



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ EDUARDO DE MELO SOEIRO

BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL APLICADA A BIOPROSPECÇÃO ALVO
DIRECIONADA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S664b Soeiro, José Eduardo de Melo.

Bioinformática estrutural aplicada a bioprospecção alvo direcionada de compostos com potencial antitumoral / José Eduardo de Melo Soeiro. – 2023.

76 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Coorientação: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Sousa.

1. Atracamento molecular. 2. Microrganismos marinhos. 3. Otimização de compostos orgânicos. 4. Estaurosporinas. 5. ADME-Tox. I. Título.

CDD 570

JOSÉ EDUARDO DE MELO SOEIRO

BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL APLICADA À BIOPROSPECÇÃO ALVO
DIRECIONADA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração:

Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Sousa

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Katharine Gurgel Dias Florêncio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Larissa Alves Guimarães
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, **Luiz Rosal Freire** e **Conceição de Melo**, por terem sempre priorizado a minha educação e incentivado minha carreira científica. Esse trabalho é fruto da dedicação e esforço de vocês.

Aos meus pais, **Paulo Eduardo Soeiro** e **Marqueleia de Melo Sousa Soeiro**, pelo apoio e amor incondicional. E por nunca terem deixado que eu desista e se esforçado para compreender meus sonhos.

Ao meu irmão, Henrique Soeiro, pelas risadas, apoio e companhia.

A minha amada companheira, confidente, conselheira e social media **Mirella Mirla**, por tornar o processo de escrita deste trabalho mais leve e por entender, amar e apoiar incondicionalmente minha jornada.

Ao Professor Doutor **Diego Veras Wilke**, por me aceitar no laboratório de braços abertos. Por sempre me incentivar a buscar o conhecimento, o aprimoramento das minhas habilidades e o aprendizado. Por acreditar em mim, investir na minha pesquisa e carreira, por impactar tão positivamente a minha formação. Sem o seu esforço e dedicação a realização desse trabalho não seria possível.

Aos integrantes do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LABBMAR), **Felipe Barros**, **Alexia Assef**, **Yuri Silva**, **Keilla Santana**, **Thaís Brito**, **Táisa Eduarda**, **Clara Nogueira** e **Katharine Florêncio** pela convivência diária, amizade, atenção e troca de conhecimentos.

Ao Professor Doutor **Pedro Filho** e todos os integrantes da Batcaverna da Bioinformática **Beatriz Lima**, **Daiane Maria** e **Isa Gomes** pela contribuição imensurável ao trabalho, disponibilidade de cooperação e pelo auxílio na nas técnicas de bioinformática utilizadas no trabalho.

Ao Professor Doutor **Edson Vicente da Silva** e todos do Laboratório de Geoecologia da Paisagem e Planejamento Ambiental (LAGEPLAM) onde

primeiramente me receberam e me iniciaram na carreira acadêmica, sempre serão lembrados.

À Professora Doutora **Larissa Alves Guimarães** por aceitar o convite para participar da banca e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

À Professora Doutora **Katharine Gurgel Dias Florêncio** pela disponibilidade em participar da banca e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos que me acompanharam durante a graduação, **Maurisso, Mordecai, Marcos, Victor, Giovanna, Luiza** e muitos outros que estão lembrados no meu coração. Pelo auxílio em disciplinas, momentos de descontração e grande carinho. Vocês são parte importante dessa conquista.

Aos queridos amigos da Escola Estadual Justiniano de Serpa, **Erika, Sarah, Rebeka, Querolayne, Lucas e Emerson**, por todas as ocasiões em que estivemos juntos, por incentivarem e participarem de momentos decisivos na minha jornada.

Aos meus filhos felinos, **Kikin, Willie e Resistência**, que contribuíram com muitos arranhões e mordidas de carinho.

Aos órgãos de fomento responsáveis pela manutenção de jovens cientistas na carreira acadêmica, em especial à UFC, responsável pela concessão da minha bolsa.

A todos os professores do Bacharelado em Ciências Biológicas pelos conhecimentos adquiridos.

