormente os *SMILES* foram adicionados software ADMETlab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>) e para a previsão de propriedades físico-químicas, medidas de química medicinal, pontos finais ADME, pontos finais de toxicidade e regras de toxicoforos, selecionando assim compostos promissores para exploração adicional.

6.6 VALIDAÇÃO DA ANCORAGEM MOLECULAR

Antes da realização da docagem foi preciso realizar uma validação dos protocolos de docking através do chamado processo de re-docking, onde o ligante co-cristalizado presente nas proteínas-alvo do PDB é preparado para reproduzir o encaixe original. A preparação do ligante foi realizada no AutodockTools 1.5.7, onde o ligante original e a proteína foram baixados e preparados. Foi utilizado o GRID com as coordenadas para o sítio original, disponíveis nas opções de download do PDB. Na preparação, as moléculas de água foram removidas e hidrogênios foram adicionados, mesclando os não polares. As cargas de Kollman foram adicionadas e o ligante e a proteína foram salvos no formato PDBQT.

A validação foi feita considerando um critério de $RMSD \leq 2,0 \text{ \AA}$ para as estruturas obtidas. Em seguida, o software *Discovery Studio 2021* foi utilizado para realizar a sobreposição das estruturas original e preparada. Esse processo, chamado superimpose, permite verificar se ambas as estruturas estão com o ligante no mesmo sítio, validando assim a estrutura 3D e os protocolos de docking molecular utilizados.

6.7 ANCORAGEM MOLECULAR

O ligante e as proteínas foram preparadas no *AutoDockTools* versão 1.5.7. A preparação iniciou com a deleção de ligantes presentes na estrutura, das moléculas de água. Em seguida, foram adicionados hidrogênios e mesclados hidrogênios não polares, adicionadas cargas de kollmann e salvo em formato PDBQT. Para o ligante foram definidas e selecionadas as torções e os arquivos foram salvos em formato PDBQT. Posteriormente foram definidos os mapas e o GRID, com as coordenadas para o sítio de ATP, para mTOR ($x = 53.482$, $y = 0.810$ e $z = -46.680$), para PI3K ($x = 27.050$, $y = 46.100$ e $z = 41.068$), ERK ($x = 5.205$, $y = 8.029$ e $z = 45.093$), TGF β R1 ($x = 4.085$, $y = 6.757$ e $z = 3.822$). O tamanho foi definido para as coordenadas x , y e z ($50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$) com os pontos com espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$, já para TNF- α no sítio de ligação do receptor com as coordenadas ($x = -19.819$, $y = 74.409$ e $z = 38.240$) seu tamanho foi definido para as coordenadas x , y e z ($60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$) com os pontos com espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$. Foi realizado a preparação do arquivo GPF e o início da corrida para a geração do arquivo DLG, posteriormente foram definidos os algoritmos para o docking e o arquivo DPF, onde foi realizada a corrida e geração do arquivo DLG.

6.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores de energia resultantes da interação entre o ligante e o alvo foram calculados, e em seguida, os complexos resultantes foram submetidos a uma análise visual por meio do software *Discovery Studio 2021*, uma ferramenta de simulação e modelagem molecular, especializada no estudo de sistemas biológicos, possibilitando a exploração das estruturas e funções das biomoléculas. Isso permite a criação e visualização das interações, culminando na produção de um diagrama 2D ilustrativo com todos os resíduos que interagiram com o ligante e as regiões aceptoras e doadoras de hidrogênio.

O GraphPad foi utilizado para criar o *Heat Map*, que é uma técnica bidimensional de visualização de dados que usa cores para representar a magnitude de valores individuais em um conjunto de dados. Ele foi utilizado para avaliar as energias de ligações a partir da ancoragem molecular.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 SELEÇÕES DE PROTEÍNAS ALVO

Os receptores desempenham um papel crucial no reconhecimento de moléculas-sinal, que podem estar expostas tanto na superfície celular quanto no interior das células. Após a ligação com as moléculas-sinal, esses receptores transmitem informações para outras proteínas no interior da célula, em um processo conhecido como transdução de sinal. Esse mecanismo pode desencadear respostas, como a alteração da função de uma proteína ou a modificação da expressão gênica. Essas modificações são responsáveis por alterações no comportamento da célula. Dentre as moléculas sinal, podemos encontrar citocinas, quimiocinas, íons, fatores de crescimento e hormônios, onde as vias de sinalização reguladas por essas moléculas podem desencadear um fenótipo específico que pode contribuir para o processo tumorigênico (DE SOUZA; DÍAZ, 2013; SOUZA; ARAÚJO; DE-FREITAS-JUNIOR; MORGADO-DÍAZ, 2014).

Foi criada uma tabela contendo cerca de 63 proteínas importantes na via de sinalização do câncer colorretal. Dentre essas proteínas, foram selecionadas 5 proteínas-alvo relacionadas à progressão desse tipo de câncer, cujos sítios de ligação estão bem elucidados, entre elas (tabela1), mTOR, PI3K, ERK, TGF- β e TNF- α e foi realizado um levantamento bibliográfico sobre as estruturas tridimensionais e a funcionalidade de cada proteína na progressão do câncer.

Tabela 1: Proteínas-alvo relacionadas à progressão do CCR. mTOR, PI3K, ERK, TGF- β e TNF- α , proteínas relacionadas com o processo tumorigênico.

PROTEÍNA ALVO	FUNÇÃO	FONTE
mTOR	Coordena o metabolismo celular, o crescimento e a sobrevivência	(AZEVEDO, 2022)
PI3K	Regula a sobrevivência, o crescimento celular, a diferenciação, o metabolismo celular e a reorganização do citoesqueleto.	(NOOROLYAI; SHAJARI; BAGHBANI; SADREDDINI <i>et al.</i> , 2019)
ERK	Proliferação celular, diferenciação celular, sobrevivência celular e motilidade celular.	(SAMATAR; POULIKAKOS, 2014)
TGF-βRI	Controle da proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, invasão e microambiente celular.	(MEULMEESTER; TEN DIJKE, 2011)
TNF-α	Transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase	(SETHI; SUNG; AGGARWAL, 2008)

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina treonina

considerada um marcador específico para progressão tumoral. mTORC1 e mTORC2 estão intimamente ligados às vias de sinalização que levam ao câncer. O mTORC1 impulsiona a tumorigênese aumentando a tradução de oncogenes, promovendo o anabolismo e a angiogênese e suprimindo a autofagia. mTORC2 ativa Akt e outras quinases da família AGC que promovem a proliferação e sobrevivência celular. A ativação aberrante da via mTOR, seja por estimulação oncogênica ou perda de supressores tumorais, contribui para o crescimento do tumor, angiogênese e metástase, mesmo em condições de falta de nutrientes (PÓPULO; LOPES; SOARES, 2012; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011).

A estrutura mTOR Δ N –mLST8 (4JT5) possui um formato compacto. O domínio FAT, que consiste em repetições α – α -helicoidais, forma um solenoide α em forma de 'C' que envolve metade do domínio quinase e se fixa nele. mLST8 e o domínio FRB sobressaem do domínio quinase, em lados opostos da fenda catalítica. O domínio FATC é parte integrante da estrutura do domínio quinase. O domínio mTOR quinase de ~ 550 resíduos adota a estrutura de dois lóbulos que é característica tanto da família PI3K quanto da proteína quinase canônica. Consiste em um lobo N-terminal (lobo N), um lobo C-terminal maior (lobo C) e uma fenda entre os dois que se liga ao ATP, composto pelos resíduos Leu2185, Lys2187, Asp2195, Tyr2225, Ile2237, Trp2239, Val2240, Cys2243, Asp2244, Thr2245, Met2345, Ile2356 e Phe2358, sendo a Val2240 e Trp2239, resíduos cruciais para inibir a atividade do mTOR. O domínio mTOR quinase contém a dobra central do domínio quinase PI3K, mas com diferenças substanciais. Enquanto as estruturas do domínio PI3K quinase se sobrepõem essencialmente em todos os seus ~ 350 resíduos, apenas ~ 250 resíduos do domínio mTOR quinase se sobrepõem aos PI3Ks. Além disso, o domínio mTOR quinase contém cerca de 200 resíduos adicionais de inserções que decoram a dobra comum. O maior deles é o domínio FRB (resíduos 2021–2118), que está inserido no lóbulo N da quinase. Há também uma inserção de 40 resíduos no lobo C que forma o sítio de ligação para mLST8 (resíduos 2258-2296) (PARATE; KUMAR; LEE; RAMPOGU *et al.*, 2021; YANG; RUDGE; KOOS; VAIDIALINGAM *et al.*, 2013).

Estruturas Cristalinas de PI3K α Complexadas com PI103 contém todos os cinco domínios p110 α , uma ligação ao adaptador amino-terminal domínio (ABD), resíduos 1 a 108; um domínio de ligação Ras (RBD), resíduos 190 a 291; a C2 (homologia proteína-quinase-C-2) domínio, resíduos 330 a 480; um domínio helicoidal, resíduos 525 a 696; e um domínio quinase carboxil-terminal, resíduos 697 a 1068), bem como o nSH2 (resíduos 318 a 430) e iSH2(resíduos 431 a 615) domínios de p85 α A estrutura cristalina da apo p110 α revelou que a bolsa de ligação ao ATP está localizada em uma fenda entre os lóbulos N e C terminais do domínio catalítico da quinase da p110 α , semelhante aos locais de ligação de ATP em outras

proteínas quinases, com muitas das interações enzima/ATP envolvendo resíduos em a região de ligação entre os dois lóbulos. O sítio de ATP é formado pelos resíduos Trp780, Ile-800, Lys802, Asp810, Tyr-836, Ile848, Glu849, Val851, Gln859, Met922, Ile932, Asp933 e Phe-934, porém o resíduo Val851 é o aminoácido chave para a inibição de PI3K α (REHAN; BAJOUH, 2019; ZHAO; ZHANG; CHEN; LU *et al.*, 2014).

ERK2 é frequentemente expresso em níveis mais altos do que ERK1. A ERK é uma proteína quinase serina/treonina dirigida por prolina, responsável pela fosforilação de resíduos de serina ou treonina em substratos que contenham a sequência-alvo Ser/Thr. O sítio de ligação do ATP na ERK (Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular) está localizado no domínio quinase da enzima, onde ocorre a transferência de grupos fosfatos do ATP para os substratos da ERK. Esse sítio é uma região específica dentro do domínio quinase, onde ocorre a interação entre o ATP e a ERK. Os resíduos presentes nesse sítio são Lys54, Gln105, Asp106, Lys114, Ala52, Ile31, Leu156, Asp167, Val39 e Met108, sendo Met108 um resíduo chave na região chamada de "dobradiça", onde a adenina do ATP se liga à ERK2. Essa interação é crucial para fornecer a energia necessária para a atividade catalítica da enzima. Além do sítio de ligação do ATP, a ERK possui outros sítios importantes, como o sítio de ligação dos substratos, onde ocorre a fosforilação das proteínas-alvo. A ligação do ATP no sítio apropriado é um passo essencial para a atividade da ERK, mas é apenas uma parte do processo completo de sinalização e fosforilação (JONNALAGADDA; AROCKIASAMY; VETRIVEL; PA, 2021; MUNCK; BERDINI; BEVAN; BROTHWOOD *et al.*, 2021; YAO; XUE; MA; BAI *et al.*, 2023).

A proteína TNF- α humana é composta por 233 aminoácidos, com um peso molecular esperado de 25,6 kDa. Inicialmente, o TNF- α é produzido em uma estrutura associada à membrana. Posteriormente, é submetido à remoção de 76 aminoácidos do terminal N por meio de uma reação enzimática realizada pela enzima conversora de TNF- α , conhecida como TACE/ADAM17, uma desintegrina de metaloprotease que atua clivando diversas proteínas de membrana, liberando assim, seus domínios extracelulares das células, após a clivação ocorre a formação de um homotrímero que gera a dispersível molécula de TNF- α de 17kDa. TNF- α é uma proteína trimérica, mas apenas duas de suas subunidades contribuem para a formação do sítio de ligação do receptor. A superfície de ligação do receptor é composta por dezesseis resíduos de contato, incluindo seis resíduos de tirosina, nove desses resíduos estão presentes na cadeia A e sete estão localizados na cadeia B. Esses resíduos são alvos potenciais para a ligação do ligante, como Leu57(A/B), Tyr59(A/B), Ser60(A/B), Gln61(A), Tyr119(A/B), Leu120(A/B), Gly121(A/B), Gly122(A), Tyr151(A/B). Tyr119 é possui grande importância devido a sua localização, próximo ao triplo eixo de simetria do trímero TNF-a e em fazendo

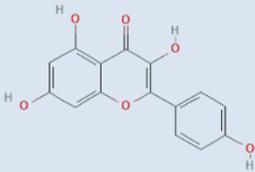
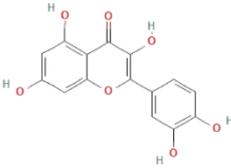
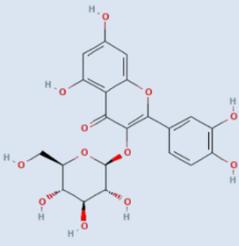
contato com seus homólogos de outras subunidades monoméricas (DOEDENS; MAHIMKAR; BLACK, 2003; GUPTA; GREWAL; DESWAL; SINGH *et al.*, 2023; HE; SMITH; OSLOB; FLANAGAN *et al.*, 2005).

A expressão do TGF- β está associada à progressão dos cânceres colorretais. Em um estudo, descobriu-se que os níveis plasmáticos de TGF- β 1 eram elevados antes da ressecção do câncer colorretal, diminuíram após a cirurgia e se correlacionavam com a presença de TGF- β 1 no tumor e com o estágio do tumor. O TGF β RI (receptor tipo I do fator de crescimento transformador beta) possui um domínio extracelular N-terminal rico em cisteína, responsável pela ligação do ligante; uma única hélice transmembrana; e um domínio de quinase citoplasmática C-terminal e um segmento regulador em sua região justamembranar citoplasmática conhecido como domínio GS, nomeado devido à sequência conservada TTSGSGSGLP no seu centro. A região central do domínio catalítico TGF β RI (resíduos 205-500), possui um lóbulo N menor e está envolvido na ligação do ATP, enquanto o lóbulo C maior é crucial para o reconhecimento do substrato. O lóbulo N é caracterizado por uma folha β torcida de cinco filamentos, enquanto o lóbulo C é predominantemente helicoidal. A região GS-N terminal, forma um segmento hélice-alça-hélice que se encaixa firmemente na superfície externa da folha β do lóbulo N. Os receptores do tipo I apresentam uma inserção entre as cadeias β 4 e β 5 (a alça L45) que determina a especificidade do substrato Smad. Os resíduos do sítio de ligação obtidos foram Ala-230, Ala-350, Asp-351, Gly-286, His-283, Ile-211, Leu-260, Leu-278, Leu-340, Lys-232, Ser-287, Ser-280, Tyr-282, Val-219 e Val-231, sendo a His-283 é um resíduo chave (EBRAHIMI; KHAYAMIAN; GHARAGHANI, 2012; HUSE; CHEN; MASSAGUÉ; KURIYAN, 1999; REISS, 1999).

7.2 SELEÇÕES DOS LIGANTES E FÁRMACOS DE REFERÊNCIA

Foi criado uma tabela com os compostos bioativos presentes no látex da *Euphorbia tirucalli*, juntamente com suas atividades anticancerígenas, conforme evidenciado por estudos *in silico* e *in vivo*. Dentre os compostos identificados, a classe dos flavonoides foi selecionada devido à sua significativa contribuição para os efeitos anticâncer. Sendo assim, selecionado 3 flavonoides para o estudo, kaempferol, quercetina e isoquercetina, pois possuem atividade anticancerígena evidenciadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (tabela 2).

Tabela 2: Flavonoides presentes no látex da *Euphorbia tirucalli*. Kaempferol, quercetina e isoquercetina, CID PubChem e suas relativas funções no processo anticancerígeno.

LIGANTES	SMILES	CID PubChem	Estrutura 2D	FUNÇÃO	FONTE
Kaempferol	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(C=C3O)O)O)O)O</chem>	5280863		Antioxidantes e anticancerígeno.	(AZEVEDO, 2022; MAGOZWI; DINALA; MOKWANA; SIWE-NOUNDOU <i>et al.</i> , 2021)
Quercetina	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(C=C3O)O)O)O)O)O)O</chem>	5280343		Antioxidante, parada do ciclo celular, apoptótico, inibição de metástase, regulação de vias de sinalização e angiogênese	(MAGOZWI; DINALA; MOKWANA; SIWE-NOUNDOU <i>et al.</i> , 2021)
Isoquercetina	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(C=C3O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O)O)O</chem>	5280804		Inibidor da angiogênese no câncer colorretal.	(ORFALI; SILVA; MARCHESI; ASSUNÇÃO <i>et al.</i> , 2018)

Estudos sugerem que os flavonoides possuem a capacidade de inibir a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a proliferação de células cancerígenas e angiogênese. Entre eles, o kaempferol se destaca como um dos flavonoides mais comuns, geralmente encontrado na forma de glicosídeo, sendo uma tetrahidroxiflavona, caracterizada pela presença de grupos hidroxila nas posições 3, 5, 7 e 4', conferindo-lhe uma cor amarela. Estudos demonstraram que o kaempferol e seus derivados glicosilados possuem diversas propriedades benéficas à saúde, tais como atividades cardioprotetoras, neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antidiabéticas, antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais. Esses compostos atuam em diferentes mecanismos de regulação das células cancerígenas, sendo capazes de promover a apoptose e modular diversas vias de sinalização celular. O kaempferol demonstrou ser muito menos tóxico para as células normais quando comparado aos medicamentos quimioterápicos tradicionais, tornando assim, um candidato promissor para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer (CHEN; CHEN, 2013; IMRAN; SALEHI; SHARIFIRAD; ASLAM GONDAL *et al.*, 2019).

A quercetina é um flavonoide com alto potencial em estudos oncológicos devido aos

seus efeitos quimiopreventivos evidenciados em modelos *in vitro* e *in vivo*. Esses efeitos são bifásicos e dependentes da dose: em concentrações baixas, atua como antioxidante, resultando em efeitos quimiopreventivos; em concentrações altas, funciona como pró-oxidante, podendo ter efeitos quimioterápicos. Os efeitos anticâncer da quercetina baseiam-se em sua capacidade de reduzir a proliferação celular, induzir apoptose, causar parada do ciclo celular e inibir processos mitóticos, modulando vias moleculares como as ciclinas, vias pró-apotóticas, PI3K/Akt e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, a quercetina regula o interage com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminui a resistência às drogas, tornando-se um potente composto antitumoral (BEHLING; SENDÃO; FRANCESCATO; ANTUNES *et al.*, 2008).

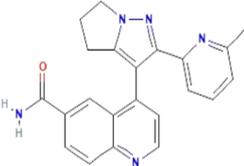
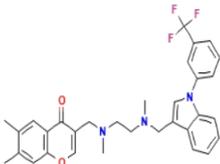
Isoquercetina (IQ), também conhecida como hirsutrina, isoquercetrina, quercetina-3-glicosídeo (Q3G) ou quercetina-3-O- β -D-glicosídeo, é um glicosídeo de quercetina presente naturalmente. Além disso, a isoquercetina atua como antioxidante e modulador imunológico, aumentando as respostas celulares antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos demonstraram que a isoquercetina exerce efeitos antiproliferativos *in vitro* em células (SW480, DLD-1 e HCT116). Foi comprovado que a isoquercetina pode inibir o câncer de bexiga, além disso, evidências sugerem que ela possui efeitos antiproliferativos mais potentes do que outros flavonoides, especialmente em cânceres de cólon, mama e hepatocelular (DA SILVA; ORFALI; SANTANA; PALMA *et al.*, 2022; DI CAMILLO ORFALI; DUARTE; BONADIO; MARTINEZ *et al.*, 2016; RAN; WANG; ZHANG; MA *et al.*, 2016; WANG; SHI; TANG; ZHANG *et al.*, 2017).

Para seguir como referência, foram selecionados fármacos que possuem como função a inibição das proteínas alvos selecionadas. Esses fármacos são importantes ferramentas para auxiliar na pesquisa e no desenvolvimento de novos compostos contra o câncer, pois sua capacidade de interrupção de vias de sinalização celular envolvidas na proliferação e sobrevivência das células tumorais podem fornecer informações valiosas para a identificação de novos alvos terapêuticos. (tabela3).

PI-103 é um inibidor potente, permeável, seletivo e competitivo por ATP de membros das fosfatidilinosítídeo 3-quinases de classe I, além de mTOR e DNA-PK. O PI-103 demonstrou eficácia na inibição da proliferação de células cancerígenas humanas, com efeitos consistentes com a inibição do alvo, conforme evidenciado por biomarcadores farmacodinâmicos. Em estudos com xenoenxertos de tumores humanos, o PI-103 exibiu atividade terapêutica, inibindo a angiogênese, invasão e metástase, além de apresentar efeitos antiproliferativos diretos. Em estudos com xenoenxertos de glioma, o PI-103 demonstrou alta

eficácia e baixa toxicidade celular (MAURYA; VINAYAK, 2016; RAYNAUD; ECCLES; PATEL; ALIX *et al.*, 2009; ZOU; ZHANG; WANG; SHEN *et al.*, 2009).

Tabela 3: Fármacos inibidores das proteínas-alvo.

FÁRMACO	CID PubChem	ESTRUTURA 2D	MECANISMO DE AÇÃO	FONTE
PI-103	9884685		PI-103 é um inibidor potente, permeável, seletivo e competitivo por ATP de membros das fosfatidilinosítido 3-quinases de classe I, além de mTOR	(PARK; CHAPUIS; BARDET; TAMBURINI <i>et al.</i> , 2008)
Galunisertinibe	10090485		Inibidor seletivo mimético de ATP da ativação do receptor TGF- β	(SEROVA; TIJERAS-RABALLAND; DOS SANTOS; ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2015)
Ulixertinibe	11719003		Inibidor de ERK1/2, reversível e competitivo com ATP, com alta potência e seletividade para ERK1/2	(GERMANN; FUREY; MARKLAND; HOOVER <i>et al.</i> , 2017)
SPD304	5327044		Antagonista do fator de necrose tumoral alfa (TNF) que promove a dissociação dos trimeros do TNF e, portanto, bloqueia a interação do TNF e seu receptor.	(ALEXIOU; PAPAKYRIAKOU; NTOUGKOS; PAPANEOPHYTO U <i>et al.</i> , 2014)

Galunisertib pertence à classe dos diidropirrolpirazóis e foi sintetizado em uma abordagem convergente de quatro etapas para gerar um composto químico com a fórmula 4-[2-(6-metilpiridin-2-il)-5,6-di-hidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol-3-il]quinolina-6-carboxamida monohidratada. Trata-se de um inibidor oral de pequenas moléculas (SMI) do receptor quinase TGF β I (TGF β RI), que regula negativamente a fosforilação de SMAD2, anulando a ativação da via canônica. Ao se ligar ao local de ligação ao ATP do TGF β RI, o galunisertib bloqueia a sinalização através de todos os três ligantes do TGF β . O galunisertib possui a capacidade de inibir funções intrínsecas e extrínsecas de células tumorais dependentes de TGF β *in vitro* e *in vivo*, além de inibir o crescimento de células tumorais em modelos de camundongos tumorais

estabelecidos (HOLMGAARD; SCHAER; LI; CASTANEDA *et al.*, 2018; SEROVA; TIJERAS-RABALLAND; DOS SANTOS; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; YINGLING; MCMILLEN; YAN; HUANG *et al.*, 2018).