A todos que torceram ou contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

*“A ciência é o grande antídoto
contra o veneno do entusiasmo e da
superstição”*

Adam Smith

RESUMO

O câncer é uma doença complexa que age pela proliferação desordenada de células em vários órgãos e seu tratamento pode ser invasivo e inespecífico, além de esbarrar na resistência tumoral. Pesquisas que busquem potenciais tratamentos estão espalhadas por todo o território brasileiro, inclusive tendo os ecossistemas marinhos como fonte de compostos. Assim, o MicroMarin é um banco de microrganismos marinhos coletados na zona de exclusividade econômica brasileira, também conhecida como Amazônia Azul. As moléculas identificadas nas cepas bacterianas do MicroMarin são investigadas a partir de sua atividade citotóxica, como possíveis candidatos a fármacos anticâncer, por metodologias experimentais e *in silico*. No contexto do tratamento do câncer, a bioinformática pode desempenhar um papel importante na triagem e direcionamento de fármacos, tornando os estudos posteriores mais assertivos e diminuindo custos e tempo do processo de desenvolvimento de medicamentos. O presente trabalho trata-se de um estudo sobre a aplicação da bioinformática na prospecção de compostos com potencial farmacológico para o tratamento do câncer. O objetivo foi a otimização de uma série de estaurosporinas do banco de microrganismos MicroMarin, pro meio de abordagens *in silico* de bioinformática estrutural, ou seja, que consideram aspectos tridimensionais dos objetos de pesquisa. Consideradas moléculas com toxicidade exacerbada, as estaurosporinas presentes no MicroMarin tiveram suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas caracterizadas, e suas estruturas foram divididas em subgrupos, permitindo a otimização *in silico* por exclusão das subestruturas. Tanto as estaurosporinas identificadas, quanto às otimizadas digitalmente, foram submetidas a ensaios de atracamento molecular e comparadas quanto à toxicidade e propriedades farmacocinéticas. A otimização das estruturas resultou na obtenção de vinte novas estaurosporinas, nas quais cinco apresentaram Dose Letal Mediana (LD-50) previstas aumentadas de 11-1000mg/Kg para 5000-12800mg/Kg, possibilitando uma maior segurança na administração. Além disso, os ensaios de toxicidade sistêmica (utilizando o *software* ProTox-II), preveem que estas cinco estruturas destacadas apresentam menos efeitos tóxicos quando comparadas com as moléculas protótipos. A prospecção *in silico* de possíveis alvos moleculares (*target fishing*) para as estaurosporinas otimizadas levou à seleção, para os estudos de atracamento molecular, da tirosina quinase RET, que quando mutada promove a proliferação celular desordenada em diferentes tipos tumorais, entre eles o adenocarcinoma de tireoide. Quando comparadas às estaurosporinas modelo, conhecidas como inibidores não seletivos de quinases, as cinco estruturas otimizadas que apresentaram menor toxicidade, também possuem uma maior estabilidade na interação com a RET quinase, identificada pela maior quantidade de pontes de hidrogênio entre moléculas e receptor. Os resultados deste trabalho lançam luz sobre mecanismos de otimização de moléculas candidatas a fármacos anticâncer, diminuindo a toxicidade e aumentando a interação entre esses e seus alvos moleculares. Contudo, dados experimentais são essenciais para corroborar e validar os resultados obtidos por bioinformática. Ensaios de viabilidade de síntese também se fazem necessários a fim de tornar possível a obtenção e testes com as moléculas otimizadas.