O ulixertinibe (BVD-523) destaca-se como um inibidor catalítico altamente potente, seletivo, reversível e competitivo para a proteína quinase ERK1/2, essencial nas vias de sinalização celular. Sua eficácia foi comprovada na redução do crescimento tumoral e na indução de regressão em modelos de xenoenxerto mutantes BRAF e RAS, ampliando suas aplicações terapêuticas. Além disso, o ulixertinibe demonstrou sua eficácia em modelos de xenoenxerto humano que apresentavam resistência cruzada a inibidores tanto de BRAF quanto de MEK, ressaltando sua capacidade única de superar mecanismos de resistência complexos em cânceres avançados. Este composto representou um marco significativo ao ser o primeiro inibidor de quinase ERK1/2 de molécula pequena a avançar para estágios clínicos, sinalizando um avanço promissor no tratamento de tumores dependentes de vias de sinalização específicas (MIAO; TIAN, 2020; SULLIVAN; INFANTE; JANKU; WONG *et al.*, 2018).

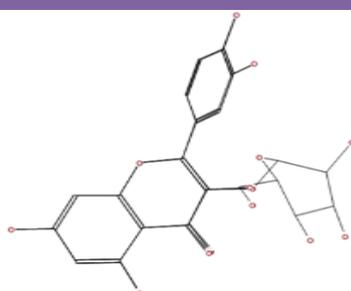
Atualmente, poucas moléculas são conhecidas como inibidores diretos de TNF α . O SPD304, ou 6,7-dimetil-3-[[metil[2-[metil[[1-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-indol-3-il]metil]amino]etil]amino]metil]-dicloridrato de 4H-1-benzopirran-4-ona, é amplamente considerado uma molécula de referência nesse contexto, presente em quase todas as publicações que descrevem inibidores diretamente de TNF α . O SPD304 é reconhecido pelo seu mecanismo bem documentado, que o estabelece como uma pequena molécula de referência para inibir a atividade do TNF α , que promove a dissociação dos trímeros do TNF, bloqueando assim, a interação do TNF e seu receptor. Entretanto, a presença da porção indol-3 na estrutura do SPD304 deixa o composto metabolicamente instável. Esta instabilidade metabólica aliada a uma questão de baixa solubilidade cinética. Até o momento, nenhum dos inibidores de TNF- α mostrou atividade eficiente e baixa toxicidade, reforçando a importância de novas pesquisas para inibidores mais eficientes (AGARWAL; REHMAN; CHAUDHARY; KAUSHIK *et al.*, 2024; ATTIA; MASCRET; ZERROUKI; FOURATI *et al.*, 2021).

7.3 CONSTRUÇÃO DO FARMACÓFORO

Para identificar características estruturais semelhantes, as moléculas selecionadas foram sobrepostas utilizando a ferramenta "*Flexible Alignments*" do programa *Molecular Operating Environment* (MOE). O alinhamento flexível dos flavonoides kaempferol, quercetina e isoquercetina resultou na criação de quatro modelos, dos quais o modelo 4 foi selecionado devido à melhor sobreposição desses compostos. Esse processo de alinhamento gerou diferentes

termos de pontuações: U representa a energia de deformação das moléculas durante o alinhamento. F é uma medida de similaridade, onde valores mais negativos indicam maior similaridade, ou seja, um melhor alinhamento de características como doadores de hidrogênio, aceitadores de ligações de hidrogênio e grupos hidrofóbicos. S é a pontuação final do alinhamento, que é a soma dos parâmetros U e F. Seu objetivo é minimizar a tensão de energia do ligante para aumentar a similaridade. Quanto mais negativo o valor, melhor o alinhamento (tabela 4).

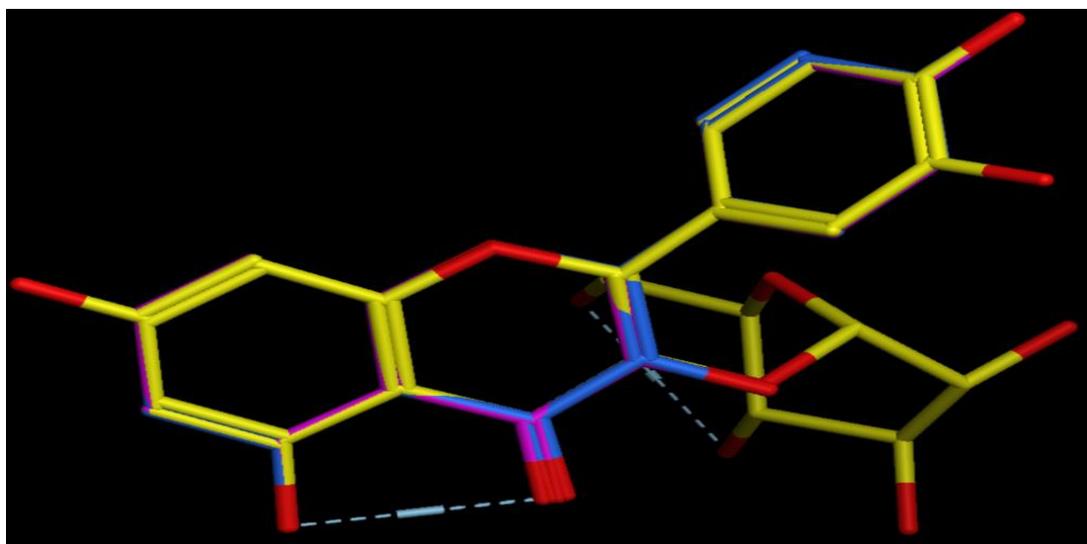
Tabela 4. Termos de pontuações do alinhamento flexível.

Mol	U	F	S
	44.5611	-228.8328	-184.2717

U: Energia de deformação das moléculas durante o alinhamento, F: É uma medida de similaridade, S: é a pontuação final do alinhamento, que é a soma dos parâmetros U e F.

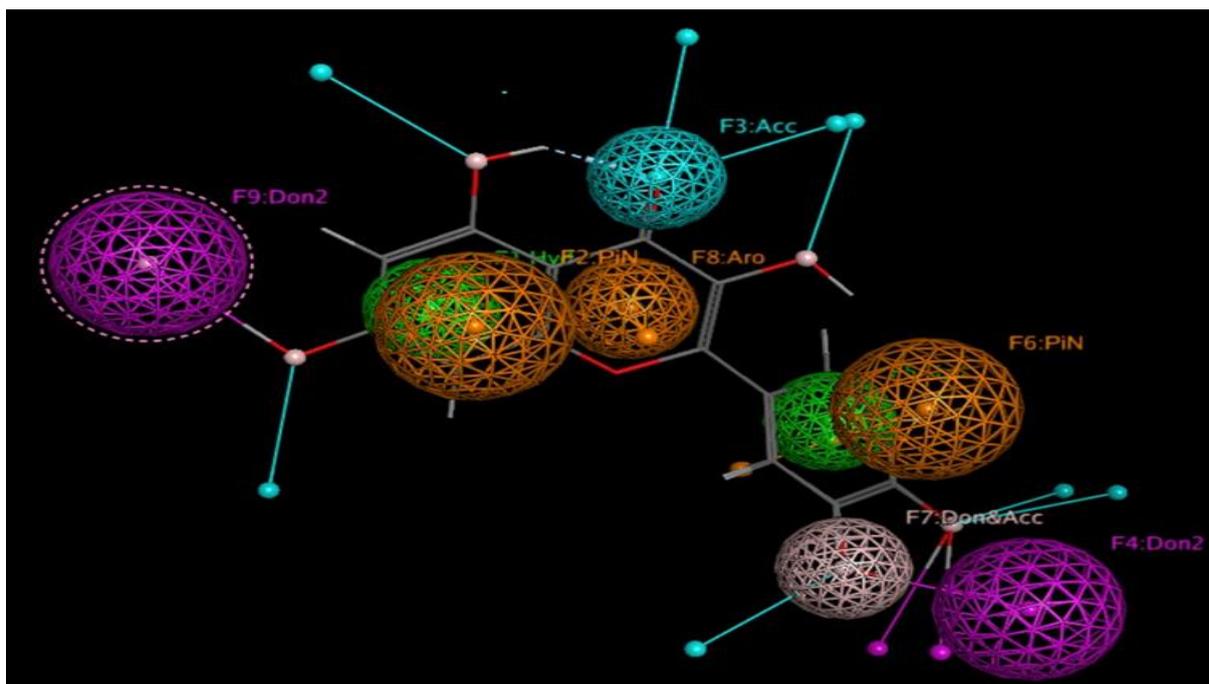
O alinhamento flexível modelo 4, obtido pelo programa MOE, utilizando as moléculas de isoquercetina (amarelo), quercetina (azul) e kaempferol (rosa), revelou que os três compostos compartilham diversas características estruturais e geometria molecular semelhantes (figura 7)

Figura 7. Alinhamento flexível com melhor pontuação. Isoquercetina (amarelo), quercetina (azul) e kaempferol (rosa).

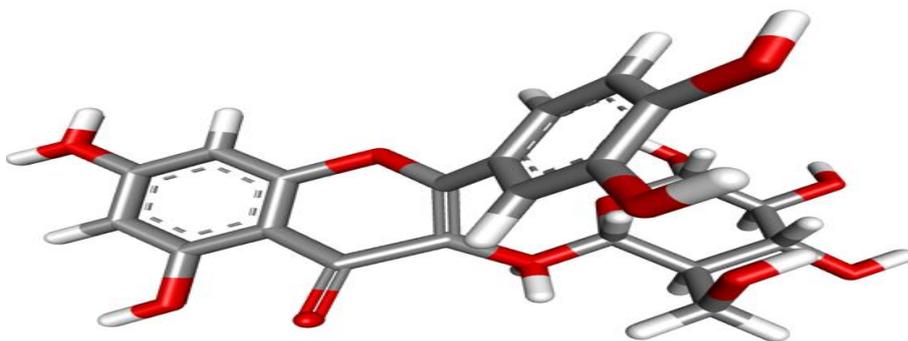


Após o processo de alinhamento flexível foi avaliado os pontos farmacofóricos, ou seja, a região responsável pela atividade farmacológica dos flavonoides. Onde os pontos do farmacóforo identificados nas moléculas 3D foram destacados com círculos de cores específicas para cada característica do farmacóforo, foi encontrado regiões aceptoras de ligação de hidrogênio (ACC), doador/aceitador de ligação de hidrogênio (Don&Acc), doador de ligação de hidrogênio (Don) predizem a potencia do inibidor, portanto, estão relacionadas ao reconhecimento a presença destes requisitos é fundamental para o reconhecimento de moléculas potente. Em verde características hidrofóbicas (HYD) relacionada ao reconhecimento pelo alvo, o centro de anel Pi (Pir), Projeção plana do mencionado (PIN) e o anel farmacofóro aromático (ARO), que contribui para o aumento da afinidade. (figura 8) (MASCARENHAS, 2018; NETO, 2017).

Figura 8. Modelagem de farmacóforo baseada nos flavonoides. Kaempferol, quercetina e isoquercetina para projetar novos inibidores do CCR.



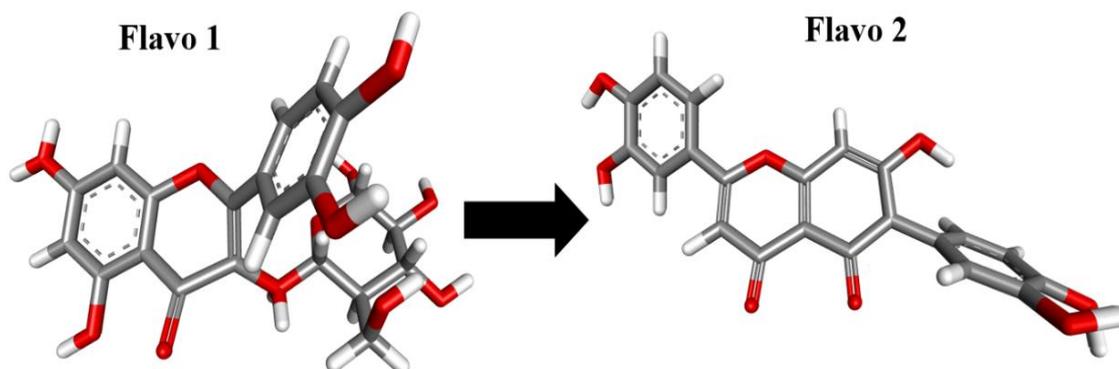
Após a identificação dos pontos farmacofóricos, utilizando a ferramenta *Builder* no MOE, procedemos com o desenho da estrutura única, mantendo as características presentes nos compostos flavonoides selecionados. Essa abordagem resultou na criação da molécula denominada Flavo1. Este processo envolveu a análise das propriedades estruturais e funcionais dos flavonoides, garantindo que a Flavo1 retivesse os elementos essenciais para sua potencial atividade biológica. (figura 9).

Figura 9. Estrutura Flavo 1

7.4 OTIMIZAÇÃO DO COMPOSTO

Durante a análise ADMET onde as propriedades físico-químicas, de distribuição, absorção, metabolismo, excreção e toxicidade não foram avaliadas pelo software ADMETlab 3.0 e posterior realização do docking molecular, a energia de ligação do docking estava significativamente alta, indicando que estava fora dos parâmetros aceitáveis para interações ligante-receptor ideais. Esse resultado sugeriu a necessidade de ajustes na molécula Flavo1 para melhorar sua capacidade de se ligar ao alvo biológico de interesse.

Observou-se que a presença de um grupo de glicose ligado à posição 3 do anel C por meio de uma ligação glicosídica, proveniente da isoquercetina, impactou negativamente as propriedades físico-químicas e interações biológicas. Por esse motivo, foi realizada a otimização da molécula Flavo1 no grupo de glicose, mantendo os pontos de atividade farmacológica, com o objetivo de aprimorar a atividade biológica da substância. Esse processo visou garantir que a Flavo1 mantivesse sua eficácia terapêutica potencial, ao mesmo tempo melhorar sua viabilidade como candidata a fármaco. Após a otimização da estrutura da Flavo1, foi desenvolvida a estrutura da Flavo2 (figura 10).

Figura 10. Otimizada da estrutura da Flavo1, preservando suas atividades farmacológicas, resultando na formação da Flavo2.

7.5 ANÁLISE DE ADMET

Os estudos de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção e toxicidade (ADMET) são fundamentais na descoberta de medicamentos, visando otimizar as propriedades necessárias para transformar leads e construir fármacos eficazes. A previsão do destino de um medicamento e dos efeitos que ele causa no organismo, é crucial na descoberta de novos medicamentos. Se a absorção for inadequada, isso pode afetar sua distribuição e metabolismo, potencialmente resultando em neurotoxicidade e nefrotoxicidade (BUTINA; SEGALL; FRANKCOMBE, 2002; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019) .

A análise visa compreender como uma molécula de medicamento se comporta dentro do organismo, sendo o estudo ADMET uma parte fundamental do projeto computacional de medicamentos. Eles são reconhecidos como uma das principais razões para o fracasso de candidatos a medicamentos nas fases finais do desenvolvimento. A capacidade de modelar as propriedades ADMET das moléculas facilita a descoberta de medicamentos de várias maneiras (BUTINA; SEGALL; FRANKCOMBE, 2002) .

Um dos modelos ADMET mais utilizados na indústria farmacêutica é a "Regra dos 5" de Lipinski. Esta regra é empregada para filtrar compostos que provavelmente serão absorvidos pelo intestino humano com base em quatro regras simples relacionadas às propriedades moleculares (BUTINA; SEGALL; FRANKCOMBE, 2002; FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021).

7.5.1 FISICO-QUÍMICA

A Regra de Lipinski, considera diversos critérios, o Peso Molecular (PM), que não deve exceder 500 Da (Dalton); o Log P, que tem um limite de 5 e indica a lipofilia ou hidrofílica da molécula; número de aceitadores de ligações de hidrogênio (nHA) e número de doadores de ligações de hidrogênio (nHD), que não devem ultrapassar, respectivamente, os valores de 10 e 7; e a Área Topológica Superficial Polar (TPSA), que deve ser menor que 140 Å (LIPINSKI; LOMBARDO; DOMINY; FEENEY, 1997).

O peso molecular do Flavo2 é de 394,07, dentro do limite de 500 u.m.a. Moléculas grandes geralmente enfrentam dificuldades em atravessar barreiras biológicas no organismo humano. Os dados obtidos até agora sugerem que o composto listado provavelmente tem boa permeabilidade através de membranas biológicas. Para o Flavo2, o volume é de 378,867 unidades de volume e a densidade é de 1,04. Esses valores são importantes na caracterização

físico-química de um composto, pois influenciam sua solubilidade, estabilidade e comportamento em sistemas biológicos (tabela 5) (DA MATA RODRIGUES; COSTA, 2021).

Tabela 5. Propriedades físico-química do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA	
Peso molecular (PM)	394,07
Volume	378.867
Densidade	1.04
nHA	8,0
nHD	6,0
nRot	2,0
nRing	1,0
MaxRing	10,0
nHet	8,0
fChar	0,0
nRig	24,0
Flexibilidade	0,083
Centros estéreo	0,0
TPSA	151,59
logS	-4,744
logP	2.648
logD7.4	1.936
pka (ácido)	7.873
pka (Base)	1.458
Ponto de fusão	355.992
Ponto de ebulição	472.407

O número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio do Flavo2 são respectivamente 8,0 e 6,0, estando dentro dos limites estabelecidos pelas regras, que não devem ultrapassar, respectivamente, os valores de 11 e 7. As ligações rotativas (nRot) em moléculas, ou seja, aquelas que podem girar em torno de um eixo para atingir uma estrutura ideal, variam de 0 a 11. No caso da estrutura Flavo2, ela se encontra dentro desses parâmetros com um valor de 2. O número de toques (nRing) refere-se à quantidade de anéis presentes em uma molécula, com valores ideais entre 0 e 6, o Flavo2 apresentou um resultado de 1, dentro do limite esperado. MaxRing é o número máximo de átomos envolvidos no maior anel do sistema, idealmente entre 0 e 18, o Flavo2 obteve 10 nesse aspecto. O número de heteroátomos (nHet) é a quantidade de átomos não carbono (incluindo hidrogênios) na molécula, com valores ideais entre 1 e 15, o Flavo2 apresentou 8 nesse quesito. A carga formal (fChar) é uma medida da distribuição de elétrons em uma molécula, idealmente variando de -4 a 4. O Flavo2 obteve uma carga formal de 0. O número de ligações rígidas (nRig) representa as ligações não flexíveis em contraste com as ligações rotativas, o ideal é entre 0 e 30. O Flavo2 teve 24 ligações rígidas, dentro dos valores de referência. A flexibilidade da molécula é representada pela divisão de nRot por nRig,

portanto, quanto maior a proporção n_{Rot}/n_{Rig} , maior a flexibilidade da molécula, resultou em 0,083 para o Flavo2. Além disso, a molécula possui 0 centros estéreos, o que está dentro do valor ideal de ≤ 2 (ADMETlab, 2024).

O TPSA, que está correlacionado com o número de ligações de hidrogênio de uma molécula, também é um parâmetro relevante, a maioria dos medicamentos comerciais com boa biodisponibilidade oral apresenta TPSA menor que 140 Å. No entanto, o TPSA do Flavo2 está acima desse limite, o que pode indicar uma menor probabilidade de boa biodisponibilidade oral em comparação com medicamentos comerciais. O LogP, coeficiente octanol/água, indica a afinidade da molécula por substâncias lipídicas ou aquosas, no caso do composto Flavo2, seu LogP é de 1,936, menor que 5, o que está em conformidade com a Regra de Lipinski (DA MATA RODRIGUES; COSTA, 2021).

O logaritmo da solubilidade aquosa ($\log S$) é uma medida da solubilidade prevista de um composto, expressa como o logaritmo da concentração molar ($\log \text{ mol/L}$). Compostos com valores de $\log S$ na faixa de -4 a 0,5 $\log \text{ mol/L}$ são considerados adequadamente solúveis. O Flavo2 obteve um resultado dentro desses parâmetros, com um valor de -4,744, indicando uma boa solubilidade aquosa. Para exercer efeito terapêutico, um medicamento deve entrar na circulação sanguínea e então atingir o local de ação. Um medicamento eficaz geralmente precisa equilibrar sua lipofilicidade e hidrofiliicidade para se dissolver no fluido corporal e penetrar efetivamente nas biomembranas. Por isso, é crucial estimar os coeficientes de distribuição de n-octanol/água em valores de pH fisiológico ($\log D_{7,4}$) para compostos candidatos na fase inicial da descoberta de medicamentos. O $\log D_{7,4}$ previsto de um composto é obtido a partir do logaritmo da concentração molar ($\log \text{ mol/L}$). Compostos com valores de $\log D_{7,4}$ na faixa de 1 a 3 $\log \text{ mol/L}$ são considerados adequados. No caso do Flavo2, seu $\log D_{7,4}$ foi de 1,936, indicando sua adequada distribuição lipofílica/hidrofílica (ADMETlab, 2024; DUAN; FU; ZHANG; LONG *et al.*, 2023).

O pK_a (ácido) e pK_b (base) representam a força da acidez ou basicidade de uma molécula de medicamento. Um pK_a de 7,873 para o Flavo2 indica que ele é um ácido relativamente forte, enquanto um pK_b de 1,458 sugere uma base bastante fraca. O ponto de fusão é a temperatura (em °C) na qual um produto químico sólido se transforma em líquido. O Flavo2 é classificado como sólido, pois seu ponto de fusão previsto está acima de 25°C. O ponto de ebulição normal é a temperatura na qual um produto químico ferve à pressão atmosférica. Um ponto de ebulição normal abaixo de 25°C é classificado como um gás. O Flavo2 possui um ponto de ebulição previsto de 472,407 (ADMETlab, 2024).