Palavras-chave: atracamento molecular, microrganismos marinhos, otimização de compostos orgânicos, estaurosporinas, ADME-Tox.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease that acts by the disordered proliferation of cells in various organs and its treatment can be invasive and nonspecific, in addition to running into tumor resistance. Research seeking potential treatments is spread throughout the Brazilian territory, including marine ecosystems as a source of compounds. Thus, MicroMarin is a bank of marine microorganisms collected in the Brazilian economic exclusivity zone, also known as the Blue Amazon. The molecules identified in the bacterial strains of MicroMarin are investigated from their cytotoxic activity, as possible candidates for anticancer drugs, by experimental and *in silico* methodologies. In the context of cancer treatment, bioinformatics can play an important role in drug screening and targeting, making further studies more assertive and reducing the costs and time of the drug development process. The present work is a study on the application of bioinformatics in the prospection of compounds with pharmacological potential for the treatment of cancer. The objective was the optimization of a series of staurosporine from the MicroMarin microorganism bank, through *in silico* structural bioinformatics approaches, in other words, considering three-dimensional aspects of the research objects. Considered molecules with exacerbated toxicity, the staurosporine present in MicroMarin had their physicochemical and pharmacokinetic properties characterized, and their structures were divided into subgroups, allowing *in silico* optimization by the exclusion of substructures. Both the identified and digitally optimized staurosporine were subjected to molecular docking assays and compared for toxicity and pharmacokinetic properties. The optimization of the structures resulted in twenty new staurosporines, of which five had a predicted Median Lethal Dose (LD-50) increased from 11-1000mg/Kg to 5000-12800mg/Kg, allowing greater safety in administration. In addition, systemic toxicity assays (using ProTox-II software) predict that these five highlighted structures present fewer toxic effects when compared to the prototype molecules. The *in silico* prospection of possible molecular targets (*target fishing*) for the optimized staurosporine led to the selection, for the molecular docking studies, of the RET tyrosine kinase, which when mutated promotes disordered cell proliferation in different tumor types, among them thyroid adenocarcinoma. When compared to model staurosporine, known as non-selective kinase inhibitors, the five optimized structures that showed lower toxicity, also have greater stability in the interaction with RET kinase, identified by the greater amount of hydrogen bridges between molecule and receptor. The results of this work shed light on optimization mechanisms of anticancer drug candidate molecules, decreasing toxicity and increasing the interaction between these and their molecular targets. However, experimental data are essential to corroborate and validate the results obtained by bioinformatics. Synthesis feasibility tests are also necessary to make it possible to obtain and test the optimized molecules.

Keywords: molecular docking, marine microorganisms, optimization of organic compounds, staurosporine, ADME-Tox.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atracamento molecular e suas diversas aplicações na farmacologia	19
Figura 2 - Esquema apresentando diferentes características físico-químicas, propriedades de ADME e toxicidade de compostos com interesse farmacológico....	21
Figura 3 – Estaurosporinas isoladas das cepas de referência BRA 132, BRA 177, BRA 199 e BRA 213 do banco de microrganismos MicroMarin, coletadas em sedimento do arquipélago de São Pedro e São Paulo e estudadas por Silva (2022).....	24
Figura 4 - Fluxo de trabalho para otimização das estaurosporinas estudadas	28
Figura 5 - Modificações realizadas nos anéis cíclicos das estaurosporinas.....	33
Figura 6 - Ensaio de atracamento molecular entre as estaurosporinas e a proteína 6NE7	43
Figura 7 - Ensaio de atracamento molecular entre as hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7	43
Figura 8 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-metil-estaurosporinas e a proteína 6NE7	44
Figura 9 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-metil-hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7	44
Figura 10 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-carboxamida-estaurosporinas e a proteína 6NE7	45
Figura 11 - Interações moleculares entre as estaurosporinas e a proteína 6NE7	45
Figura 12 - Interações moleculares entre as hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7	46
Figura 13 - Interações moleculares entre as N-metil-estaurosporinas e a proteína 6NE7	46
Figura 14 - Interações moleculares entre as N-metil-hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7	47
Figura 15 - Interações moleculares entre as N-carboxamida-estaurosporinas e a proteína 6NE7	47
Figura 16 - Atracamento molecular e interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, que serão utilizados como interações modelo para atividades <i>in silico</i> das moléculas estudadas.....	49
Figura 17 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das estaurosporinas.....	49