7.5.2 QUÍMICA MEDICINAL

Para quantificar a similaridade com medicamentos, empregamos o QED (*Quantitative Estimate of Druglikeness*) é a estimativa de semelhança com fármacos, sendo útil para triagem e avaliação da eficiência de um composto. O QED é calculado ao integrar os resultados de oito propriedades relevantes à semelhança com medicamentos, que incluem MW (peso molecular), log P, NHBA (Número de ligação de aceptores de H), NHBD (Número de ligações doadores de H), PSA, Nrotb (número de ligações rotativas), o número de anéis aromáticos (NAr) e o número de alertas para grupos funcionais indesejáveis. Em média, o QED é de 0,67 para compostos atrativos, 0,49 para os não atrativos e 0,34 para os não atrativos que se mostram altamente complexos. No entanto, nosso composto Flavo2 apresentou um QED de aproximadamente 0,33, abaixo do esperado. Já a pontuação de acessibilidade sintética foi desenvolvida para avaliar a facilidade de síntese de moléculas semelhantes a medicamentos, considerando contribuições de fragmentos e uma penalidade por complexidade. Um SAscore alto, igual ou superior a 6, indica dificuldade na síntese, enquanto um SAscore baixo, abaixo de 6, indica facilidade na síntese. O Flavo2 foi classificado como uma molécula de fácil síntese (tabela 6) (BICKERTON; PAOLINI; BESNARD; MURESAN *et al.*, 2012; ERTL; SCHUFFENHAUER, 2009; KOSUGI; OHUE, 2021).

Tabela 6. Propriedades Química medicinal do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

QUÍMICA MEDICINAL	
QED	0,283
pontuação SA	Fácil
GASA	Fácil
Fsp ³	0,0
MCE-18	25,0
pontuação NP	1.224
Regra de Lipinski	Aceitaram
Regra da Pfizer	Aceitaram
Regra GSK	Aceitaram
Triângulo Dourado	Aceitaram
DORES	1
Regra Alarm_NMR	3
Regra BMS	1
Regra Quelante	1
Agregadores coloidais	0,975
FLuc inhibitors	0,68
Fluorescência azul	0,865
Fluorescência verde	0,683
Compostos reativos	0,689
Compostos promíscuos	0,836

As pontuações SA e GASA, são pontuações de acessibilidade sintética desenvolvidas para estimar a facilidade de síntese de moléculas semelhantes a medicamentos, usando uma abordagem que combina contribuições de fragmentos com uma penalidade pela complexidade. Na escala de pontuação, valores mais altos indicam maior dificuldade de síntese, variando de 0 a 1. Por exemplo, o Flavo2 foi considerado fácil de sintetizar. Enquanto, o Fsp³ (fração de átomos de carbono sp³), que representa o número de carbonos hibridizados sp³ em relação à contagem total de carbono, é uma medida usada para avaliar a saturação de carbono das moléculas e caracterizar a complexidade de sua estrutura espacial.

Estudos mostraram que um aumento na saturação, conforme medido pelo Fsp³, e no número de centros quirais na molécula está associado a uma maior taxa de sucesso clínico, possivelmente devido ao aumento da solubilidade, determinando assim a probabilidade do composto avaliado ser um medicamento. Um valor de Fsp³ $\geq 0,42$ é considerado adequado. No entanto, o flavo2 obteve valores que estão fora dessa faixa de referência, pontuando 0 (LOVERING; BIKKER; HUMBLET, 2009; YU; WANG; ZHAO; GAO *et al.*, 2022).

O MCE-18 representa um avanço na química medicinal, permitindo a avaliação de novidades presentes nas moléculas a partir de sua complexidade sp³ cumulativa. Os valores atribuídos podem indicar o potencial de uma molécula, menor que 45: Moléculas com estruturas simples, pouco interessantes, antigas e com baixa complexidade tridimensional. Entre 45 e 63: Moléculas com um nível adequado de novidade, seguindo as tendências atuais da química medicinal. Entre 63 e 78: Moléculas com alta similaridade estrutural com compostos encontrados em registros de patentes. Maior que 78: Moléculas que requerem uma avaliação visual detalhada para determinar sua similaridade com fármacos conhecidos e seu potencial como medicamento. (ERTL; ROGGO; SCHUFFENHAUER, 2008; IVANENKOV; ZAGRIBELNYY; ALADINSKIY, 2019).

No caso específico do Flavo2, obteve-se um valor de 25.0, o que sugere que sua estrutura pode ser considerada simples e menos inovadora. Enquanto, a pontuação de semelhança do produto natural é uma medida útil que facilita na construção de novos compostos em direção a regiões conhecidas como regiões bioativas. Essa pontuação, geralmente calculada em uma escala de -5 a 5, reflete a proximidade estrutural de uma molécula em relação aos produtos naturais conhecidos. No caso específico do Flavo2, sua pontuação foi de 1.224, indicando uma relação positiva com os padrões bioativos encontrados na natureza (ERTL; ROGGO; SCHUFFENHAUER, 2008; IVANENKOV; ZAGRIBELNYY; ALADINSKIY, 2019).

Pan Assay Interference Compounds (PAINS) é um conjunto de estruturas químicas

encontradas em compostos de triagem que podem levar a resultados falsos positivos em ensaios biológicos. A utilização desses filtros ajuda a reduzir o número de resultados falsos positivos e identificar compostos suspeitos em bancos de dados de triagem, o Flavo2 obteve um alerta para possível estrutura PAINS, para ALARME NMR, ou seja, compostos reativos ao tiol, responsáveis por causar a oxidação de proteínas ou formar adutos covalentes com vários constituintes celulares compostos reativos indesejáveis. O software também gerou alerta para compostos quelantes, compostos capazes de reagir com íons metálicos (AHMAD; KHAN; SERDAROĞLU, 2023; BAELL; HOLLOWAY, 2010).

Os agregadores coloidais se ligam de forma não específica à superfície das proteínas, ocasionando no desdobramento das proteínas. Esse processo resulta na desestabilização ou desnaturação das enzimas. Os agregadores podem ser categorizados como não coloidais (Categoria 0) ou coloidais (Categoria 1). No caso do Flavo2, ele obteve uma pontuação de 0.975, indicando sua propensão a formar agregados coloidais. O Fluc (Luciferase do vaga-lume) é amplamente utilizado em uma variedade de ensaios de bioluminescência HTS (ensaios de triagem de alto rendimento). No entanto, a inibição inesperada de FLuc por certos compostos pode interferir nos ensaios HTS. Os inibidores são categorizados em duas categorias: Categoria 0 para inibidores não de FLuc e Categoria 1 para inibidores de FLuc. O Flavo2 obteve um valor de 0,68, indicando sua potencial interação com o Fluc (ADMETlab, 2024).

Fluorescência é um processo em que uma molécula, conhecida como fluoróforo absorve um fóton de luz, excitando um elétron para um estado de energia mais elevado. Os fluoróforos têm diversas aplicações, como substratos enzimáticos, marcadores para biomoléculas e corantes celulares. No entanto, a presença de compostos fluorescentes pode causar interferência nos HTS. Eles são classificados em Categoria 0 se não emitem fluorescência azul/verde e em Categoria 1 se emitem. Para o Flavo2, os valores foram 0,865 e 0,683, respectivamente. Compostos químicos reativos resultam na modificação química de resíduos de proteínas reativas. Categoria 0: composto não reativo; Categoria 1: composto reativo. O valor de saída é a probabilidade de ser composto reativo, dentro do intervalo de 0 a 1. Flavo2 obteve 0.689. Enquanto os compostos promíscuos são aqueles que se ligam a diferentes alvos macromoleculares, o que pode incluir alvos não intencionais, resultando em reações, sendo classificados em categoria 0 se não são promíscuos e em categoria 1 se são promíscuos. O Flavo2 obteve 0,836 nesse caso, valores sugestivos a molécula promíscua (ADMETlab, 2024).

7.5.3 ABSORÇÃO

Antes de um medicamento oral alcançar a corrente sanguínea e se tornar sistemicamente ativo, ele deve atravessar as membranas celulares do intestino. Isso pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos, como difusão passiva, pinocitose e a fagocitose, captação mediada por transportadores ou processos de transporte ativo. As células da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), usadas como modelo alternativo para o epitélio intestinal humano, são frequentemente empregadas para estimar a permeabilidade de fármacos *in vivo*. Isso se deve às suas semelhanças morfológicas e funcionais com as células intestinais (ADMETlab, 2024; DELUCIA, 2012).

A permeabilidade Caco-2 prevista de um composto é expressa como $\log \text{ cm/s}$. Um composto é considerado ter uma boa permeabilidade em relação ao Caco-2 se seu valor previsto for maior que $-5,15 \log \text{ cm/s}$. No entanto, o composto Flavo2 apresentou um valor de $-5,301$, aproximadamente $0,151$ abaixo do valor de referência, o que pode indicar problemas de absorção intestinal *in vivo*. O Ensaio de Permeabilidade de Membrana Artificial Paralela (PAMPA) é um método utilizado para simular a absorção de medicamentos por difusão passiva no trato gastrointestinal após administração oral. A técnica de PAMPA é capaz de prever não apenas a partição água/membrana mas o estado da carga em diferentes valores de Ph e sua solubilidade, refletindo assim sua capacidade de atravessar a barreira intestinal por difusão passiva. No caso do Flavo2, observou-se uma baixa permeabilidade através da membrana artificial no ensaio PAMPA (tabela 7) (ADMETlab, 2024; PAGE; INTEGRADA; REIS, 2013).

Tabela 7. Propriedades de Absorção do Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

ABSORÇÃO	
Permeabilidade Caco-2	-5.301
Permeabilidade MDCK	0,0
PAMPA	+++
Inibidor de Pgp	---
Substrato Pgp	---
HIA	---
F20%	+++
F30%	+++
F50%	+++

As células renais caninas Madin-Darby (MDCK) são comumente utilizadas para prever a absorção de compostos desde 1989. O coeficiente de permeabilidade aparente (Papp)

determinado nessas células é amplamente reconhecido como o padrão-ouro para avaliar a capacidade de absorção de compostos químicos pelo organismo. A unidade de medida para a permeabilidade MDCK é cm/s. Os resultados da permeabilidade MDCK são interpretados da seguinte forma: um $P_{app} > 20 \times 10^{-6}$ cm/s indica alta permeabilidade passiva, enquanto valores entre 2 e 20×10^{-6} cm/s indicam permeabilidade média, e valores abaixo de 2×10^{-6} cm/s indicam baixa permeabilidade (ADMETlab, 2024).

O Flavo2 demonstrou resultados excelentes nesse teste de permeabilidade, indicando que possui uma alta capacidade de atravessar a barreira celular MDCK e potencialmente ser absorvido pelo organismo. O Flavo2 demonstrou resultados como não inibidor da glicoproteína P (Pgp), é o produto do gene MDR-1. Trata-se de uma proteína de 170 kDa, com 12 domínios transmembrana e dois sítios de união ao ATP, pertencente à superfamília de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC). A Pgp desempenha papel na absorção intestinal, metabolismo e penetração na barreira hematoencefálica. Sua inibição ou indução pode ter um impacto significativo na biodisponibilidade oral e na duração da ação de várias drogas. Atuando na proteção dos tecidos contra xenobióticos tóxicos e metabólitos endógenos, realizando a excreção desses compostos para o lúmen intestinal, biliar e urina. A utilização de inibidores da P-gp é utilizada em estudos para reverter a resistência multidrogas (MDR), aumentando a concentração de fármacos em tecidos malignos melhorando a eficácia dos agentes quimioterapêuticos e seus perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos. (ADMETlab, 2024; ARAÚJO, 2015; DIOGO, 2014; FLORÉZ; FÊO; ROCHA; PEREIRA, 2019; SILVA; ALVES; GONÇALVES; DE AGUIAR PEREIRA *et al.*, 2022).

A absorção intestinal humana de um medicamento oral é essencial para a sua aparente eficácia, com um objetivo de otimizar e selecionar candidatos para desenvolvimento de medicamentos orais. Uma molécula com uma absorvância inferior a 30% é considerada pouco absorvida. Assim, moléculas com HIA $>30\%$ foram classificadas como HIA- (Categoria 0), enquanto moléculas com HIA $<30\%$ foram classificadas como HIA+ (Categoria 1). O flavo2 obteve resultados superiores a 30% da absorção, resultados excelentes. A biodisponibilidade oral é sem dúvida um dos parâmetros farmacocinéticos mais importantes porque é o indicador da eficiência da entrega do medicamento à circulação sistêmica. Foram avaliados parâmetros com biodisponibilidade $\geq 20\%$, $\geq 30\%$ e $\geq 50\%$ onde a flavo2 pontuou negativamente entre os 3 parâmetros avaliados (ADMETlab, 2024; WESSEL; JURIS; TOLAN; MUSKAL, 1998).

7.5.4 METABOLISMO

A previsão do metabolismo (tabela 8) é uma prioridade da pesquisa farmacêutica, pois pode levar a uma baixa biodisponibilidade devido à maior depuração, efeitos tóxicos causados pelo acúmulo de drogas e interações medicamentosas, incluindo inibição enzimática, indução e inativação baseada em mecanismos. A CYP1A2: monooxigenase do citocromo P450 envolvida no metabolismo de vários substratos endógenos, como ácidos graxos, hormônios esteroides e vitaminas. CYP2C19: monooxigenase do citocromo P450 envolvida no metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados. CYP2C9: monooxigenase do citocromo P450 envolvida no metabolismo de vários substratos endógenos, como ácidos graxos e esteroides. CYP2D6: monooxigenase do citocromo P450 envolvida no metabolismo de ácidos graxos, esteroides e retinóides. CYP3A4: monooxigenase do citocromo P450 envolvida no metabolismo de esteróis, hormônios esteroides, retinóides e ácidos graxos (BARROS; WANG; XING; XU; ZHOU *et al.*, 2015).

Tabela 8. Propriedades do metabolismo de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

METABOLISMO	
Inibidor do CYP1A2	+++
Substrato CYP1A2	---
Inibidor do CYP2C19	---
Substrato CYP2C19	---
Inibidor do CYP2C9	---
Substrato CYP2C9	---
Inibidor do CYP2D6	---
Substrato CYP2D6	+++
Inibidor do CYP3A4	+++
Substrato CYP3A4	---
Inibidor do CYP2B6	++
Substrato CYP2B6	---
Inibidor do CYP2C8	+++
Estabilidade do HLM	++

Os citocromos P450 (CYP3A4, 1A2, 2C9, 2C19 e 2D6), são proteínas contendo heme envolvidas nas transformações químicas de várias substâncias endógenas e exógenas, essas enzimas alteram a estrutura de diferentes moléculas exógenas lipossolúveis, tornando-as mais solúveis e facilmente eliminadas pelo corpo humano, são responsáveis pela primeira etapa de metabolismo de mais de 75% dos fármacos em uso. A inibição e indução das enzimas do citocromo P450 (CYP) são mecanismos essenciais, resultando em interações medicamentosas

cl clinicamente importantes (DDI do inglês Drug-Drug Interactions). Os inibidores bloqueiam a atividade de uma ou mais enzimas CYP450. O impacto de um inibidor no metabolismo de um medicamento depende da dose e a afinidade do inibidor pela enzima. Os indutores aumentam a atividade da enzima CYP450 ao aumentar sua síntese. Neste caso o Flavo2 se mostrou inibidor do CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8 A inibição ou indução dessas isoformas pelo composto Flavo2 pode implicar na farmacocinética de outras substâncias, podendo alterar seus níveis e efeitos no organismo, porém o ensaio de estabilidade microsomal do fígado humano (HLM) é um parâmetro importante para avaliar a depuração de produtos químicos pelo fígado humano. A categoria 0: estável+ (HLM > 30 min); Categoria 1: instável- (HLM ≤ 30 min), o Flavo2 se mostrou estável, com pontuação excelente, mostrando assim, baixa ou nenhuma probabilidade de depuração de produtos no fígado (ADMETlab, 2024; HABENSCHUS, 2016; LEMOS; TRINDADE, 2014; LYNCH; PRICE, 2007).

7.5.5 DISTRIBUIÇÃO

Ligação às proteínas plasmáticas exerce um papel central no transporte de fármacos no organismo humano, influenciando significativamente sua distribuição, excreção e nos efeitos farmacológicos e toxicológicos. Após atingirem a circulação sanguínea, os fármacos podem se ligar às proteínas plasmáticas em proporções variadas. Um composto é considerado como tendo um PPB (Plasma Protein Binding) adequado se tiver valor previsto <90%, e medicamentos com alta ligação às proteínas podem ter um baixo índice terapêutico (ADMETlab, 2024).

O Flavo2 obteve cerca de 96,7%. O volume de distribuição no estado estacionário (VD_{ss}) corresponde ao volume aparente em que um medicamento se distribui no corpo após atingir o equilíbrio. Essa propriedade farmacocinética (PK) é fundamental, pois indica o quão efetivamente uma molécula do medicamento se espalha por todo o organismo. A unidade de VD_{ss} é expressa em litros por quilograma (L/kg). Um composto é considerado ter um VD_{ss} adequado quando seu valor está na faixa de 0,04 a 20 L/kg. No caso do Flavo2, seu VD_{ss} previsto foi de 0,344 L/kg, o que sugere uma distribuição adequada no organismo (tabela 9) (ADMETlab, 2024; JESUS, 2023; MODA, 2007).

Tabela 9. Propriedades da Distribuição de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

DISTRIBUIÇÃO	
PPB	96,7%
VD _s	0,344

DISTRIBUIÇÃO (continuação)	
BBB	---
Fu	3,1%
Inibidor OATP1B1	+++
Inibidor OATP1B3	+++
Inibidor de BCRP	++
Inibidor de MRP1	+++
Inibidor de BSEP	---

O Flavo2 obteve valores excelentes na avaliação Medicamentos que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC), apresentam um grande valor terapêutico, devido ao produzirem efeitos como alívio da febre, dor e crises epilépticas precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para alcançar seus alvos moleculares. Moléculas com um $\log\text{BBB} > -1$ são classificadas como BBB+ (Categoria 1), enquanto aquelas com $\log\text{BBB} \leq -1$ são consideradas BBB- (Categoria 0). O valor de saída indica a probabilidade de um composto ser BBB+, variando de 0 a 1 (ADMETlab, 2024).

O Flavo2 obteve valores excelentes nesse contexto. Porém a fração não ligada em plasmas é um importante indicador farmacocinético. A maioria dos medicamentos no plasma existirá em equilíbrio entre um estado não ligado ou ligado às proteínas séricas. A eficácia de um medicamento pode ser afetada pelo grau em que ele se liga às proteínas do sangue, pois quanto mais ligado, menos eficientemente ele consegue atravessar as membranas celulares ou se difundir. Uma fração não ligada maior ou igual a 5% é considerada excelente, enquanto uma fração menor que 5% é considerada pobre. No caso do Flavo2, ele apresentou uma fração não ligada de 3,1%, o que indica uma ligação pobre às proteínas séricas (ADMETlab, 2024; DELUCIA; PLANETA, 2006).

Os transportadores de ânions orgânicos (OATPs) 1B1 e 1B3 desempenham um papel crucial na captação hepática de substâncias e são membros da família OATP, que compreende 11 membros em humanos, possuindo 12 domínios que atravessam a membrana. OATP1B1 e OATP1B3 são predominantemente expressos na superfície basal dos hepatócitos em indivíduos saudáveis. A inibição desses transportadores pode resultar em interações medicamentosas significativas. Em relação à interpretação dos resultados, a categorização pode ser feita em duas categorias: Categoria 0 para não inibidor e Categoria 1 para inibidor. O Flavo2 foi identificado como um possível inibidor de ambos os OATPs, de acordo com os critérios avaliados (ADMETlab, 2024; MAEDA, 2015).

A proteína de resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1), também conhecida como ABCC1, é um transportador de cassete de ligação ao ATP encontrado em humanos. Sua

descoberta inicial foi motivada pela capacidade de conferir resistência a diversos medicamentos em células de câncer de pulmão. O MRP1 desempenha um papel crucial na absorção e eliminação de uma ampla variedade de substâncias endógenas e xenobióticas, incluindo vários medicamentos, através de órgãos e barreiras fisiológicas. A inibição de suas funções normais pode resultar em interações medicamentosas, quanto a colestase induzida por medicamentos é um efeito colateral frequentemente observado e geralmente está relacionado a uma interação inesperada com a bomba de exportação de sais biliares (BSEP). O BSEP é o principal transportador de membrana responsável pelo transporte de ácidos biliares dos hepatócitos para a bile. A retenção de ácidos biliares também pode ser causada por compostos que inibem a atividade da BSEP. No caso do Flavo2, foi observado que ele obteve resultados insatisfatórios em relação a ambos os critérios avaliados, possivelmente indicando um potencial efeito adverso sobre esses sistemas de transporte (ADMETlab, 2024; COLE, 2014; MAEDA, 2015).

7.5.6 EXCREÇÃO

A depuração plasmática (CL) é um parâmetro farmacocinético importante, pois representa a capacidade geral do organismo de eliminar um medicamento, controlando a exposição do corpo a um medicamento. A interpretação dos resultados de depuração plasmática é baseada em intervalos empíricos. Valores acima de 15 ml/min/kg indicam uma depuração alta, valores entre 5-15 ml/min/kg indicam uma depuração moderada e valores abaixo de 5 ml/min/kg indicam uma depuração baixa. Onde Flavo2 obteve como resultados na depuração plasmática 8.926, sendo considerada assim, uma depuração moderada. Enquanto a meia-vida ($T_{1/2}$) de um medicamento é um conceito híbrido que envolve depuração e volume de distribuição, e é indiscutivelmente mais apropriado ter estimativas confiáveis dessas duas propriedades. A meia-vida é o tempo necessário para que a concentração plasmática ou a quantidade de medicamentos presentes no organismo sejam reduzidas pela metade (ADMETlab, 2024; LOPES, 2012).

A unidade de medida para a meia-vida de um medicamento, representada como $T_{1/2}$, é em horas. Os medicamentos são classificados de acordo com sua meia-vida da seguinte forma: Meia-vida ultracurta: $T_{1/2} < 1$ hora; Meia-vida curta: 1-4 horas; Meia-vida intermediária: 4-8 horas; Meia-vida longa: $T_{1/2} > 8$ horas, onde na decisão empírica >8 : excelente (verde); 1-8: médio (amarelo); <1 : pobre (vermelho), o Flavo2 assim, obteve meia-vida curta (tabela 10)(ADMETlab, 2024).