Figura 18 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das hidróxiestaurosporinas	50
Figura 19 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-metil-estaurosporinas	50
Figura 20 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-metil-hidróxiestaurosporinas.....	51
Figura 21 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-carboxamida-estaurosporinas	51
Figura 22 - Interações moleculares entre o nintedanibe e a proteína 6NE7, com perfil de inibição competitiva do ATP na proteína 6NE7 sob efeito do nintedanibe	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados mais relevantes de características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas das estaurosporinas	36
Tabela 2 - Dados mais relevantes de características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas das estaurosporinas otimizadas	37
Tabela 3 - Dados mais relevantes de toxicidade das estaurosporinas	39
Tabela 4 - Dados mais relevantes de toxicidade das estaurosporinas otimizadas	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME-Tox	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
AUC	Área sobre a curva
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region fused to Abelson Leukemia Gene</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRAF	<i>B family of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
CPNPC	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
CYP11B2	Citocromo P450 família 11 subfamília B membro 2
CYP450	Citocromo P450
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECFP4	<i>Extended Connectivity Fingerprint up to Four Bonds</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FPI	Fibrose Pulmonar Idiopática
HER2/neu	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
kDa	kilodaltons
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
RAS	RAt Sarcoma virus
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
SMILES	<i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>
SYK	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
ZEE	Zona Econômica Exclusiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
	1.1 Câncer	14
	1.2 Prospecção de moléculas com potencial farmacológico	16
	1.3 Bioinformática	18
	1.4 Banco de microrganismos MicroMarin	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	27
	3.1 Objetivo geral	27
	3.2 Objetivos específicos	27
	3.3 Pergunta de partida.....	26
	3.4 Hipótese	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
	4.1 Planejamento experimental.....	28
	4.2 Levantamento de características farmacodinâmicas e de toxicidade...	29
	4.3 Busca por alvo	30
	4.4 Atracamento molecular	31
	4.5 Otimização das estaurosporinas	33
5	RESULTADOS	35
	5.1 Levantamento de características farmacodinâmicas e de toxicidade...	35
	5.2 Busca por alvo	41
	5.3 Atracamento molecular	42
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

APÊNDICES	73
------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença complexa e multifacetada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Ele é caracterizado pelo crescimento descontrolado e anormal de células, podendo surgir em qualquer parte do corpo e apresentar uma variedade de formas e estágios. Suas causas podem ser diversas, incluindo fatores genéticos, exposição a substâncias cancerígenas, estilo de vida e histórico familiar. O câncer pode ter um impacto significativo na vida dos indivíduos afetados, bem como de seus familiares e/ou cuidadores, muitas vezes exigindo tratamentos invasivos ou agressivos, como cirurgias, quimioterapia e radioterapia. No entanto, avanços contínuos na pesquisa e no desenvolvimento de novas terapias oferecem esperança e melhoram as taxas de sobrevivência. A conscientização sobre os fatores de risco, a detecção precoce e o apoio emocional e físico são fundamentais na luta contra o câncer (WHO, World Health Organization, 2022).

Os *hallmarks* (ou marcas registradas) do câncer são uma série de características distintas que são comumente observadas nas células neoplásicas e que contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esses *hallmarks* incluem a capacidade de evitar a morte celular programada (apoptose), a capacidade de estimular o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), a evasão do sistema imunológico, a replicação celular descontrolada, a indução de mutações genéticas, a resistência a sinais de inibição de crescimento, a habilidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes (invasão e metástase) e a reprogramação do metabolismo celular. Essas características colaboram para a sobrevivência e proliferação das células cancerosas, permitindo que elas escapem dos mecanismos regulatórios normais do organismo e cresçam de forma desordenada. O entendimento desses *hallmarks* tem sido fundamental no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para combater o câncer, direcionando os esforços para interromper esses processos fundamentais no crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As quinases desempenham um papel essencial no câncer como mediadoras de vias de sinalização celulares envolvidas no crescimento, sobrevivência e proliferação celular (SILVA, et al., 2019). São enzimas responsáveis pela fosforilação

de proteínas, um processo crítico para ativar ou desativar vias de sinalização intracelular. No entanto, em células cancerígenas, mutações ou ampliações genéticas podem levar à ativação anormal e desregulada de quinases, resultando em uma atividade excessiva e contínua das vias de sinalização. Isso pode promover o crescimento celular descontrolado, a evasão da morte celular programada e a indução da angiogênese (KATZUNG; TREVOR, 2017).