Tabela 10. Propriedades de Excreção de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

EXCREÇÃO	
Plasma CL	8.926
T1/2	1.713

7.5.7 TOXICIDADE

Durante a despolarização e repolarização cardíaca, um canal de potássio dependente de voltagem, codificado pelo gene hERG, desempenha um papel crucial na regulação do potencial de ação cardíaco e do potencial de repouso. O bloqueio desse canal pode resultar na síndrome do QT longo (SQTL), arritmias e Torsade de Pointes (TdP), que podem levar a palpitações, desmaios e até morte súbita. Substâncias com $IC_{50} \leq 10 \mu M$ são consideradas bloqueadoras do canal hERG+ (Categoria 1), enquanto aquelas com $IC_{50} > 10 \mu M$ são classificadas como não-bloqueadoras do canal hERG- (Categoria 0). O Flavo2 apresentou valores desfavoráveis no parâmetro de bloqueio do canal hERG ($10 \mu M$), mas obteve resultados excelentes em outros ensaios relacionados ao canal hERG. A lesão hepática induzida por medicamentos, conhecida como DILI, é uma condição comum que ocorre frequentemente após a administração de medicamentos em doses usuais (ADMETlab, 2024).

Os sintomas podem variar desde um leve aumento nas enzimas hepáticas até a insuficiência hepática. A categorização de substâncias em relação à DILI é feita em categoria 0 para negativo e categoria 1 para positivo. No caso do Flavo2, os resultados foram desfavoráveis nesse parâmetro, indicando um potencial impacto negativo sobre a função hepática (tabela 11) (ADMETlab, 2024; BLATT; BECKER; LUNARDELI, 2016).

Tabela 11. Propriedades de Toxicidade de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

TOXICIDADE	
Bloqueadores hERG	0,062
Bloqueadores hERG (10um)	0,71
DÍLI	0,788
Toxicidade AMES	0,634
Toxicidade aguda oral em ratos	0,504
FDAMDD	0,93
Sensibilização da Pele	0,996
Carcinogenicidade	0,46
Corrosão ocular	0,037
Irritação ocular	0,996
Respiratório	0,654
Hepatotoxicidade Humana	0,353
Nefrotoxicidade induzida por drogas	0,009

TOXICIDADE (continuação)	
Neurotoxicidade induzida por drogas	0,002
Ototoxicidade	0,416
Hematotoxicidade	0,017
Genotoxicidade	0,994
Imunotoxicidade RPMI-8226	0,016
Citotoxicidade A549	0,974
Citotoxicidade Hek293	0,734
BCF	1.088
IGC50	4.211
LC50DM	4.869
LC50FM	4.612

O teste de AMES é um dos recomendados pelas agências internacionais e instituições governamentais para avaliar a capacidade mutagênica de drogas e compostos sintéticos. A mutagenicidade está intimamente ligada à carcinogenicidade, tornando esse ensaio o mais utilizado para testar a mutagenicidade de compostos. Ele é classificado em duas categorias: Categoria 0 para mutagenicidade não-AMES e Categoria 1 para mutagenicidade AMES. O valor resultante representa a probabilidade de mutagenicidade do AMES, variando de 0 a 1. O Flavo2 obteve valores intermediários, com 0,634. Além disso, ele também apresentou valores intermediários na determinação da toxicidade aguda em mamíferos, como ratos ou camundongos, com 0,504. Essa avaliação é de grande importância para a segurança de candidatos a medicamentos (ADMETlab, 2024; SANTOS, 2007).

O FDAMDD fornece uma estimativa do limite de dose tóxica de produtos químicos em humanos. O valor de saída do FDAMDD é a probabilidade de ser tóxico, na Categoria 1: FDAMDD positivo, $\leq 0,011$ mmol/kg -pc/dia; Categoria 0: FDAMDD negativo, $> 0,011$ mmol/kg-pc/dia. O Flavo2 obteve resultados desfavoráveis, em torno de 0,93. A irritação da pele é uma possível consequência negativa de produtos aplicados na pele. A avaliação da capacidade de um composto, que pode ter contato com a pele, para causar dermatite alérgica de contato é uma preocupação significativa em termos de segurança. A interpretação dos resultados é a seguinte: categoria 1 - Causador de sensibilidade; Categoria 0 - Não causa sensibilidade. O Flavo2 demonstrou resultados que indicam sua capacidade de causar sensibilidade, com um valor aproximado de 0,996 (ADMETlab, 2024; ZHANG; LI; SHI; CHEN *et al.*, 2023).

O câncer, incluindo o CCR é resultado de erros na replicação do DNA, que podem ser causados por danos oxidativos, adutos exocíclicos e despurinação. Esses erros são geralmente corrigidos por enzimas de reparo de DNA, mas alguns erros permanentes ocorrem a cada

replicação. Com o tempo, uma única célula pode acumular todos os erros necessários para se tornar cancerosa. Dois mecanismos principais aumentam o risco de câncer: 1) danos diretos ao DNA, que aumentam os erros a cada replicação, e 2) aumento do número de replicação do DNA, o que aumenta as chances de erros espontâneos (COHEN, 2017).

Para a avaliação de carcinogenicidade do composto Flavo2, é feita em uma escala de 0 a 1, onde 0-0.3 é considerado excelente, 0.3-0.7 é médio e 0.7-1.0 é ruim. O composto Flavo2 obteve uma pontuação de 0.46, apenas 0.16 pontos acima da média excelente, indicando resultados medianos. Os tecidos da córnea e da conjuntiva, que compõem a superfície anterior do olho, estão diretamente expostos ao ar e são facilmente lesados por produtos químicos. Os testes para determinar o grau de irritação, conhecidos como testes de irritação ocular ou cutânea, foram descritos inicialmente por John H. Draize e continuam sendo adotados mundialmente por órgãos oficiais. O composto Flavo2 obteve resultados excelentes, demonstrando ser um composto não corrosivos, porém irritante (COHEN, 2017; DE OLIVEIRA; SILVA; ALVES; DE FARIAS PRESGRAVE *et al.*, 2012).

A toxicidade respiratória é a principal razão para a retirada de medicamentos do mercado. Muitas vezes essa condição pode não apresentar sinais ou sintomas distintos precocemente, especialmente em medicamentos amplamente utilizados, resultando em significativa morbidade e mortalidade. Assim, a vigilância atenta e o tratamento adequado da toxicidade respiratória assumem uma importância crucial (BERTOLAMI, 2005).

Muitos medicamentos comumente utilizados na prática clínica podem desencadear reações adversas, como lesões hepáticas, o que pode restringir sua aplicação e os benefícios terapêuticos esperados. Essas lesões hepáticas podem ser de dois tipos: hepatocelular, caracterizada pelo aumento das enzimas transaminases oxaloacetato e piruvato (TGO e TGP), ou colestática, que resulta no aumento da bilirrubina (especialmente da fração direta), da fosfatase alcalina e da gama-glutamil transferase (G-GT). Com isso, foi avaliado o potencial do composto Flavo2 em ocasionar toxicidade respiratória e Hepatotoxicidade Humana. Em uma escala de 0-0,3: excelente; 0,3-0,7: médio; 0,7-1,0: ruim, o Flavo2 pontuou 0,654 e 0,353, respectivamente, obtendo uma pontuação mediana para os critérios avaliados (ADMETlab, 2024; BERTOLAMI, 2005).

Os rins atuam na manutenção da homeostase corporal, eliminando produtos do metabolismo e conservando substâncias essenciais, como proteínas, eletrólitos e água. A insuficiência renal ocorre quando a função dos rins é comprometida, frequentemente associada à hipertensão arterial, diabetes mellitus e exposição a substâncias nefrotóxicas (DE MELLO; ROCHA; OLIVEIRA; MENDONÇA *et al.*, 2021).

A nefrotoxicidade induzida por medicamentos refere-se aos efeitos prejudiciais que alguns produtos químicos e medicamentos podem ter nos rins, resultando na rápida deterioração da função renal. As substâncias neurotóxicas são aquelas que apresentam afinidade para o tecido nervoso, provocando alterações funcionais, podendo contribuir para vários distúrbios mentais e neurológicos. O composto Flavo2 foi avaliado para nefrotoxicidade e neurotoxicidade induzida por drogas, obtendo resultados excelentes nos dois parâmetros avaliados (DE MELLO; ROCHA; OLIVEIRA; MENDONÇA *et al.*, 2021; GAMEIRO, 2016).

Os compostos ototóxicos têm o potencial de causar danos ao ouvido interno, afetando suas estruturas ou o sistema nervoso associado. O composto Flavo2 foi avaliado nesse aspecto e recebeu uma pontuação mediana de 0,416 numa escala de 0 a 1, onde 0 indica ausência de potencial ototóxico e 1 indica potencial ototóxico. A hematotoxicidade induzida por produtos químicos refere-se aos efeitos adversos desses produtos nos órgãos responsáveis pela produção de sangue, como a medula óssea e os componentes sanguíneos (plaquetas, leucócitos e eritrócitos) (ADMETlab, 2024).

O composto Flavo2 obteve resultados ótimos, com uma pontuação de 0,017, indicando ausência de potencial hematóxico, porém obteve uma pontuação de 0,994, indicando uma probabilidade de apresentar genotoxicidade. A genotoxicidade refere-se à habilidade de compostos causarem danos ao material genético dentro das células. A interação com agentes químicos ou biológicos pode levar a instabilidades no genoma e/ou mudanças epigenéticas, que por sua vez estão associadas a diversas patologias, como o câncer. (ADMETlab, 2024).

O composto Flavo2 não apresentou probabilidade de exibir imunotoxicidade em RPMI-8226, com uma pontuação de 0,016. A linhagem celular RPMI-8226, que é uma linhagem de mieloma múltiplo, porém o composto obteve um potencial imunotoxicidade em A549, uma linhagem celular humana de câncer de pulmão de células não pequenas, com uma pontuação de 0,974 e também em células HEK293 com uma pontuação de 0,734. HEK293 são células renais embrionárias humanas e são relativamente sensíveis ao microambiente externo. Essa avaliação ajuda a determinar a toxicidade desses compostos para as mencionadas linhagens celulares, auxiliando para descoberta de medicamentos e ensaio de citotoxicidade celular (ADMETlab, 2024).

O fator de bioconcentração (BCF) é um indicador da capacidade de uma substância química se acumular em organismos expostos em relação à sua concentração na água circundante. O BCF reflete a tendência de um agente em se acumular nos organismos apenas a partir da exposição em meio aquoso. No caso do Flavo2, foi observado um potencial tóxico de bioconcentração. O IGC50 de *Tetrahymena pyriformis* em 48 e 96 horas representa a

concentração do produto químico em estudo na água (em mg/L) que provoca uma inibição de 50% do crescimento dessa espécie em cada período de tempo. O Flavo2 não é considerado altamente tóxico com base nesses critérios (FERRARI; DI MARIO, 2022; SANTOS, 2015).

Tabela 12. Propriedades de Caminho Tox21 de Flavo2 obtidos do software ADMETlab 3.0.

CAMINHO TOX21	
NR-AhR	+++
NR-AR	-
NR-AR-LBD	+
NR-Aromatase	++
NR-ER	++
NR-ER-LBD	++
NR-PPAR-gama	+
SR-ARE	+++
SR-ATAD5	--
SR-HSE	+++
SR-MMP	+++
SR-p53	+++

Condições que resultam em uma ativação anormal do receptor de androgênios (AR), como mutações, amplificação da via de sinalização androgênica ou ativação de vias independentes de androgênios, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças prostáticas ou carcinomas prostáticos que não respondem à terapia hormonal. O receptor de andrógeno, um receptor hormonal nuclear, desempenha um papel crucial no câncer de próstata dependente de AR e em outras doenças relacionadas aos andrógenos. Então a terapia de privação androgênica é utilizada em neoplasia metastática (ADMETlab, 2024; SOUZA, 2023)

Os desreguladores endócrinos (EDCs) são uma categoria de poluentes ambientais, onde suas interações com os receptores de hormônios esteroides, como o AR, podem causar disfunções na função endócrina normal e interferir na homeostase metabólica, na reprodução e nas funções de desenvolvimento e comportamentais. O Flavo2 demonstrou uma probabilidade moderada de ser um agonista do AR (NR-AR) (tabela 12), podendo se ligar ao domínio de ligação a ligantes (LBD) do receptor de andrógeno NR-AR-LDB). A aromatase, por sua vez, é responsável pela conversão de andrógenos em estrogênio, desempenhando um papel crucial na manutenção do equilíbrio entre esses hormônios em vários órgãos sensíveis aos EDCs (ADMETlab, 2024; BILA; DEZOTTI, 2007).

O Flavo2 foi considerado um inibidor da aromatase (NR-AhR) e (NR-Aromatase), podendo afetar o equilíbrio entre andrógenos e estrogênios. O receptor de hidrocarboneto de arila (AhR) é essencial para as respostas do organismo às mudanças ambientais, mediando

reações a poluentes como hidrocarbonetos aromáticos. O AhR não apenas induz enzimas de desintoxicação, mas também interage com outras vias celulares. O Flavo2 ativa o AhR. Por outro lado, o receptor de estrogênio (ER) desempenha um papel crucial no desenvolvimento e na reprodução, e sua desregulação por produtos químicos pode causar problemas hormonais. O Flavo2 demonstrou interagir com os receptores de estrogênio (NR-ER) e (NR-ER-LBD) (ADMETlab, 2024; BRANCHINI, 2011).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são membros da família de receptores nucleares que desempenham um papel fundamental na regulação da glicose, metabolismo lipídico e resposta inflamatória, são fatores de transcrição sensíveis a lipídios que se dividem em três subtipos: PPAR alfa, PPAR delta (ou PPAR beta) e PPAR gama. Eles formam heterodímeros com o receptor Retinóide X (RXR) para regular a transcrição genética. O PPAR-gama, conhecido como receptor de glitazona, desempenha um papel crucial no metabolismo de glicose e lipídios. O Flavo2 teve resultados intermediários nesse aspecto (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a capacidade dos sistemas antioxidantes de defesa. O estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas. A via de sinalização do elemento de resposta antioxidante (ARE) é crucial para combater o estresse oxidativo. No entanto, o Flavo2 obteve resultados negativos nessa área (ADMETlab, 2024; BARBOSA; COSTA; ALFENAS; DE PAULA *et al.*, 2010; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Mutações somáticas no gene ATAD5 foram identificadas em pacientes portadores de diferentes tipos de câncer. Uma análise genômica abrangente revelou que o locus ATAD5 está associado a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento dessas doenças. Os níveis da proteína ATAD5 aumentam em resposta a danos no DNA, o que é crucial para células cancerosas em rápida divisão, pois precisam duplicar seu genoma a cada divisão celular. A falha nesse processo pode levar à morte dessas células. Embora muitos agentes quimioterápicos tenham sido desenvolvidos com base nesse conceito, eles têm limitações, como baixa eficácia e efeitos colaterais graves. O Flavo2 apresentou excelentes resultados nesse contexto. Por outro lado, o Flavo2 teve resultados negativos no parâmetro SR-HSE, relacionado ao elemento de resposta do fator de choque térmico. Vários tipos de estresse podem ativar a resposta proteica desdobrada (HSR/UPR), regulada por fatores de transcrição de choque térmico (HSFs), como HSF-1, -2 e -4 (ADMETlab, 2024; MELISI; HOLLEBECQUE; OH; CALVO *et al.*, 2019).

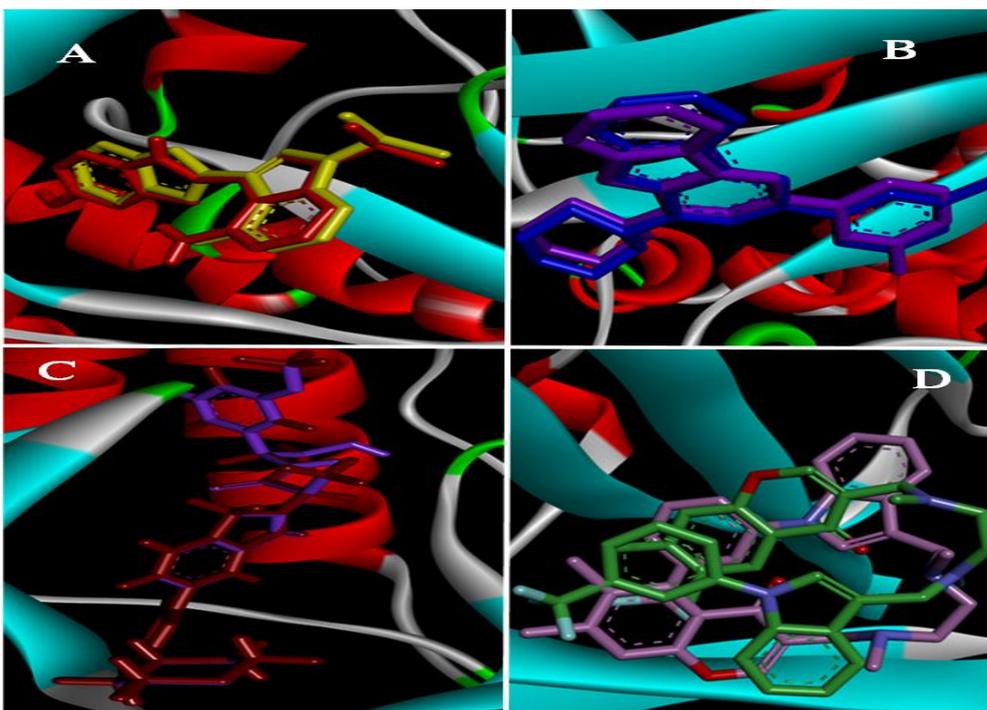
O potencial de membrana mitocondrial (MMP) é crucial para a função mitocondrial,

impulsionando a síntese de ATP. A MMP é frequentemente medida em células vivas para avaliar os efeitos de produtos químicos; quedas na MMP podem ser detectadas com corantes fluorescentes. O Flavo2 teve resultados negativos, indicando que não afeta a MMP. A proteína p53, envolvida na supressão de tumores, é ativada em resposta a danos celulares. Sua ativação é um indicador de danos no DNA e estresse celular. O Flavo2 também teve resultados negativos em relação à ativação do p53 (ADMETlab, 2024).

7.6 VALIDAÇÃO DA ANCORAGEM MOLECULAR

As estruturas no PDB geralmente estão ligadas a ligantes, o que requer uma validação das proteínas-alvo e dos protocolos de docking. Este processo de validação é realizado através do re-docking ou seja, reencaixe. No re-docking, o ligantes co-cristalizados dos receptores são removidos, sem quaisquer procedimentos de minimização e são acoplados de volta aos receptores originais. Então é realizado a sobreposição para verificar se o complexo original proveniente do PDB e o complexo recém preparados estão com os ligantes no mesmo sítio (MATEEV; VALKOVA; ANGELOV; GEORGIEVA *et al.*, 2022). Porém a proteína TGF- β (5E8S) não estava acoplada com ligante no PDB por este motivo não foi necessario realizar a validação (figura 11).

Figura 11. Validação das estruturas do PDB. Re-docking das estruturas proveniente do PDB com seu ligante original e sobreposição das estruturas. (A) mTOR (4JT5), (B) PI3K (4L23), ERK (7AUV) TNF- α (2AZ5).



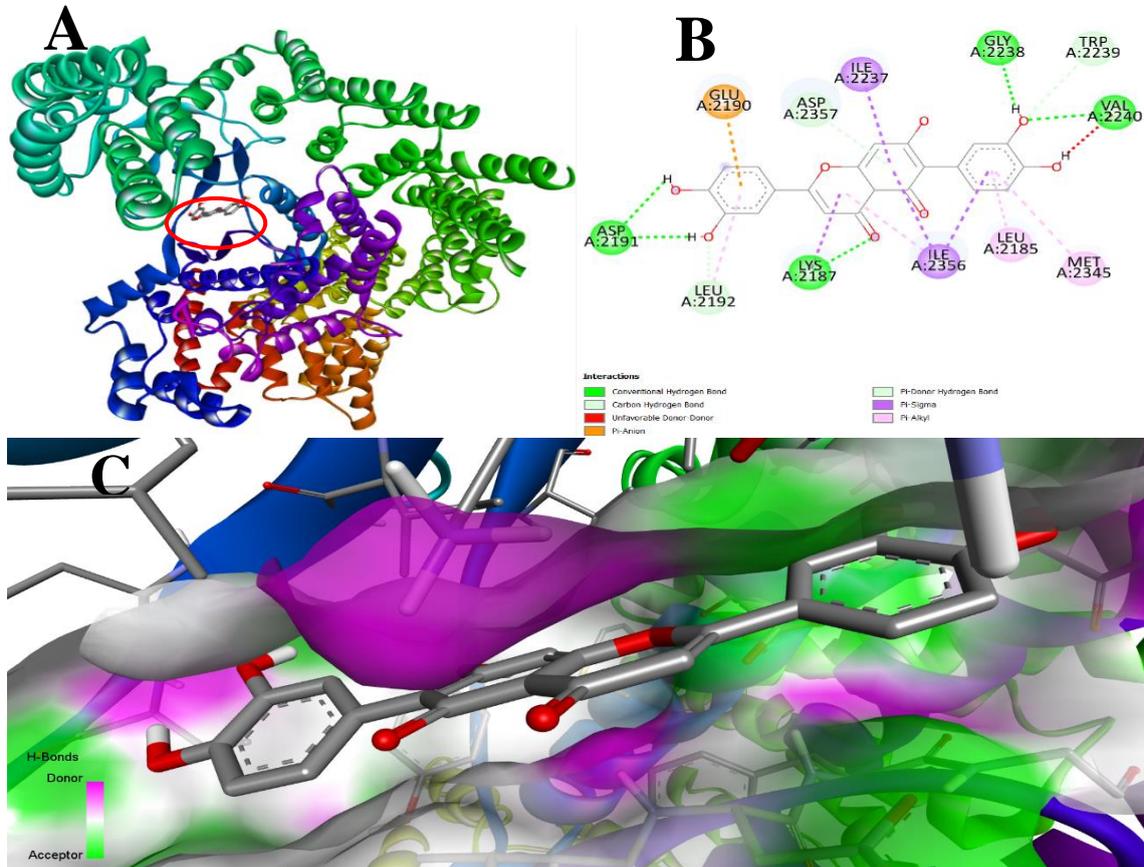
7.7.ANCORAGEM MOLECULAR

7.7.1 mTOR E O FLAVO2

A desregulação da via de sinalização de mTOR está fortemente ligada ao crescimento de tumores, para combater isso, um inibidor da proteína mTOR é visto como uma forma promissora de tratar o câncer. O sítio de ligação ao ATP de mTOR é principalmente constituído por resíduos hidrofóbicos. Os flavonoides são conhecidos por sua natureza hidrofóbica devido à abundância de anéis aromáticos em sua estrutura química, o que contribui para uma energia de ligação mais favorável (DAS; MATADA; DHIWAR; RAGHAVENDRA *et al.*, 2023; LI; MENG; WANG; YU *et al.*, 2018; RUIZ-TORRES; LOSADA-ECHEBERRÍA; HERRANZ-LÓPEZ; BARRAJÓN-CATALÁN *et al.*, 2018).

O sítio de ligação do ATP em mTOR está localizado no domínio catalítico (KD), entre os dois lobos, N-terminal e C-terminal, contendo os resíduos Val-2240 e Trp-2239, cruciais para inibir sua atividade. A interação do Flavo2 com mTOR envolve 9 resíduos, formando ligações convencionais de hidrogênio com Lys-2187, Asp-2191, Gly2238, Val2240. Formou também ligações carbono-hidrogênio com Leu-2192, Trp-2239 e Asp-2357, ligações PI-Sigma Ile -2237 e Ile-2356, PI-Alkyl com Leu-2185 e Met-2345, além de doadores Pi de ligações de hidrogênio com Asp-2357, Ile-2356 e Glu-2190 e ligações Pi-ânion com Glu-2190. A interação entre mTOR e Flavo2 realizada gerou uma energia de ligação de -8,74 e envolveu 12 ligantes presentes no sítio de ATP de mTOR. Um dos ligantes cruciais para inibir a atividade de mTOR a Val-2240, formou ligação de hidrogênio, que são interações secundárias entre um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo e um par de elétrons não ligantes de um terceiro átomo. Essas interações são essenciais para a determinação da estrutura cristalina e influenciam a solubilidade de compostos em água e outros solventes, além de aumentar os pontos de fusão e ebulição das substâncias. (Figura 12) (MELO; GUEDES).

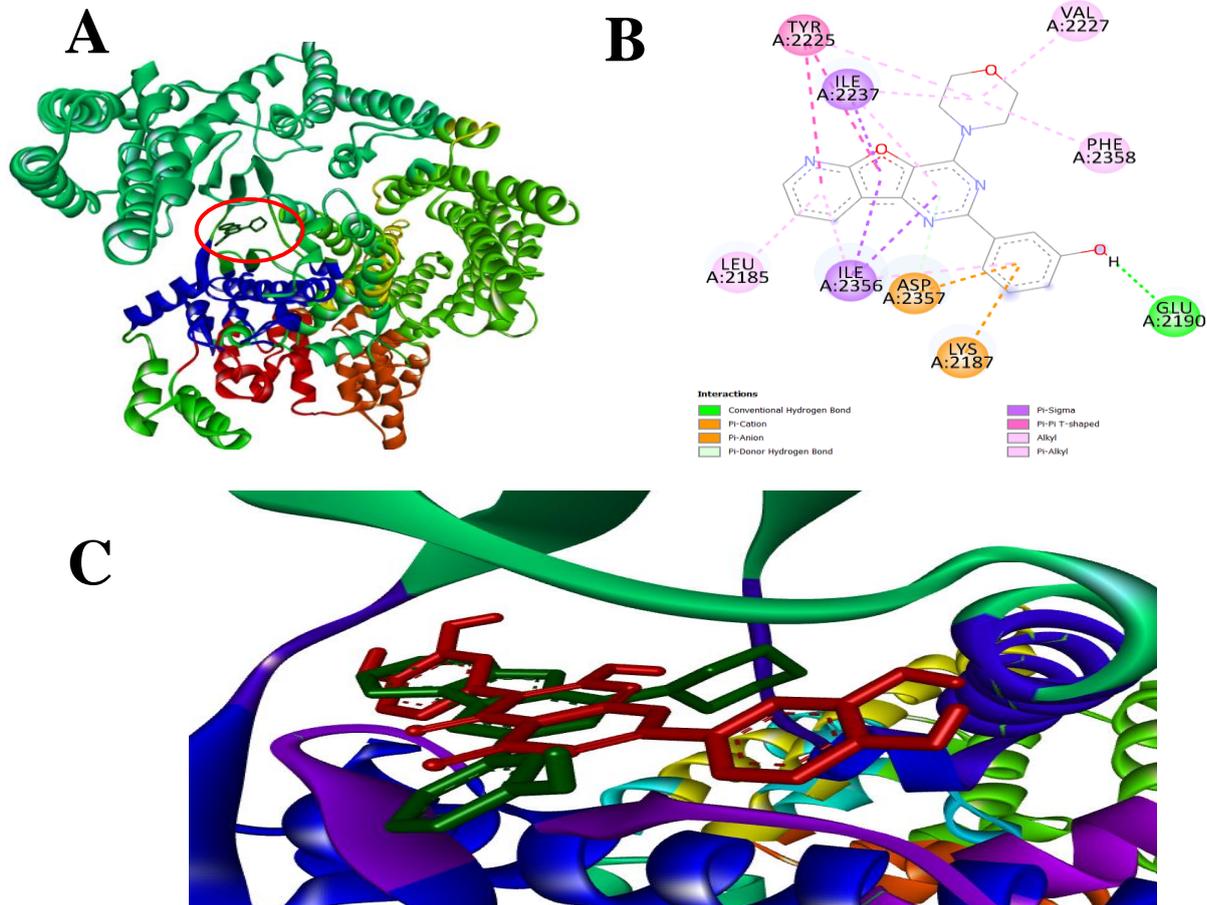
Figura 12 Ancoragem mTOR e Flavo2. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína mTOR e Flavo2 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) painel de superfícies receptoras de doador e aceitador de hidrogênio.



7.7.2 mTOR E PI-103

A ancoragem de mTOR com o fármaco PI-103, um mecanismo interrompe a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, afetando processos celulares como crescimento, continuidade, sobrevivência e metabolismo. (LUO; ZHONG; GUO; ZHANG *et al.*, 2020; PARK; CHAPUIS; BARDET; TAMBURINI *et al.*, 2008). O acoplamento foi realizado no sítio de ligação do ATP para comparação e avaliação da atividade inibitória do composto Flavo2. O fármaco interagiu com 9 resíduos, formando ligações convencionais de hidrogênio com Glu-2190, uma ligação de hidrogênio do doador Pi com Leu-2185, Ile-2356, Asp-2357, uma interação PI-Sigma com Ile-2237 e Ile-2356, ligações Alkyl e PI-Alkyl com Leu-2185, Val-2227, Phe-2358, ligações Pi ânion e Pi cátion com Asp-2357 e Lys-2187 e ligações Pi-Pi com Tyr-2225. A ancoragem do medicamento PI-103 não interagiu com nenhum dos resíduos cruciais para inibir a atividade de mTOR e obteve uma energia de ligação de -8,78, muito próxima da energia encontrada para o composto Flavo2, que foi de -8,74. (Figura 13).

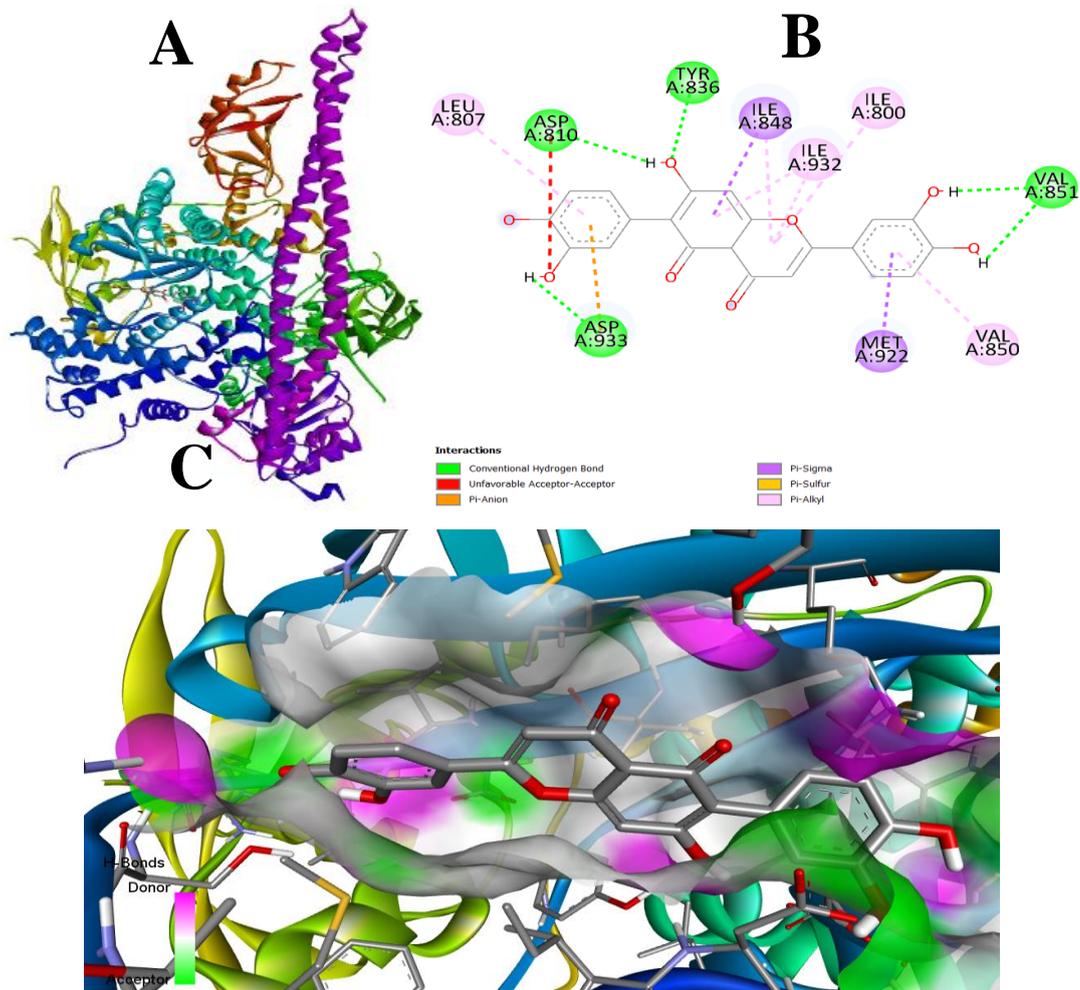
Figura 13 Ancoragem mTOR e PI-103. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína mTOR e PI-103 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) Sobreposição da ancoragem de mTOR- Flavo2 e mTOR-PI-103 para validar a presença dos ligantes no mesmo sítio.



7.7.3 PI3K E FLAVO2

O sítio de ligação do ATP na PI3K está localizado em uma fenda entre os lóbulos N e C-terminal do seu domínio catalítico p110 α (AZEVEDO, 2022). A docagem com PI3K com Flavo2 interagiu com 10 resíduos, formando ligações convencionais de hidrogênio com Asp-810, Asp-933, Tyr 836 e Val-851, ligação PI-Sigma com Ile-848 e Met-922, PI-Alkyl com Ile-800, Val-850 e Ile-932. Val-851 e Ligações Pi ânion e Pi enxofre com Asp-933. A análise da ancoragem revelou uma energia de ligação baixa, elaborada em -7,89, proporcionando uma interação significativa com o resíduo crucial para a inibição da atividade de PI3K. A ligação de hidrogênio com a Val-851, pode desempenhar um papel fundamental na eficácia do composto, este resultado sugere que a estrutura Flavo2 Pode conter um potencial significativo para atividade inibitória de PI3K. (Figura 14).

Figura 14. Ancoragem de PI3K e Flavo2. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína PI3K e Flavo2 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) painel de superfícies receptoras de doador e aceptor de hidrogênio.

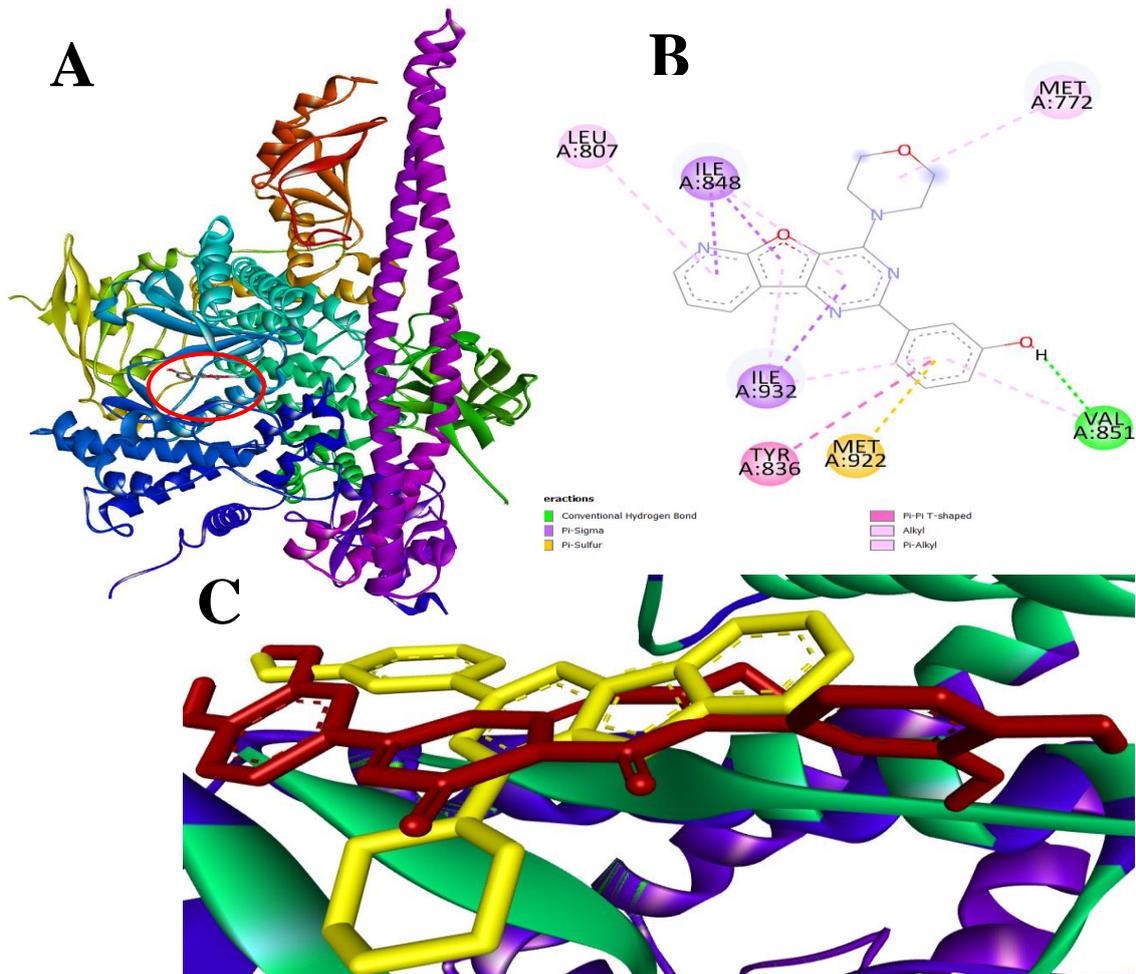


7.7.4 PI3K E PI-103

O acoplamento de PI3K com PI-103 fármaco inibidor dual de mTOR/PI3K obteve 7 interações. Estas incluem ligações convencionais de hidrogênio com Val-851, interações PI-Sigma com Ile-848 e Ile-932, além de ligações Alkyl e PI-Alkyl com Leu-807 e Met-772. Adicionalmente, foram identificadas ligações Pi enxofre com Met-922 e ligações Pi-Pi com Tyr-836. A energia de ligação resultante foi calculada em -7,33, estabelecendo uma forte interação entre as moléculas. É importante notar que houve interação com o principal resíduo envolvido na inibição de PI3K. (Figura 15).

Figura 15. Ancoragem mTOR e PI-103. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína PI3K e PI-

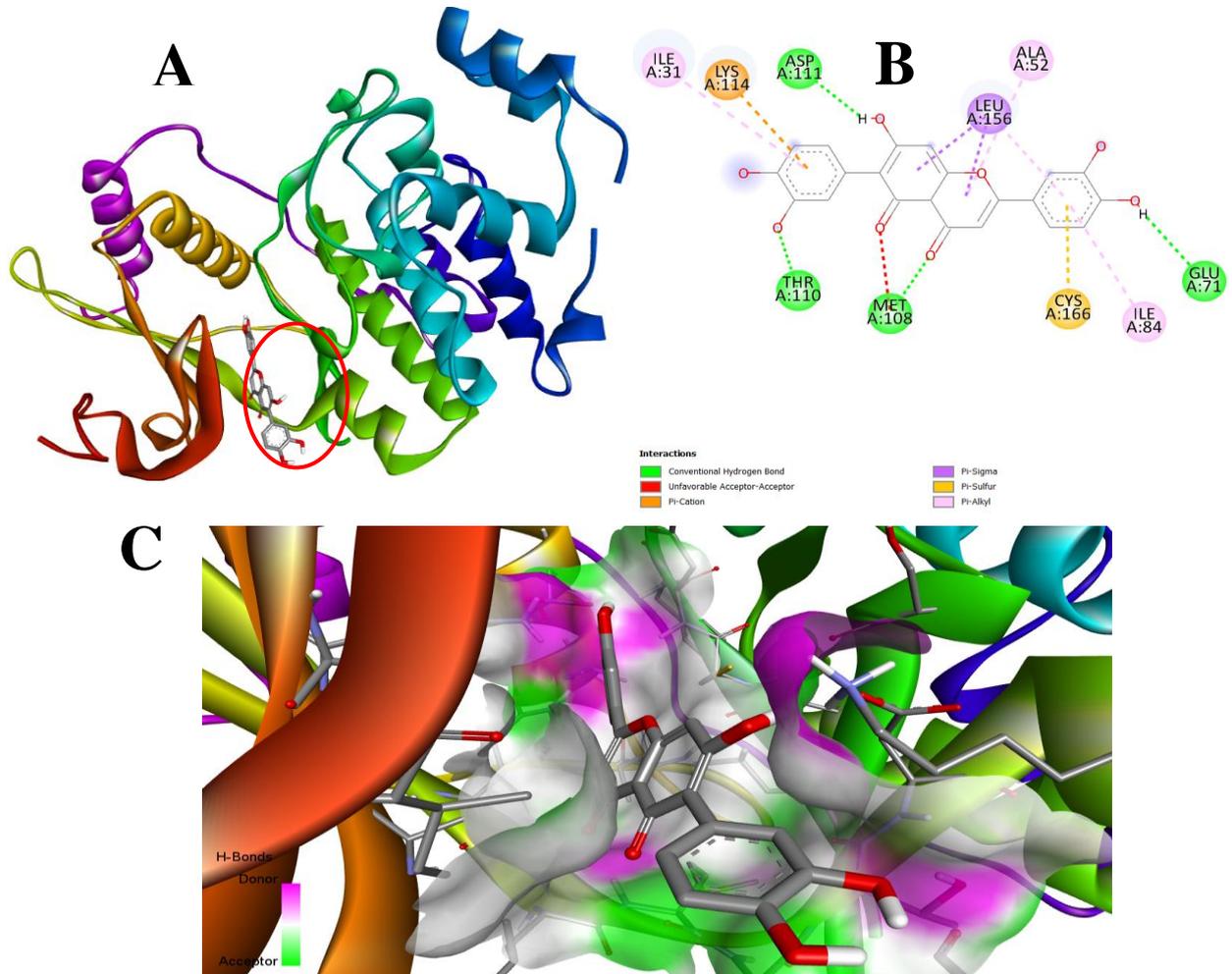
103 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) Sobreposição da ancoragem de PI3K- Flavo2 e PI3K-PI-103 para validar a presença dos ligantes no mesmo sítio.



7.7.5. ERK E FLAVO2

A ERK é uma enzima quinase responsável pela fosforilação de grupos fosfatos a resíduos de serina ou treonina em proteínas que contêm a sequência-alvo Ser/Thr. O sítio de ligação do ATP na ERK está localizado em seu domínio quinase, onde ocorre a transferência de grupos fosfatos do ATP para os substratos da ERK. A ancoragem da ERK resultou em interações convencionais de hidrogênio com Asp-111, Thr-110, Met-108 e Glu-71, interações Pi catiônica e Pi enxofre com Lys-114, Cys-166, interações Pi alquila com os resíduos Ile- 31, Ala-52 e Ile-84, e interações Pi-sigma com Leu-156. O composto Flavo2 interagiu com Met-108, um resíduo chave na região conhecida como "dobradiça", onde a adenina do ATP se liga à ERK2, apresentando uma energia de ligação de -7,64. Essa interação é fundamental para fornecer a energia necessária para a atividade catalítica da enzima (figura 16).

Figura 16. Ancoragem de ERK e Flavo2. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína ERK e Flavo2 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) painel de superfícies receptoras de doador e aceitador de hidrogênio.