Além disso, quinases como as de tirosina e serina/treonina, como EGFR, HER2, BRAF, mTOR e PI3K, são frequentemente encontradas com alterações em diversos tipos de câncer, tornando-as alvos terapêuticos importantes (KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). Inibidores de quinases têm sido desenvolvidos como terapias-alvo para interromper vias de sinalização disfuncionais e suprimir o crescimento tumoral, contribuindo para o tratamento do câncer de forma mais específica e direcionada (SILVA, et al., 2019). Dentre os inibidores de quinase empregados na clínica, já são comercialmente disponibilizados os derivados de produtos naturais imatinibe (Gleevec), usado no tratamento de leucemia mieloide crônica e alguns tipos de tumores gastrointestinais e o Dasatinibe (Sprycel), como inibidor de multiquinases, incluindo a BCR-ABL envolvida na proliferação celular, sendo o imatinibe derivado de um produto natural marinho (LOPES; ABREU, 2009)

Os proto-oncogenes, são genes presentes nas células normais que desempenham papéis essenciais na regulação da proliferação celular e na manutenção da integridade do genoma, que através de mutações, são levados a um funcionamento anormal, contribuindo para o desenvolvimento do câncer. Exemplos de proto-oncogenes que podem se tornar oncogenes incluem o gene RAS, o gene HER2/neu e o gene RET (CHEN; KERKELÄ; FORCE, 2008; STEEGHS; NORTIER; GELDERBLOM, 2007; TORRY; COOPER, 1991).

O proto-oncogene RET (do inglês, *Rearranged during Transfection*) desempenha um papel importante no câncer, especialmente em certos tipos de tumores como o carcinoma medular de tireoide. O gene RET codifica um receptor de tirosina quinase de mesmo nome que desempenha papel no desenvolvimento e na função normal das células nervosas e células da glândula tireoide (SAARMA, 2009). No entanto, mutações somáticas ou hereditárias no RET podem levar à ativação anormal do receptor, transformando-o em um oncogene. Essas mutações ativadoras podem ocorrer no domínio extracelular ou intracelular do RET, resultando em uma

sinalização contínua e desregulada, que promove o crescimento celular descontrolado e a formação de tumores (MULLIGAN, 2014).

O conhecimento sobre a função do proto-oncogene RET e suas mutações ativadoras tem sido essencial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas. Inibidores de tirosina quinase que visam o RET têm sido utilizados com sucesso no tratamento de pacientes com tumores que apresentam mutações ativadoras do RET. Essas terapias-alvo podem ajudar a interromper a sinalização desregulada do RET e inibir o crescimento tumoral, oferecendo uma opção terapêutica mais precisa e eficaz para pacientes com câncer associado ao RET (DRILON et al., 2018).

1.2 Prospecção de moléculas com potencial farmacológico

A prospecção de fármacos é um processo complexo e rigoroso que envolve a descoberta, o design, a síntese, os testes pré-clínicos e clínicos, bem como a regulamentação de novas substâncias químicas com propriedades terapêuticas. Ela pode ser tanto alvo direcionada, quando há uma doença como alvo a ser tratado ou fenotípica, quando o processo é iniciado com a identificação da atividade biológica do composto (HUGHES et al., 2011).

A pesquisa alvo direcionada começa pela identificação de alvos biológicos relevantes para uma determinada doença. Em seguida, ocorre a fase de descoberta, em que compostos químicos promissores são desenvolvidos e testados quanto à atividade e seletividade. Os candidatos a fármacos selecionados passam por estudos pré-clínicos em modelos animais para avaliar a segurança e a eficácia. Posteriormente, são realizados testes clínicos em seres humanos para determinar a segurança, a dosagem adequada e a eficácia terapêutica. Esses estudos são conduzidos em fases progressivas e regulamentadas, culminando com a submissão de um pedido de aprovação junto às agências reguladoras (CHOPRA; DHINGRA, 2021).