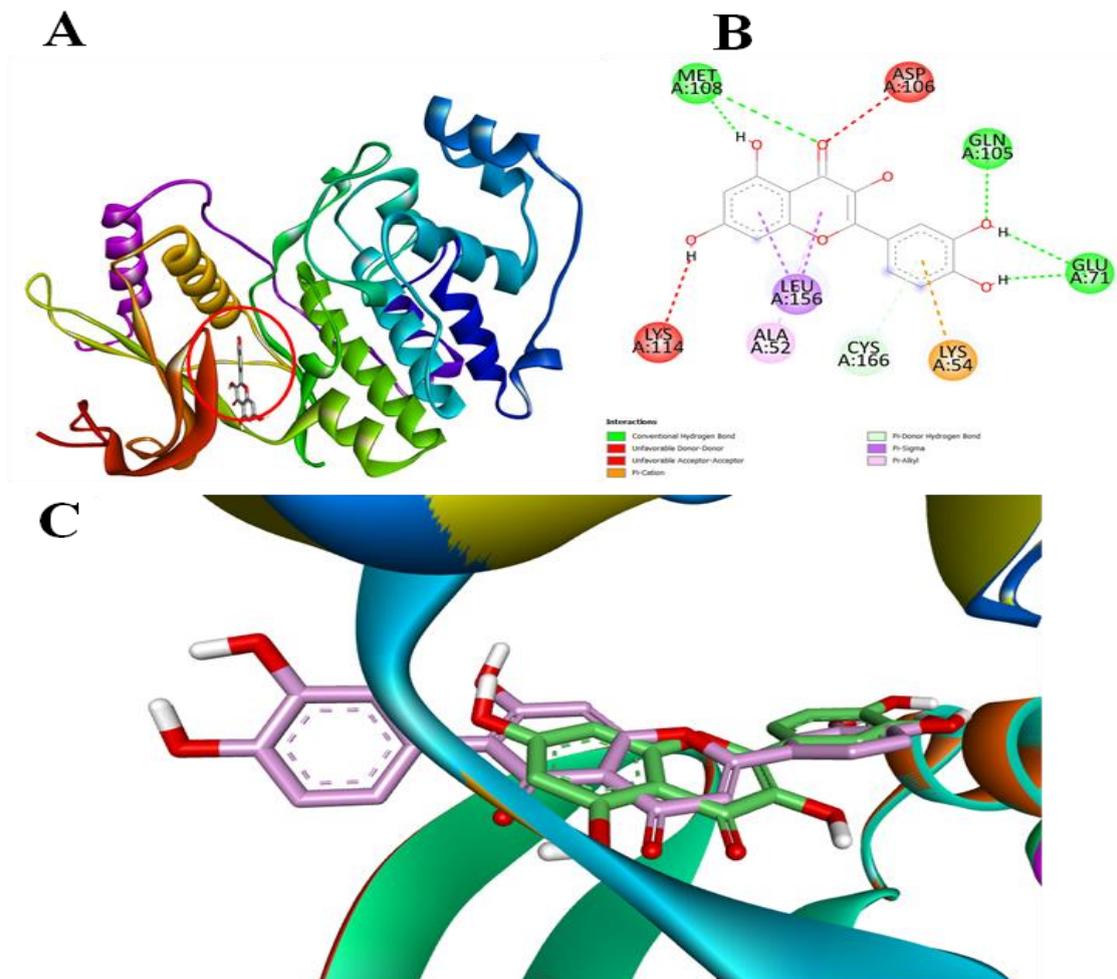


7.7.6 ERK E ULIXERTINIBE

O ulixertinibe é um inibidor específico de ERK que demonstrou reduzir o crescimento tumoral e induzir a regressão tumoral em modelos de xenoenxerto mutante BRAF e RAS (JI; YANG; LEI; CAI *et al.*, 2018). A ancoragem de ERK com ulixertinibe apresentou uma energia de ligação de -7.65, interagindo com 9 aminoácidos e apresentando ligações de hidrogênio com Met-108, um resíduo chave na região conhecida como "dobradiça", Gln-105 e Glu-71, ligações Pi-sigma com o resíduo Leu-156, Pi alkyl com Ala-52, ligações não favoráveis doador-doador com Asp-106 e Lys-114, doador de ligação de hidrogênio pi com Cys-166 e Pi cátion com Lys-54. Quando avaliadas as interações e a energia de ligação, o Flavo2 demonstrou uma energia de ligação muito próxima à do fármaco de referência, registrando um valor de -7,64. Esse

resultado sugere que o Flavo2 possui um potencial promissor em termos de atividade farmacológica (figura 17).

Figura 17 Ancoragem ERK e Ulixertinibe. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína ERK e Ulixertinibe no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) Sobreposição da ancoragem de ERK- Flavo2 e ERK- Ulixertinibe para validar a presença dos ligantes no mesmo sítio.

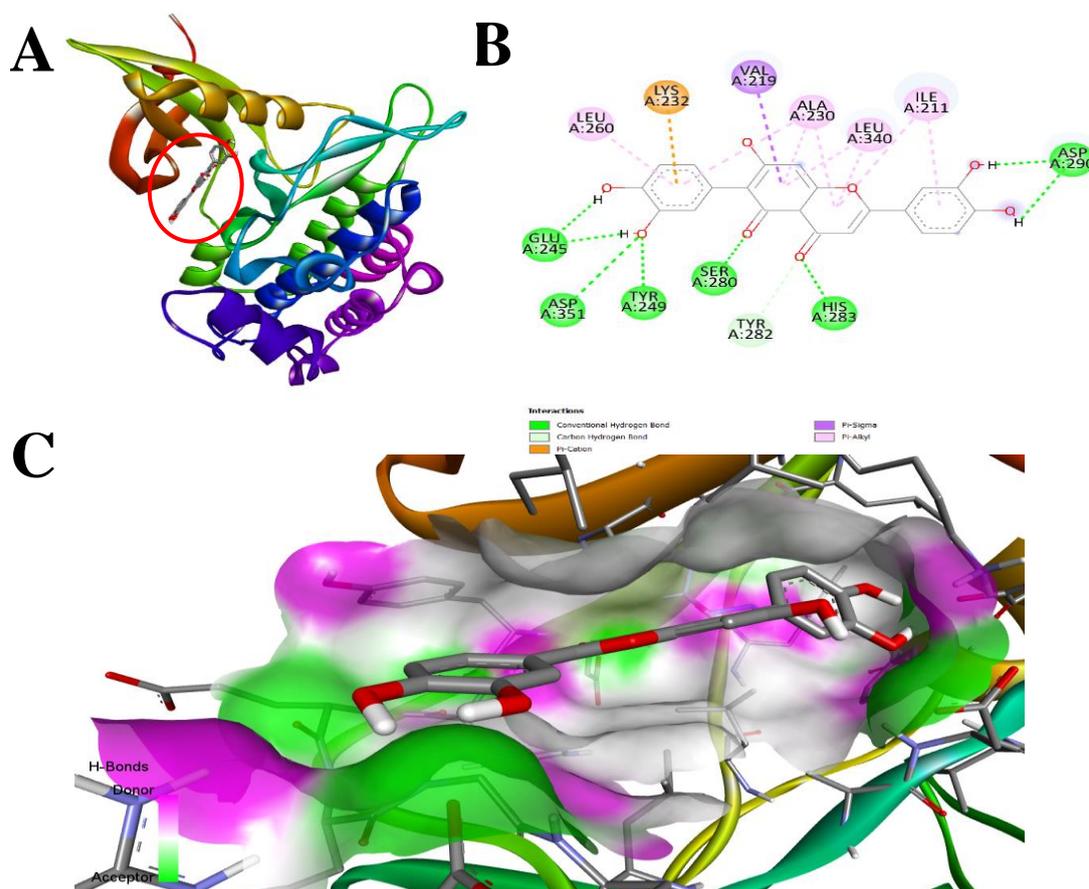


7.7.7 TGF β R1 E FLAVO2

O TGF β é reconhecido como uma citocina imunossupressora poderosa. A inibição de sua sinalização é capaz de reverter essa supressão, ativando assim respostas imunes adaptativas. O receptor TGF β tipo 1 (TGF β R1), ao ser inibido, anula a ativação da via canônica, bloqueando a sinalização através de todos os três ligantes do TGF β , atuando assim, como um supressor tumoral (LEI; XU; WANG; YANG *et al.*, 2014; MELISI; HOLLEBECQUE; OH; CALVO *et al.*, 2019). A ancoragem de TGF β R1 com Flavo2 demonstrou uma forte interação, com uma

energia de ligação de -9.80. Esta interação envolveu diversas interações, incluindo ligações convencionais de hidrogênio com a His-283, resíduo-chave para a inibição da proteína, além dos resíduos Glu-245, Asp-351, Tyr-249, Ser-280 e Asp-290, interações de ligação Pi-sigma com a Val-219, e ligações Pi alkyl com Leu-260, Ala-230, Ile-211 e Leu340, uma interação de ligação carbono-hidrogênio com o resíduo Ile-211 e uma interação cátion com o resíduo Lys-232. Essas interações são fundamentais para a estabilidade da ligação entre TGFβR1 e o composto Flavo2, e podem ser exploradas para novos fármacos com potencial atividade inibitória (figura 18).

Figura 18 Ancoragem de TGFβR1 e Flavo2. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína TGFβR1 e Flavo2 no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) painel de superfícies receptoras de doador e aceitador de hidrogênio.

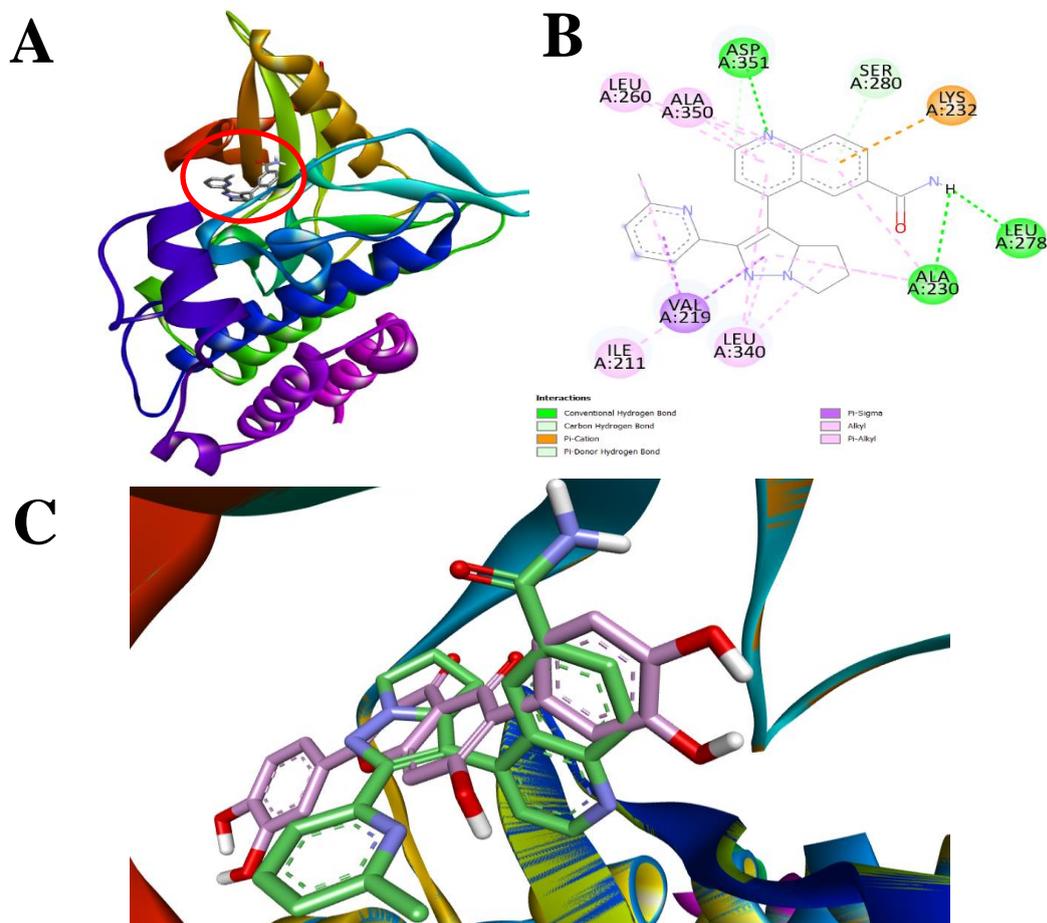


7.7.8 TGFβR1 E GALUNISERTINIBE

O Galunisertib (LY2157299) é um inibidor seletivo de moléculas pequenas do receptor TGF-β tipo I. Foi utilizado como fármaco de referência para comparar a eficiência do composto Flavo2. A ancoragem do Galunisertib obteve uma energia de ligação de -9.95, ligeiramente

superior ao Flavo2 em cerca de 0.15, uma diferença não significativa. Apesar de estar acoplado no mesmo sítio, o fármaco não interagiu com o resíduo chave para a inibição da proteína. No entanto, foram observadas ligações de hidrogênio com Ala-230, Leu-278 e Asp-351, além de ligações de carbono-hidrogênio e doador de ligação de hidrogênio Pi com Ser-280. Também foram identificadas ligações alkyl e Pi alkyl com Leu-280, Ile-211, Ala-350 e Leu-340, e por fim, ligações Pi cátion com Lys-232 (figura 19).

Figura 19 Ancoragem TGF β R1 e Galunisertinibe. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína TGF β R1 e Galunisertinibe no sítio de ATP, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) Sobreposição da ancoragem de TGF β R1- Flavo2 e TGF β R1- Galunisertinibe para validar a presença dos ligantes no mesmo sítio.

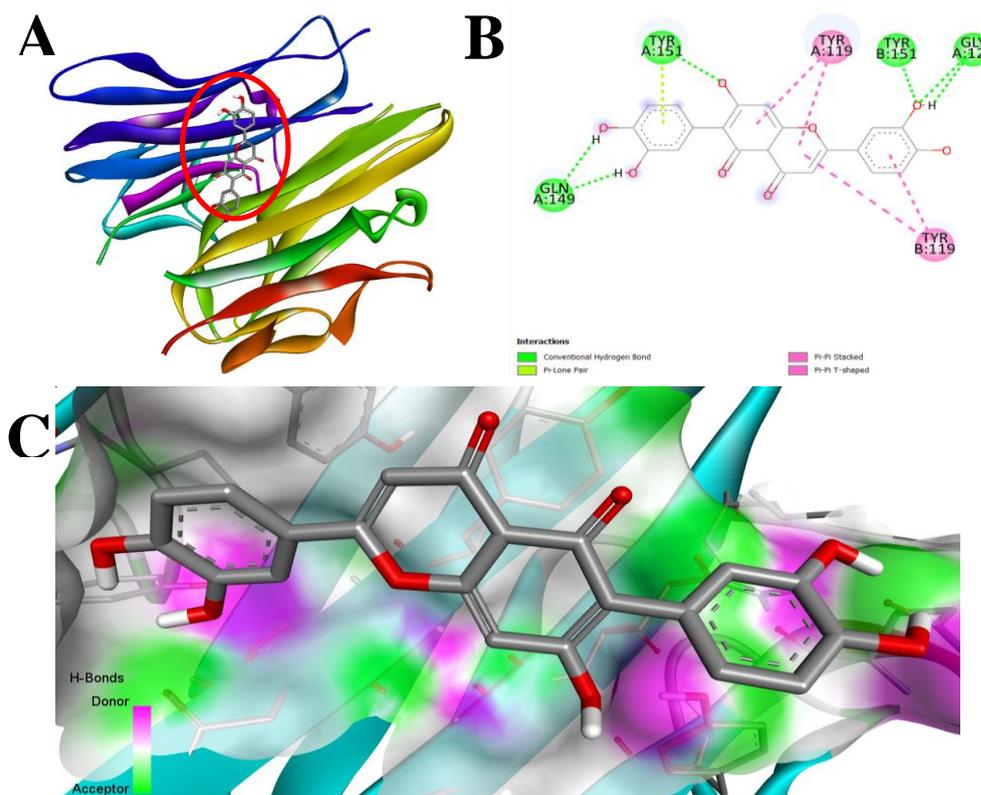


7.7.9 TNF- α E FLAVO2

O TNF- α é uma proteína trimérica que desempenha papéis cruciais na regulação do sistema imunológico e na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer, torna-o um alvo importante para a terapia do câncer. A ancoragem com o composto Flavo2, obteve como energia

de ligação -7,69 e ligação de Pi-Pi e Pi-Pi empilhado com Tyr-119, resíduo essencial para a inibição da atividade de TNF- α . As ligações químicas formadas podem ser classificadas como simples e duplas, de acordo com a teoria de Lewis. A ligação simples ocorre pela interação entre os orbitais atômicos s-s, s-p e px-px. Essas ligações são designadas como ligações σ (sigma) pela teoria de ligação de valência. Por outro lado, a ligação conhecida por dupla ocorre pela interação dos orbitais atômicos py-py e pz-pz. Essas ligações duplas são denominadas ligações π (Pi). Obteve também ligações pi solitários e convencionais de hidrogênio com Tyr-151 de cadeia A e ligações convencionais de hidrogênio com Tyr-151 na cadeia B, Gln-149 e Gly-121. Esses padrões de interação sugerem um potencial para a inibição eficaz da atividade do TNF- α (figura 20).

Figura 20 Ancoragem de TNF- α e Flavo2. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína TNF- α e Flavo2, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) painel de superfícies receptoras de doador e aceitador de hidrogênio.

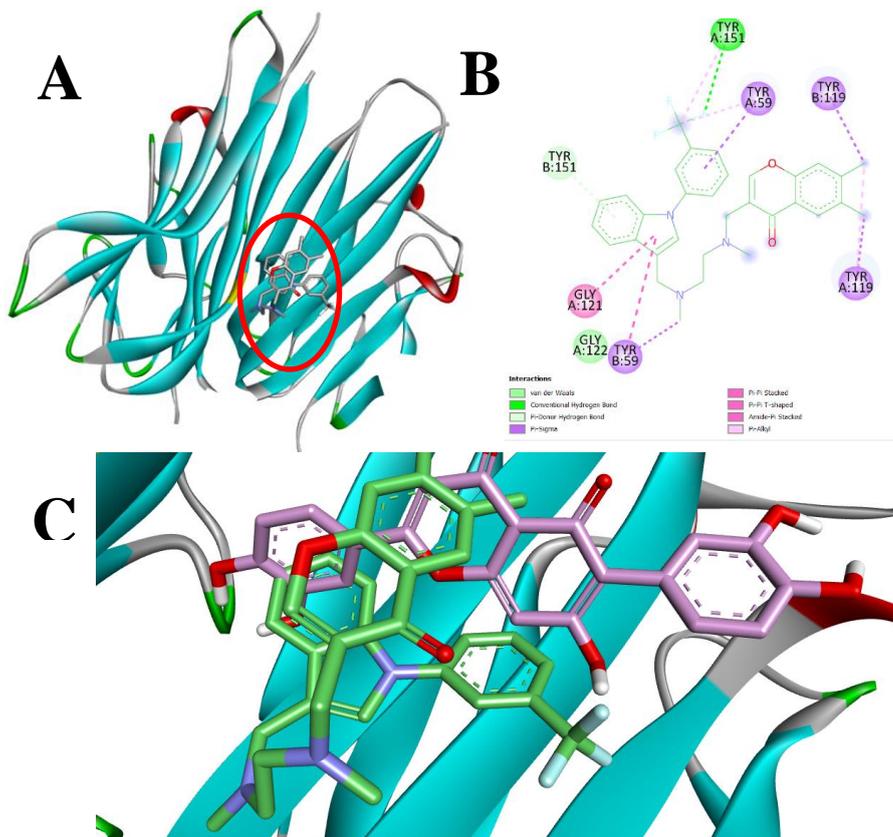


7.7.10 TNF- α E SPD304

SPD-304 foi descoberto como um antagonista promissor do fator de necrose tumoral alfa (TNF) que promove dissociação dos trímeros do TNF e, portanto, bloqueia a interação do

TNF e seu receptor.(ALEXIOU; PAPAKYRIAKOU; NTOUGKOS; PAPANEOPHYTOU *et al.*, 2014) A ancoragem com o fármaco de referência para inibição de TNF- α , obteve uma energia de ligação de -7,60, inferior ao composto Flavo2 e interagiu com os resíduos chaves para a inibição Tyr-119 de cadeia A e B formando ligações Pi sigma, também obteve a mesma ligação com a Tyr-59 A/B, ligações de van der waals com a Gly-112, Ligações Pi-Pi com a Gly-121 e Ligações convencionais de hidrogênio e Pi alkyl com a Tyr-151. Apesar de interagir com resíduos-chave, o Flavo2 demonstrou melhores resultados, alcançando uma energia de ligação mais satisfatória. Essa característica sugere que o Flavo2 pode ser mais eficaz no contexto da sinalização celular, possivelmente devido à sua maior afinidade e interação com os alvos específicos envolvidos (figura 21).

Figura 21 Ancoragem TNF- α e SPD304. (A) Representação 3D da ancoragem da proteína TNF- α e SPD304, (B) representação 2D das interações presentes no acoplamento, (C) Sobreposição da ancoragem de TNF- α - Flavo2 e TNF- α - SPD304 para validar a presença dos ligantes no mesmo sítio.

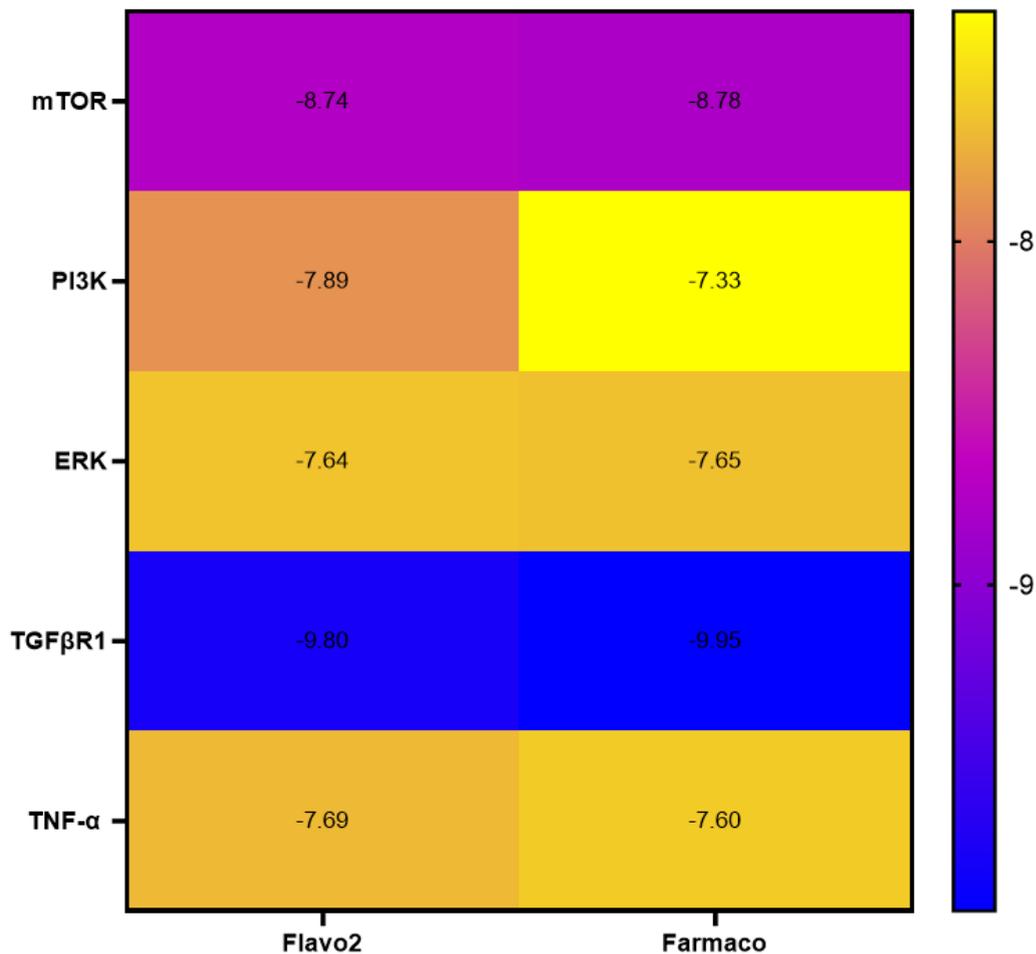


7.8 HEAT MAP DA ANCORAGEM MOLECULAR

O Heat Map foi construído no GraphPad Prism 8.0.2, onde valores menores que -9,80 foram atribuídos à coloração azul, o valor base à coloração roxa e os maiores valores à coloração

amarela. Ao comparar as energias de ligação, juntamente com seus fármacos de referência, mTOR e PI-103, ERK e ulixertinibe apresentaram energia de ligação muito próximos. Por outro lado, PI3K e PI-103, e TNF- α e SPD304 obtiveram valores superiores aos fármacos. O galunisertinibe apresentou uma energia de ligação superior à do TGF β R1, no entanto, isso não diminui a eficiência do Flavo2, que demonstrou uma excelente energia de ligação. Esses resultados sugerem que o Flavo2 possui potencial como candidato terapêutico, com uma eficácia comparável ou até superior a alguns fármacos de referência (figura 22).

Figura 22 Heat Map dos compostos. Heat Map de mTOR, PI3K, ERK, TGF β R1 e TNF- α em comparação com os fármacos referência.



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em busca de descobrir inibidores das proteínas alvo presentes no câncer colorretal (CCR), foi investigada a classe de flavonoides presentes no látex da *Euphorbia tirucalli*. O objetivo foi identificar compostos potencialmente eficazes para o tratamento desse tipo de câncer, com possibilidade de inibir as proteínas estudadas. Ao realizar os estudos de ancoragem molecular e análise das principais interações intermoleculares que resultam na formação do complexo proteína-ligante, observou-se que a energia de ligação do Flavo2 foi superior em proteínas como PI3K e TNF- α . Entretanto, não foram observadas diferenças significativas em relação às outras proteínas estudadas. Esses resultados sugerem que o Flavo2 pode ter um potencial terapêutico relevante para o tratamento do CCR, especialmente devido à sua capacidade de interagir de forma mais eficaz com alvos específicos, como PI3K e TNF- α . Ao avaliar a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade modelos construídos, indicaram que são necessários testes complementares para validar esses resultados e aprimorar as propriedades farmacocinéticas do Flavo2, visando melhorar sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Essas etapas são cruciais para o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros no tratamento do câncer colorretal

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aprimorar as propriedades farmacocinéticas do Flavo2 e potencializar seus efeitos terapêuticos, otimizar sua absorção, distribuição, metabolismo, excreção e parâmetros de toxicidade. Essas abordagens são cruciais para maximizar o potencial terapêutico do Flavo2 e sua viabilidade como candidato a fármaco.

10. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A.; YADAV, M.; NAGPURE, M.; KUMARSAN, S. *et al.* Molecular medicinal insights into scaffold hopping-based drug discovery success. **Drug Discovery Today**, p. 103845, 2023.
- AGARWAL, V.; REHMAN, M.; CHAUDHARY, R.; KAUSHIK, A. S. *et al.* Exploring the Potential of Natural-like Compounds as TNF- α Inhibitors: An In-silico Approach. 2024.
- AGRAWAL, A.; DILLON, S.; DENNING, T. L.; PULENDRAN, B. ERK1 $^{-/-}$ mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, 176, n. 10, p. 5788-5796, 2006.
- AHMAD, I.; KHAN, H.; SERDAROĞLU, G. Physicochemical properties, drug likeness, ADMET, DFT studies, and in vitro antioxidant activity of oxindole derivatives. **Computational Biology and Chemistry**, 104, p. 107861, 2023.
- ALENCAR FILHO, E. B. D. Estudos da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) de adutos de Morita-Baylis-Hillman bioativos contra *Leishmania amazonensis*. 2012.
- ALENCAR, W. L. M. Interações de ftalocianinas de Co, Cu e não metálicas com estruturas externas de SARS-CoV-2 utilizando docking e dinâmica molecular. 2021.
- ALEXIOU, P.; PAPAKYRIAKOU, A.; NTOUGKOS, E.; PAPANEOPHYTOU, C. P. *et al.* Rationally designed less toxic SPD-304 analogs and preliminary evaluation of their TNF inhibitory effects. **Archiv der Pharmazie**, 347, n. 11, p. 798-805, 2014.
- ALI, E. S.; MITRA, K.; AKTER, S.; RAMPROSHAD, S. *et al.* Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer. **Cancer Cell International**, 22, n. 1, p. 1-16, 2022.
- ALMEIDA, T. D. A. W.; DE OLIVEIRA, M. E. L.; ALMEIDA, L. D. A. W.; OLIVEIRA, C. R. V. *et al.* Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes (PSOF) e Colonoscopia no rastreamento do câncer colorretal. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, 23, n. 3, p. e12465-e12465, 2023.
- ALOTAIBI, A. G.; LI, J. V.; GOODERHAM, N. J. Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)-Induced Metastatic Phenotype in Colorectal Cancer Epithelial Cells: Mechanistic Support for the Role of MicroRNA-21. **Cancers**, 15, n. 3, p. 627, 2023.
- ARAUJO, M. Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, Universidade ... 2012.
- ARAÚJO, A. P. L. M. G. D. **O papel da glicoproteína-P nas interações fármaco-fármaco**. 2015. -, [sn].
- ASIAMA, I.; OBIRI, S. A.; TAMEKLOE, W.; ARMAH, F. A. *et al.* Applications of molecular docking in natural products-based drug discovery. **Scientific African**, 20, p. e01593, 2023.
- ATTIA, G.; MASCRET, A.; ZERROUKI, C.; FOURATI, N. *et al.* Data of the quantification of the influence of DMSO concentration on the kinetic of interaction between TNF α and SPD304. **Data in Brief**, 39, p. 107610, 2021.
- AZEVEDO, F. F. N. **Identificação de compostos de origem vegetal com potencial farmacológico sobre as proteínas PI3K α e mTOR**. Orientador: ZANATTA, P. D. G. 2022. 72 f. - DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

- BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of medicinal chemistry**, 53, n. 7, p. 2719-2740, 2010.
- BAIG, M. H.; AHMAD, K.; RABBANI, G.; DANISHUDDIN, M. *et al.* Computer aided drug design and its application to the development of potential drugs for neurodegenerative disorders. **Current neuropharmacology**, 16, n. 6, p. 740-748, 2018.
- BAIG, M. H.; AHMAD, K.; ROY, S.; ASHRAF, J. M. *et al.* Computer Aided Drug Design: Success and Limitations. **Curr Pharm Des**, 22, n. 5, p. 572-581, 2016.
- BANERJEE, P.; ECKERT, A. O.; SCHREY, A. K.; PREISSNER, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic acids research**, 46, n. W1, p. W257-W263, 2018.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, P. H.; CARNEIRO, F.; MARTELLI, A.; TRIGO, E. L. Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. **Archives of Health Investigation**, 7, n. 3, 2018.
- BARBOSA, R.; ACEVEDO, L. A.; MARMORSTEIN, R. The MEK/ERK network as a therapeutic target in human cancer. **Molecular Cancer Research**, 19, n. 3, p. 361-374, 2021.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014. 8582711182.
- BARROS, A. G. 25 A ADMET.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G. *et al.* Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 15, n. 3, p. 285-292, 2008.
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 85, p. 25-27, 2005.
- BICKERTON, G. R.; PAOLINI, G. V.; BESNARD, J.; MURESAN, S. *et al.* Quantifying the chemical beauty of drugs. **Nature chemistry**, 4, n. 2, p. 90-98, 2012.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química nova**, 30, p. 651-666, 2007.
- BINCKLEY, S.; ZAHRA, F. Euphorbia Tirucalli. 2021.
- BLATT, C. R.; BECKER, M. W.; LUNARDELI, M. J. M. Lesão hepática induzida por medicamentos: qual o papel do farmacêutico clínico. **Revista brasileira de farmácia hospitalar e serviços de saúde**, 7, n. 4, 2016.
- BRANCHINI, G. Estabelecimento de cultura primária de células de carcinoma prostático e avaliação da resposta ao silenciamento por RNAi do receptor de androgênio e seu correpressor NCoR. 2011.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL, O. OMS: câncer mata 8, 8 milhões de pessoas anualmente no mundo. 2019.

BUTINA, D.; SEGALL, M. D.; FRANKCOMBE, K. Predicting ADME properties in silico: methods and models. **Drug discovery today**, 7, n. 11, p. S83-S88, 2002.

BÖHM, H.-J.; FLOHR, A.; STAHL, M.

CALLEGARI, D. P. Desacetilases de histonas no câncer colorretal: expressão gênica, indicadores prognósticos e perspectivas para a terapia epigenética. 2021.

CARDIAL, G. M.; MACIEL, L. T.; ALMEIDA, T. F.; CARDOSO, T. C. *et al.* Os efeitos farmacológicos e tóxicos da planta medicinal *Euphorbia tirucalli*: uma revisão sistemática. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, 15, n. 11, p. 14146-14166, 2023.

CHAN, D. S.-H.; LEE, H.-M.; YANG, F.; CHE, C.-M. *et al.* Structure-based discovery of natural product-like TNF- α inhibitors. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, 49, n. 16, p. 2860, 2010.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food chemistry**, 138, n. 4, p. 2099-2107, 2013.

CHEN, Y.; ZHOU, X. Research progress of mTOR inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, 208, p. 112820, 2020.

COHEN, S. M. The relevance of experimental carcinogenicity studies to human safety. **Current Opinion in Toxicology**, 3, p. 6-11, 2017.

COLE, S. P. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 54, p. 95-117, 2014.

COSTA, A. M.; SILVA, V. V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, 5, n. 2, p. 1-13, 2017.

COSTA, K. P. Fava-d' anta: extrativismo, produção e flavonoides. 2020.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N.; MADEIRA, S. V. F. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRUCERIU, D.; BALDASICI, O.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEAGOE, I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. **Cellular Oncology**, 43, p. 1-18, 2020.

CUPERTINO, A.; MARCONDES, M. Â.; GATTI, R. M. ESTUDO RETROSPECTIVO DAS REAÇÕES ADVERSAS E INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS NA QUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA: RELATO DE CASO RETROSPECTIVE STUDY OF ADVERSE REACTIONS AND DRUG INTERACTIONS IN THE CHEMOTHERAPY TREATMENT OF BREAST CANCER: CASE REPO. **Revista de Atenção à Saúde**, 6, n. 17, 2008.

DA MATA RODRIGUES, J. S.; COSTA, E. D. Previsão in silico ADME/T de novos inibidores potenciais contra o vírus da dengue. **Research, Society and Development**, 10, n. 4, p. e53010414459-e53010414459, 2021.

DA SILVA, D. D. C.; ORFALI, G. D. C.; SANTANA, M. G.; PALMA, J. K. Y. *et al.* Antitumor effect

of isoquercetin on tissue vasohibin expression and colon cancer vasculature. **Oncotarget**, 13, p. 307, 2022.

DANIELSEN, S. A.; EIDE, P. W.; NESBAKKEN, A.; GUREN, T. *et al.* Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 1855, n. 1, p. 104-121, 2015.

DAS, A.; MATADA, G. S. P.; DHIWAR, P. S.; RAGHAVENDRA, N. M. *et al.* Molecular recognition of some novel mTOR kinase inhibitors to develop anticancer leads by drug-likeness, molecular docking and molecular dynamics based virtual screening strategy. **Computational Toxicology**, 25, p. 100257, 2023.

DE MACEDO, K. G.; DE MELO FILHO, C. C.; ANDRADE, C. H. Avaliação in silico da toxicidade de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 10, n. 1, p. 1-1, 2013.

DE MELLO, P. A.; ROCHA, B. G.; OLIVEIRA, W. N.; MENDONÇA, T. S. *et al.* Nefrotoxicidade e alterações de exames laboratoriais por fármacos: revisão da literatura. **Revista de Medicina**, 100, n. 2, p. 152-161, 2021.

DE OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; DE FARIAS PRESGRAVE, R. *et al.* Ensaio da membrana córneo-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 71, n. 1, p. 153-159, 2012.

DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE LIMA, F. C. D. S.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 69, n. 1, 2023.

DE OLIVEIRA, T. F. R. **Via de Sinalização Mtor e Efeito dos Seus Inibidores no Tratamento do Câncer**. 2013. -, Universidade Fernando Pessoa (Portugal).

DE SOUZA, W. F.; DÍAZ, J. A. M. DESORGANIZAÇÃO DO COMPLEXO JUNCIONAL APICAL MEDIADO PELAS PROTEÍNAS E-CADERINA E CLAUDINAS DURANTE A PROGRESSÃO DO CÂNCER COLORRETAL: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS. 2013.

DELUCIA, R. **Farmacologia integrada**. Clube de Autores, 2012.

DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. Capítulo 23 Farmacologia do Sistema Nervoso Central. **Farmacologia Integrada**, p. 223, 2006.

DI CAMILLO ORFALI, G.; DUARTE, A. C.; BONADIO, V.; MARTINEZ, N. P. *et al.* Review of anticancer mechanisms of isoquercetin. **World journal of clinical oncology**, 7, n. 2, p. 189, 2016.

DIOGO, C. A. S. **Interações Farmacológicas Envolvendo a Glicoproteína-p: O Caso Particular da Digoxina: Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária, Farmácia Hospitalar e Investigação**. 2014. -, Universidade da Beira Interior (Portugal).

DO NASCIMENTO, V. P.; PAZ, K. F.; LIMA, R. A. Avaliação dos efeitos encontrados pelo uso de *Euphorbia tirucalli* L.(Euphorbiaceae) no tratamento contra o câncer. **Educamazônia-Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, 25, n. 2, jul-dez, p. 346-358, 2020.

DOEDENS, J. R.; MAHIMKAR, R. M.; BLACK, R. A. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. **Biochemical and biophysical research communications**, 308, n. 2, p. 331-338, 2003.

DORNAS, W. C. A.; OLIVEIRA, T. T. D.; DORES, R. G. R. D.; SANTOS, A. F. D. *et al.* Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. 2007.

DOS SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

DOS SANTOS NETO, C.; DA SILVA AGUIAR, B.; DA SILVA NETO, L. P.; AGUIAR, I. C. *et al.* AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS: UMA REVISÃO. **Revista Contemporânea**, 4, n. 4, p. e3690-e3690, 2024.

DUAN, Y.-J.; FU, L.; ZHANG, X.-C.; LONG, T.-Z. *et al.* Improved GNNs for Log D 7.4 Prediction by Transferring Knowledge from Low-Fidelity Data. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 63, n. 8, p. 2345-2359, 2023.

EBRAHIMI, M.; KHAYAMIAN, T.; GHARAGHANI, S. Interactions between activin-like kinase 5 (ALK5) receptor and its inhibitors and the construction of a docking descriptor-based QSAR model. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23, p. 2043-2092, 2012.

ERNST, M.; GRACE, O. M.; SASLIS-LAGOUDAKIS, C. H.; NILSSON, N. *et al.* Global medicinal uses of Euphorbia L.(Euphorbiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, 176, p. 90-101, 2015.

ERTL, P.; ROGGO, S.; SCHUFFENHAUER, A. Natural product-likeness score and its application for prioritization of compound libraries. **Journal of chemical information and modeling**, 48, n. 1, p. 68-74, 2008.

ERTL, P.; SCHUFFENHAUER, A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. **Journal of cheminformatics**, 1, p. 1-11, 2009.

FAES, S.; DORMOND, O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. **International journal of molecular sciences**, 16, n. 9, p. 21138-21152, 2015.

FANG CHIA, B. Rastreamento para câncer colorretal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 48, p. 286-286, 2002.

FANG, J. Y.; RICHARDSON, B. C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. **The lancet oncology**, 6, n. 5, p. 322-327, 2005.

FERRARI, I.; DI MARIO, M. Prediction of physic-chemical property/Biological Activity and ADMET (absorption, distribution, mechanism, excretion, and toxicity) parameters of approved HIV Medications. **Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences Vol**, 9, n. 1, 2022.

FERREIRA, L. L.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug discovery today**, 24, n. 5, p. 1157-1165, 2019.

FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**, 25, p. 439-448, 2002.

FLORES-HOLGUÍN, N.; FRAU, J.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Computational Pharmacokinetics Report, ADMET Study and Conceptual DFT-Based Estimation of the Chemical Reactivity Properties of Marine Cyclopeptides. **ChemistryOpen**, 10, n. 11, p. 1142-1149, 2021.

FLORÉZ, L. M. M.; FÊO, H. B.; ROCHA, N. S. Canine transmissible venereal tumor: expression of MDR-1, and TP53 and BCL-2 family genes and its implications in biological and therapeutic behavior.

GAMEIRO, R. L. **Modelos de avaliação de neurotoxicidade**. 2016. -, Egas Moniz School of Health & Science (Portugal).

GELDENHUYS, W. J.; NAKAMURA, H. 3D-QSAR and docking studies on transforming growth factor (TGF)- β receptor 1 antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, n. 6, p. 1918-1923, 2010.

GERMANN, U. A.; FUREY, B. F.; MARKLAND, W.; HOOVER, R. R. *et al.* Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib). **Molecular cancer therapeutics**, 16, n. 11, p. 2351-2363, 2017.

GLAVIANO, A.; FOO, A. S.; LAM, H. Y.; YAP, K. C. *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. **Molecular Cancer**, 22, n. 1, p. 1-37, 2023.

GULHATI, P.; BOWEN, K. A.; LIU, J.; STEVENS, P. D. *et al.* mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. **Cancer research**, 71, n. 9, p. 3246-3256, 2011.

GUPTA, S.; GREWAL, A. S.; DESWAL, G.; SINGH, S. *et al.* In silico docking studies of Yucca gloriosa L. phytoconstituents with TNF- α , IL-6 and IL-13 receptor against Asthma. **Chemical Biology Letters**, 10, n. 1, p. 509-509, 2023.

HABENSCHUS, M. D. **Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (-)-grandisina utilizando microssomas hepáticos de humanos**. 2016. -, Universidade de São Paulo.

HALDER, S. K.; BEAUCHAMP, R. D.; DATTA, P. K. A specific inhibitor of TGF- β receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. **Neoplasia**, 7, n. 5, p. 509-521, 2005.

HAY, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer cell**, 8, n. 3, p. 179-183, 2005.

HE, M. M.; SMITH, A. S.; OSLOB, J. D.; FLANAGAN, W. M. *et al.* Small-molecule inhibition of TNF- α . **Science**, 310, n. 5750, p. 1022-1025, 2005.

HE, Y.; SUN, M. M.; ZHANG, G. G.; YANG, J. *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, 6, n. 1, p. 425, 2021.

HINCK, A. P. Structural studies of the TGF- β s and their receptors—insights into evolution of the TGF- β superfamily. **FEBS letters**, 586, n. 14, p. 1860-1870, 2012.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.

HOLMGAARD, R. B.; SCHAER, D. A.; LI, Y.; CASTANEDA, S. P. *et al.* Targeting the TGF β pathway with galunisertib, a TGF β RI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. **Journal for immunotherapy of cancer**, 6, p. 1-15, 2018.

HOQUE, I.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYA, S.; BISWAS, R. An approach of computer-aided drug design (CADD) tools for in silico pharmaceutical drug design and development. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci**, 4, n. 2, p. 60-71, 2017.

HUSE, M.; CHEN, Y.-G.; MASSAGUÉ, J.; KURIYAN, J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12. **Cell**, 96, n. 3, p. 425-436, 1999.

IMRAN, M.; SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; ASLAM GONDAL, T. *et al.* Kaempferol: A key

emphasis to its anticancer potential. **Molecules**, 24, n. 12, p. 2277, 2019.

IVANENKOV, Y. A.; ZAGRIBELNYY, B. A.; ALADINSKIY, V. A. Are we opening the door to a new era of medicinal chemistry or being collapsed to a chemical singularity? Perspective. **Journal of medicinal chemistry**, 62, n. 22, p. 10026-10043, 2019.

JESUS, S. M. D. Estudo da farmacocinética pré-clínica do Benznidazol no modelo cão. 2023.

JI, N.; YANG, Y.; LEI, Z.-N.; CAI, C.-Y. *et al.* Ulixertinib (BVD-523) antagonizes ABCB1-and ABCG2-mediated chemotherapeutic drug resistance. **Biochemical Pharmacology**, 158, p. 274-285, 2018.

JONNALAGADDA, B.; AROCKIASAMY, S.; VETRIVEL, U.; PA, A. In silico docking of phytocompounds to identify potent inhibitors of signaling pathways involved in prostate cancer. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 39, n. 14, p. 5182-5208, 2021.

KASHYAP, D.; SHARMA, A.; TULI, H. S.; SAK, K. *et al.* Kaempferol—A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. **Journal of functional foods**, 30, p. 203-219, 2017.

KOHNO, M.; POUYSSEGUR, J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. **Annals of medicine**, 38, n. 3, p. 200-211, 2006.

KOSUGI, T.; OHUE, M., 2021, **Quantitative estimate of protein-protein interaction targeting drug-likeness**. IEEE. 1-8.

KUBINA, R.; IRITI, M.; KABAŁA-DZIK, A. Anticancer potential of selected flavonols: Fisetin, kaempferol, and quercetin on head and neck cancers. **Nutrients**, 13, n. 3, p. 845, 2021.

KUMAR, T. A.; ATHAVAN, A. A. S.; LOGANATHAN, C.; SARAVANAN, K. *et al.* Design, 3D QSAR modeling and docking of TGF- β type I inhibitors to target cancer. **Computational biology and chemistry**, 76, p. 232-244, 2018.

LAMPROPOULOS, P.; ZIZI-SERMPETZOGLOU, A.; RIZOS, S.; KOSTAKIS, A. *et al.* Prognostic significance of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling axis molecules and E-cadherin in colorectal cancer. **Tumor Biology**, 33, p. 1005-1014, 2012a.

LAMPROPOULOS, P.; ZIZI-SERMPETZOGLOU, A.; RIZOS, S.; KOSTAKIS, A. *et al.* TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. **Cancer letters**, 314, n. 1, p. 1-7, 2012b.

LEI, Z.; XU, G.; WANG, L.; YANG, H. *et al.* MiR-142-3p represses TGF- β -induced growth inhibition through repression of TGF β R1 in non-small cell lung cancer. **The FASEB Journal**, 28, n. 6, p. 2696-2704, 2014.

LEITE, C.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L. *et al.* Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, 8, n. 29, p. 130-142, 2012.

LEMO, A. J. G.; TRINDADE, E. J. Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos p450. **Revista Científica do ITPAC, Araguaína**, 7, n. 2, p. 1-11, 2014.

LI, D.-D.; MENG, X.-F.; WANG, Q.; YU, P. *et al.* Consensus scoring model for the molecular docking study of mTOR kinase inhibitor. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 79, p. 81-87, 2018.

LIMA, A. M. D.; LIMA, S. N. A.; 3, J. A. D. S. L. A UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DE MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS. Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências 2021.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, F. Receptor-regulated Smads in TGF- β signaling. **Front Biosci**, 8, p. s1280-s1303, 2003.