O desenvolvimento de fármacos é um processo altamente regulado, exigindo um equilíbrio cuidadoso entre a eficácia terapêutica e a segurança dos pacientes. É um campo desafiador, porém crucial, que visa trazer novas terapias e melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas por diversas doenças (KATZUNG; TREVOR, 2017).

O paradigma "uma droga, um alvo" é uma abordagem estratégica no desenvolvimento de fármacos, onde uma única molécula é projetada para interagir com um alvo molecular específico. Essa abordagem busca maximizar a seletividade e a eficácia terapêutica, evitando interações indesejadas com outros alvos no organismo (ANIGHORO; BAJORATH; RASTELLI, 2014). Dessa forma, uma droga "promíscua", ou capaz de desencadear diferentes cascatas de sinalização pela atividade em diferentes alvos moleculares não seria desejável (BARBOSA, 2015; COSTANTINO; BARLOCCO, 2013).

Como uma quebra desse paradigma, temos a polifarmacologia. A busca de moléculas com importância farmacológica que possuam diferentes alvos biológicos, considerando múltiplos alvos terapêuticos (CHAUDHARI et al., 2017). Sobretudo, seu emprego é importante em doenças complexas como o câncer, capaz de desenvolver mecanismos de resistência que findam por garantir a sobrevivência celular. A polifarmacologia reconhece a complexidade e a heterogeneidade dos processos biológicos envolvidos no câncer, buscando tratar várias vias e mecanismos simultaneamente (JALENCAS; MESTRES, 2013).

A polifarmacologia do câncer pode envolver o uso de combinações de fármacos, cada um direcionado a um alvo específico, ou o desenvolvimento de fármacos que possuam múltiplos mecanismos de ação em um único composto (CHENG, 2019). Além disso, a polifarmacologia também pode ser aplicada no desenvolvimento de terapias direcionadas a vias de sinalização específicas que são compartilhadas por diferentes tipos de câncer. Essas terapias podem visar alvos moleculares comuns, como quinases, fatores de crescimento ou proteínas-chave envolvidas na regulação do ciclo celular. Embora a polifarmacologia do câncer seja uma abordagem promissora, é um desafio identificar as combinações ideais de fármacos ou desenvolver compostos que possuam múltiplos alvos de forma seletiva (KARUPPASAMY et al., 2021).

A bioinformática desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de fármacos, permitindo uma abordagem mais eficiente e precisa no processo de descoberta e otimização de medicamentos (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021). A triagem virtual, por exemplo, utiliza técnicas de atracamento molecular e simulações computacionais para identificar compostos que possuem afinidade e interações favoráveis com alvos moleculares específicos. Isso permite a seleção mais rápida e direcionada de candidatos a fármacos promissores, reduzindo o número de

compostos a serem testados experimentalmente (KONTOYIANNI, 2017). Na otimização de fármacos existentes. Por meio de simulações computacionais, é possível modificar estruturas químicas e avaliar o impacto dessas alterações nas propriedades farmacológicas, permitindo o design racional de compostos com maior afinidade, seletividade e eficácia terapêutica (BRUNO et al., 2019; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019).

1.3 Bioinformática

A bioinformática é um campo interdisciplinar que combina a biologia e a ciência da computação para analisar e interpretar grandes volumes de dados biológicos. Por meio do uso de algoritmos, ferramentas e métodos computacionais avançados, a bioinformática permite a compreensão e a extração de informações valiosas a partir de sequências de DNA, RNA e proteínas, bem como de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos (VERLI, 2014). Essa área de pesquisa desempenha um papel fundamental na genômica, na medicina personalizada, no estudo de doenças complexas e na descoberta de novos fármacos. Ao integrar conhecimentos biológicos e habilidades computacionais, a bioinformática oferece visões únicas sobre a estrutura, a função e a evolução dos organismos vivos, impulsionando avanços significativos na área da biologia e da medicina (MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