LOPES, A. C. **AVALIAC AO DE DESEMPENHO PARA SELEC AO DE BOMBAS DE INFUS AO DESTINADAS A TERAPIAS COM FARMACOS DE MEIA-VIDA CURTA, JANELA TERAP EUTICA ESTREITA E BAIXAS VAZ OES**. 2012. -, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LOVERING, F.; BIKKER, J.; HUMBLET, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **Journal of medicinal chemistry**, 52, n. 21, p. 6752-6756, 2009.

LUO, L.; ZHONG, Q.; GUO, S.; ZHANG, C. *et al.* Development of a bioavailable boron-containing PI-103 Bioisostere, PI-103BE. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 30, n. 14, p. 127258, 2020.

LYNCH, T.; PRICE, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. **American family physician**, 76, n. 3, p. 391-396, 2007.

MACHADO, M. M. Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L. 2007.

MAEDA, K. Organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 38, n. 2, p. 155-168, 2015.

MAGOZWI, D. K.; DINALA, M.; MOKWANA, N.; SIWE-NOUNDOU, X. *et al.* Flavonoids from the genus *euphorbia*: Isolation, structure, pharmacological activities and structure–activity relationships. **Pharmaceuticals**, 14, n. 5, p. 428, 2021.

MARTINS, A. D. M. **Avaliação das atividades citotóxica e antifúngica dos extratos orgânicos de *Euphorbia tirucalli* Linn.(aveloz)**. 2018. -, Universidade Federal de Pernambuco.

MARTINS, C. G.; APPEL, M. H.; COUTINHO, D. S.; SOARES, I. P. *et al.* Consumption of latex from *Euphorbia tirucalli* L. promotes a reduction of tumor growth and cachexia, and immunomodulation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of ethnopharmacology**, 255, p. 112722, 2020.

MASCARENHAS, A. M. S. TRIAGEM VIRTUAL PARA A SELEÇÃO DE INIBIDORES DUAIS FRENTE À ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica**, n. 22, 2018.

MASSAOUS, J.; HATA, A. TGF- β signalling through the Smad pathway. **Trends in cell biology**, 7, n. 5, p. 187-192, 1997.

MATEEV, E.; VALKOVA, I.; ANGELOV, B.; GEORGIEVA, M. *et al.* Validation through re-docking, cross-docking and ligand enrichment in various well-resoluted MAO-B receptors. **Int J Pharm Sci Res**, 13, p. 1000-1007, 2022.

MATSUO, F. S. Estudo da via de sinalização PI3K-Akt E GSK3 β em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal. 2015.

- MAURYA, A. K.; VINAYAK, M. PI-103 and quercetin attenuate PI3K-AKT signaling pathway in T-cell lymphoma exposed to hydrogen peroxide. **PloS one**, 11, n. 8, p. e0160686, 2016.
- MCNUTT, A. T.; FRANCOEUR, P.; AGGARWAL, R.; MASUDA, T. *et al.* GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. **Journal of cheminformatics**, 13, n. 1, p. 43, 2021.
- MELCHIADES, G. D. L. Estudo de pré-formulação do kaempferol e seus complexos com ciclodextrina com vistas ao desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais. 2019.
- MELISI, D.; HOLLEBECQUE, A.; OH, D.-Y.; CALVO, E. *et al.* A phase Ib dose-escalation and cohort-expansion study of safety and activity of the transforming growth factor (TGF) β receptor I kinase inhibitor galunisertib plus the anti-PD-L1 antibody durvalumab in metastatic pancreatic cancer. American Society of Clinical Oncology 2019.
- MELO, D. H. G. D.; GUEDES, P. D. I. C. LIGAÇÕES QUÍMICAS – CAPÍTULO 5 FORÇAS DE VAN DER WAALS. Universidade pública de São Paulo.
- MELO, N. D. O. R.; DORNELAS, C. A. Modelo de Câncer Colorretal. 2023.
- MERCOGLIANO, M.; BRUNI, S.; ELIZALDE, P.; SCHILLACI, R. Tumor necrosis factor α blockade: an opportunity to tackle breast cancer. *Front Oncol* 10: 584. 2020.
- MEULMEESTER, E.; TEN DIJKE, P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. **The Journal of pathology**, 223, n. 2, p. 206-219, 2011.
- MIAO, L.; TIAN, H. Development of ERK1/2 inhibitors as a therapeutic strategy for tumour with MAPK upstream target mutations. **Journal of drug targeting**, 28, n. 2, p. 154-165, 2020.
- MODA, T. L. Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades de ADME para triagem de novos candidatos a fármacos. **São Paulo, Brazil: Universidade de São Paulo**, 2007.
- MORAES, G. V.; JORGE, G. M.; GONZAGA, R. V.; DOS SANTOS, D. A. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, 11, n. 14, p. e238111436225-e238111436225, 2022.
- MOUCLIS, V. D.; AFANTITIS, A.; SERRA, A.; FRATELLO, M. *et al.* Advances in de novo drug design: from conventional to machine learning methods. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 4, p. 1676, 2021.
- MUNCK, J. M.; BERDINI, V.; BEVAN, L.; BROTHWOOD, J. L. *et al.* ASTX029, a novel dual-mechanism ERK inhibitor, modulates both the phosphorylation and catalytic activity of ERK. **Molecular Cancer Therapeutics**, 20, n. 10, p. 1757-1768, 2021.
- MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAOKA, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer letters**, 269, n. 2, p. 315-325, 2008.
- NAMBA, A.; DA SILVA, V.; DA SILVA, C. Molecular dynamics: theory and applications in drug design. **Eclética Química**, 33, p. 13-24, 2008.
- NETO, M. F. A. TRIAGEM VIRTUAL PARA A SELEÇÃO DE CANDIDATOS A INIBIDORES DA DIIDROOROTATO DESIDROGENASE DE PLASMODIUM FALCIPARUM. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica**, n. 21, 2017.
- NOOROLYAI, S.; SHAJARI, N.; BAGHBANI, E.; SADREDDINI, S. *et al.* The relation between

PI3K/AKT signalling pathway and cancer. **Gene**, 698, p. 120-128, 2019.

NUNES, F. C.; MESQUITA, A. A. D. Adenocarcinoma de cólon originado de pólipos adenomatosos tubulares: relato de um caso. **Rev Med Minas Gerais**, 16, n. 1, p. 49-50, 2006.

OHORI, M.; KINOSHITA, T.; OKUBO, M.; SATO, K. *et al.* Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. **Biochemical and biophysical research communications**, 336, n. 1, p. 357-363, 2005.

ONUICHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de medicina**, 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

ORFALI, G.; SILVA, D.; MARCHESI, I.; ASSUNÇÃO, I. *et al.* PO-316 Isoquercetin: a novel agent to increase VASH1 and suppress colon cancer. **ESMO Open**, 3, p. A352, 2018.

PAGE, C.; INTEGRADA, F. História da Farmacologia.

PALMA, J. I.; PIERDOMINICI SOTTILE, G. Dinâmica molecular de biomoléculas. 2023.

PAN, M. H.; LAI, C. S.; WU, J. C.; HO, C. T. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. **Molecular nutrition & food research**, 55, n. 1, p. 32-45, 2011.

PANIAGO, I. F. Prospecção virtual de potenciais inibidores da proteína transportadora de serotonina sódio-dependente humana (SERT). 2018.

PAPADATOS-PASTOS, D.; RABBIE, R.; ROSS, P.; SARKER, D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. **Critical Reviews in oncology/hematology**, 94, n. 1, p. 18-30, 2015.

PARATE, S.; KUMAR, V.; LEE, G.; RAMPOGU, S. *et al.* Marine-derived natural products as ATP-competitive mTOR kinase inhibitors for cancer therapeutics. **Pharmaceuticals**, 14, n. 3, p. 282, 2021.

PARK, S.; CHAPUIS, N.; BARDET, V.; TAMBURINI, J. *et al.* PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. **Leukemia**, 22, n. 9, p. 1698-1706, 2008.

PELEGRINI, B. B.; BECKER, T. C. A.; DE OLIVEIRA, R. R.; DE MELO, W. A. Tendência da mortalidade por câncer colorretal em adultos no Brasil: Mortalidade por câncer colorretal no Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 18, n. 1, p. 1-11, 2023.

PENG, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; MEI, W. *et al.* PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: are we making headway? **Frontiers in oncology**, 12, p. 819128, 2022.

PEREIRA, A. L. D. C. Síntese, elucidação estrutural e estudos in silico de novos compostos 2-amino-1,4-benzodioxóis candidatos a fármacos antifúngicos, antileishmanicida e antitumorais. 2019.

PEREIRA, E. B. **Estudo da relação quantitativa estrutura-atividade de compostos \hat{I}^2 -carbólicos, substituídos nas posições 1 e 3, utilizados no tratamento de câncer de pulmão e melanoma cutâneo.** 2014. -, Universidade de São Paulo.

PEREIRA, E. F. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de candidatos a fármacos: busca de inibidores epigenéticos da Sirtuína 2 Sir2.** 2022. -, Universidade de São Paulo.

PEROVANO FILHO, J. R.; RINHEL, N. M.; DE OLIVEIRA, D. L.; DE MELO, D. A. *et al.* IMUNOTERAPIA E TERAPIAS-ALVO: RUMO A UMA REVOLUÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, 10, n. 1, p. 1565-1571,

2024.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 18, p. 4331, 2019.

POPOVA, M.; ISAYEV, O.; TROPSHA, A. Deep reinforcement learning for de novo drug design. **Science advances**, 4, n. 7, p. eaap7885, 2018.

PROSSOMARITI, A.; PIAZZI, G.; ALQUATI, C.; RICCIARDIELLO, L. Are Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT/mTORC1 distinct pathways in colorectal cancer? **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, 10, n. 3, p. 491-506, 2020.

PÓPULO, H.; LOPES, J. M.; SOARES, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. **International journal of molecular sciences**, 13, n. 2, p. 1886-1918, 2012.

RAMOS, K. R. A. S.; MENDES, A. C. D.; DE AQUINO FONSECA, E. N.; EULÁLIO, W. E. S. *et al.* RISCOS DO CÂNCER COLORRETAL NA POPULAÇÃO GERAL DE UM MUNICÍPIO DO NORTE DE MINAS GERAIS. **Revista CPAQV-Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, 15, n. 2, 2023.

RAN, J.; WANG, Y.; ZHANG, W.; MA, M. *et al.* Research on the bioactivity of isoquercetin extracted from marestalk on bladder cancer EJ cell and the mechanism of its occurrence. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 44, n. 3, p. 859-864, 2016.

RAYNAUD, F. I.; ECCLES, S. A.; PATEL, S.; ALIX, S. *et al.* Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. **Molecular cancer therapeutics**, 8, n. 7, p. 1725-1738, 2009.

REHAN, M.; BAJOUH, O. S. Virtual screening of naphthoquinone analogs for potent inhibitors against the cancer-signaling PI3K/AKT/mTOR pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, 120, n. 2, p. 1328-1339, 2019.

REIS, J. M. **Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA): investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos**. 2013. -, Universidade de São Paulo.

REISS, M. TGF- β and cancer. **Microbes and infection**, 1, n. 15, p. 1327-1347, 1999.

REYES-FARIAS, M.; CARRASCO-POZO, C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 13, p. 3177, 2019.

RIBEIRO, F. F. Uso de ferramentas do planejamento racional de fármacos auxiliado por computador aplicado a uma série de tiossemicarbazonas e seus bioisómeros frente à doença de Chagas. 2018.

RODRIGUES, G. D. S. **Abordagem combinada de triagem virtual inversa e baseada em ligantes na identificação de alvos proteicos para afidicolina e novos hits contra Leishmania major**. 2022. -, Universidade Federal do Oeste do Pará.

RODRIGUES, M. F. PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α) E SEUS RECEPTORES NA MODULAÇÃO DA APOPTOSE DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis*. 2013.

ROSA, N. R.; DOS REIS, J. F.; DE OLIVEIRA, L. F. F.; DO NASCIMENTO, G. O. *et al.* Biomarcadores tumorais de Câncer Colorretal: breve revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health**

Review, 6, n. 6, p. 28057-28068, 2023.

ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacological research**, 66, n. 2, p. 105-143, 2012.

ROȘU, M. C.; MIHNEA, P. D.; ARDELEAN, A.; MOLDOVAN, S. D. *et al.* Clinical significance of tumor necrosis factor-alpha and carcinoembryonic antigen in gastric cancer. **Journal of medicine and life**, 15, n. 1, p. 4, 2022.

RUIZ-TORRES, V.; LOSADA-ECHEBERRÍA, M.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; BARRAJÓN-CATALÁN, E. *et al.* New mammalian target of rapamycin (mTOR) modulators derived from natural product databases and marine extracts by using molecular docking techniques. **Marine drugs**, 16, n. 10, p. 385, 2018.

S SCHWEIKER, S.; L TAUBER, A.; M LEVONIS, S. In silico identification and in vitro activity of natural products as ADP-ribosyl transferase member 8 inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, 12, n. 19, p. 1729-1741, 2020.

SAMATAR, A. A.; POULIKAKOS, P. I. Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. **Nature reviews Drug discovery**, 13, n. 12, p. 928-942, 2014.

SANTOS, C. E. M. D. **Priorização de fármacos em água destinada ao consumo humano baseada em avaliação da toxicidade e do comportamento ambiental por meio de modelos computacionais (in silico) para fins de gestão ambiental**. 2015. -, Universidade de São Paulo.

SANTOS, J. L. Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de Ames. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 4, n. 2, 2007.

SANTOS, L. Docagem molecular: em busca do encaixe perfeito e acessível. **BIOINFO–Revista Brasileira de Bioinformática. Edição**, 1, 2021.

SARTORI, G. R. **Estudo da flexibilidade de cisteíno-proteases por simulação de dinâmica molecular**. 2017. -, Universidade de São Paulo.

SAÚDE, M. D. **Câncer**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-aaz/c/cancer>. Acesso em: 11 de março.

SAÚDE, M. D. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. **CÂNCER**, I. N. D. 2023.

SENGA, D. M. Y.; LIU, Â. S. L. W.; FRANGELLA, V. S. Probióticos no pré e pós-operatório de câncer colorretal. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, 11, n. 2, 2023.

SEROVA, M.; TIJERAS-RABALLAND, A.; DOS SANTOS, C.; ALBUQUERQUE, M. *et al.* Effects of TGF-beta signalling inhibition with galunisertib (LY2157299) in hepatocellular carcinoma models and in ex vivo whole tumor tissue samples from patients. **Oncotarget**, 6, n. 25, p. 21614, 2015.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front biosci**, 13, n. 2, p. 5094-5107, 2008.

SHAKER, B.; AHMAD, S.; LEE, J.; JUNG, C. *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in biology and medicine**, 137, p. 104851, 2021.

SHANMUGAM, G.; JEON, J. Computer-aided drug discovery in plant pathology. **The plant pathology journal**, 33, n. 6, p. 529, 2017.

SILVA, H. H. M.; ALVES, M. H. P.; GONÇALVES, R. J. S.; DE AGUIAR PEREIRA, N. *et al.* Proposta de modificação molecular: análise de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos “in silico” de fármacos barbitúricos. **Research, Society and Development**, 11, n. 13, p. e5291111335680-e5291111335680, 2022.

SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Incidência de Câncer no Brasil. VIGILÂNCIA, C. D. P. E. 2020.

SILVA, M. M. D. **Plasticidade fenotípica: efeitos do tratamento neonatal com kaempferol sobre parâmetros morfológicos ósseos em modelo experimental de paralisia cerebral.** 2021. -, Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, R. P. R. S. P. M. J. R. D. A. F. R. P. E. P. S. V. B. D. S. C. H. T. D. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Farmacêuticos. *Revista Virtual de Química* 2012.

SOUZA, W. A. Diagnósticos e formas terapêuticas para o Câncer de Próstata Metastático. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, 43, p. e12162-e12162, 2023.

SOUZA, W. F. D.; ARAÚJO, W. M. D.; DE-FREITAS-JUNIOR, J. C. M.; MORGADO-DÍAZ, J. A. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, 66, n. 1, p. 30-33, 2014.

SUGIURA, R.; SATOH, R.; TAKASAKI, T. ERK: a double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. **Cells**, 10, n. 10, p. 2509, 2021.

SULLIVAN, R. J.; INFANTE, J. R.; JANKU, F.; WONG, D. J. L. *et al.* First-in-class ERK1/2 inhibitor ulixertinib (BVD-523) in patients with MAPK mutant advanced solid tumors: results of a phase I dose-escalation and expansion study. **Cancer discovery**, 8, n. 2, p. 184-195, 2018.

SUN, Y.; XIE, W.; KANG, N.; YI, J. *et al.* To Explore the Inhibitory Mechanism of Quercetin in Thyroid Papillary Carcinoma through Network Pharmacology and Experiments. **Disease Markers**, 2022, 2022.

SYED, V. TGF- β signaling in cancer. **Journal of cellular biochemistry**, 117, n. 6, p. 1279-1287, 2016.

TAGUCHI, Y.; TURKI, T. Universal nature of drug treatment responses in drug-tissue-wide model-animal experiments using tensor decomposition-based unsupervised feature extraction. **Frontiers in Genetics**, 11, p. 544287, 2020.

TAVARES, M. T. **Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6 (HDAC6) e tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer.** 2022. -, Universidade de São Paulo.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 51, p. 526-533, 2007.

TU, L.-Y.; PI, J.; JIN, H.; CAI, J.-Y. *et al.* Synthesis, characterization and anticancer activity of kaempferol-zinc (II) complex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, n. 11, p. 2730-2734, 2016.

UROSEVIC, J.; NEBREDA, A. R.; GOMIS, R. R. MAPK signaling control of colon cancer metastasis. **Cell cycle**, 13, n. 17, p. 2641-2642, 2014.

VAN HORSSEN, R.; TEN HAGEN, T. L.; EGGERMONT, A. M. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The oncologist**, 11, n. 4, p. 397-408, 2006.

VANHAESEBROECK, B.; PERRY, M. W.; BROWN, J. R.; ANDRÉ, F. *et al.* PI3K inhibitors are

finally coming of age. **Nature reviews Drug discovery**, 20, n. 10, p. 741-769, 2021.

VARA, J. Á. F.; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P. *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer treatment reviews**, 30, n. 2, p. 193-204, 2004.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química nova**, 28, p. 95-102, 2005.

WACZUK, E. P.; PEREIRA, K. B.; MACHADO, M. M.; DE OLIVEIRA, L. F. S. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos da *Euphorbia tirucalli* L.: dos riscos as possibilidades. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, 9, n. 1/2, p. 35-64, 2012.

WANG, C.-P.; SHI, Y.-W.; TANG, M.; ZHANG, X.-C. *et al.* Isoquercetin ameliorates cerebral impairment in focal ischemia through anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects in primary culture of rat hippocampal neurons and hippocampal CA1 region of rats. **Molecular Neurobiology**, 54, p. 2126-2142, 2017.

WANG, M.; WANG, Z.; SUN, H.; WANG, J. *et al.* Deep learning approaches for de novo drug design: An overview. **Current opinion in structural biology**, 72, p. 135-144, 2022.

WANG, X.; YANG, Y.; AN, Y.; FANG, G. The mechanism of anticancer action and potential clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 117, p. 109086, 2019.

WANG, Y.; XING, J.; XU, Y.; ZHOU, N. *et al.* In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly reviews of biophysics**, 48, n. 4, p. 488-515, 2015.

WESSEL, M. D.; JURIS, P. C.; TOLAN, J. W.; MUSKAL, S. M. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, 38, n. 4, p. 726-735, 1998.

WONG, K.-K.; ENGELMAN, J. A.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. **Current opinion in genetics & development**, 20, n. 1, p. 87-90, 2010.

WU, D.; ZHENG, X.; LIU, R.; LI, Z. *et al.* Free energy perturbation (FEP)-guided scaffold hopping. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 12, n. 3, p. 1351-1362, 2022.

XIE, J.; WANG, X.; PROUD, C. G. mTOR inhibitors in cancer therapy. **F1000Research**, 5, 2016.

XIONG, J.; XIONG, Z.; CHEN, K.; JIANG, H. *et al.* Graph neural networks for automated de novo drug design. **Drug discovery today**, 26, n. 6, p. 1382-1393, 2021.

XU, Y.; PASCHE, B. TGF- β signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. **Human molecular genetics**, 16, n. R1, p. R14-R20, 2007.

YANG, H.; RUDGE, D. G.; KOOS, J. D.; VAIDIALINGAM, B. *et al.* mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, 497, n. 7448, p. 217-223, 2013.

YAO, X.; XUE, Y.; MA, Q.; BAI, Y. *et al.* 221S-1a inhibits endothelial proliferation in pathological angiogenesis through ERK/c-Myc signaling. **European Journal of Pharmacology**, 952, p. 175805, 2023.

YINGLING, J. M.; MCMILLEN, W. T.; YAN, L.; HUANG, H. *et al.* Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- β receptor type I inhibitor. **Oncotarget**, 9, n. 6, p. 6659, 2018.

YIP, C. K.; MURATA, K.; WALZ, T.; SABATINI, D. M. *et al.* Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. **Molecular cell**, 38, n. 5, p. 768-774, 2010.

YU, J.; WANG, J.; ZHAO, H.; GAO, J. *et al.* Organic compound synthetic accessibility prediction based on the graph attention mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 62, n. 12, p. 2973-2986, 2022.

ZHANG, Y.; LI, X.; SHI, Y.; CHEN, T. *et al.* ETCM v2. 0: an update with comprehensive resource and rich annotations for traditional Chinese medicine. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 13, n. 6, p. 2559-2571, 2023.

ZHANG, Z.; LIU, X.; YAN, K.; TUCKERMAN, M. E. *et al.* Unified efficient thermostat scheme for the canonical ensemble with holonomic or isokinetic constraints via molecular dynamics. **The Journal of Physical Chemistry A**, 123, n. 28, p. 6056-6079, 2019.

ZHAO, Y.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; LU, S. *et al.* Crystal structures of PI3K α complexed with PI103 and its derivatives: new directions for inhibitors design. **ACS medicinal chemistry letters**, 5, n. 2, p. 138-142, 2014.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature reviews Molecular cell biology**, 12, n. 1, p. 21-35, 2011.

ZOU, Z.; TAO, T.; LI, H.; ZHU, X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. **Cell & bioscience**, 10, n. 1, p. 31, 2020.

ZOU, Z.-Q.; ZHANG, X.-H.; WANG, F.; SHEN, Q.-J. *et al.* A novel dual PI3K α /mTOR inhibitor PI-103 with high antitumor activity in non-small cell lung cancer cells. **International journal of molecular medicine**, 24, n. 1, p. 97-101, 2009.

ADMETlab. Versão 2.0. 2024.