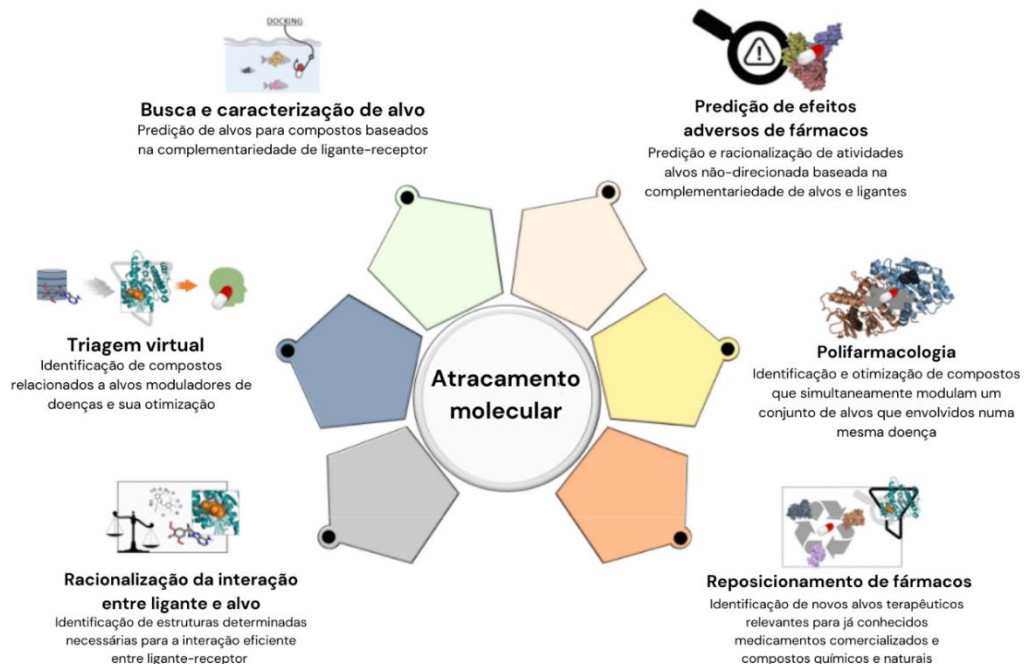
Segundo Verli (2014), a bioinformática é dividida entre bioinformática clássica e bioinformática estrutural. Por definição, a clássica aborda principalmente problemáticas relacionadas a sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Sendo bastante empregada na genética e em estudos populacionais de variabilidade gênica. A bioinformática estrutural, por sua vez, utiliza abordagens tridimensionais atreladas a práticas de química computacional e modelagem molecular, que são usadas na compreensão do comportamento entre as interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Dentre as práticas da bioinformática estrutural, a principal delas é o atracamento molecular. Uma abordagem computacional utilizada no desenvolvimento de fármacos para prever a interação entre uma molécula-alvo, como uma proteína, e um ligante, geralmente uma pequena molécula candidata a medicamento (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). Por meio de algoritmos e técnicas avançadas, o *molecular docking* (termo em inglês para atracamento molecular) busca identificar a orientação e a

conformação mais favoráveis para o encaixe entre o ligante e a molécula-alvo. Isso é crucial para compreender como o ligante se liga à proteína e como essa interação pode influenciar a atividade biológica (FERREIRA et al., 2015). O atracamento molecular desempenha um papel fundamental na triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos químicos, permitindo a identificação de candidatos a fármacos promissores para estudos posteriores. Além disso, também auxilia na modificação de ligantes existentes para melhorar sua afinidade e seletividade. Essa abordagem computacional tem acelerado o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, permitindo uma seleção mais eficiente de compostos com potencial terapêutico (KAUR et al., 2019; PINZI; RASTELLI, 2019).

A Figura 1 elenca aplicações do atracamento molecular na farmacologia, ressaltando as práticas de *target fishing* e *virtual screening*, respectivamente busca por alvo farmacológico e triagem virtual de compostos. Práticas de bioinformática que utilizam métodos computacionais para identificar potenciais alvos terapêuticos para uma molécula específica ou um banco de dados em questão, além das técnicas de predição de reações adversas e identificação e otimização de compostos simultaneamente capazes de modular diferentes alvos dentro de uma mesma doença (GALATI et al., 2021).

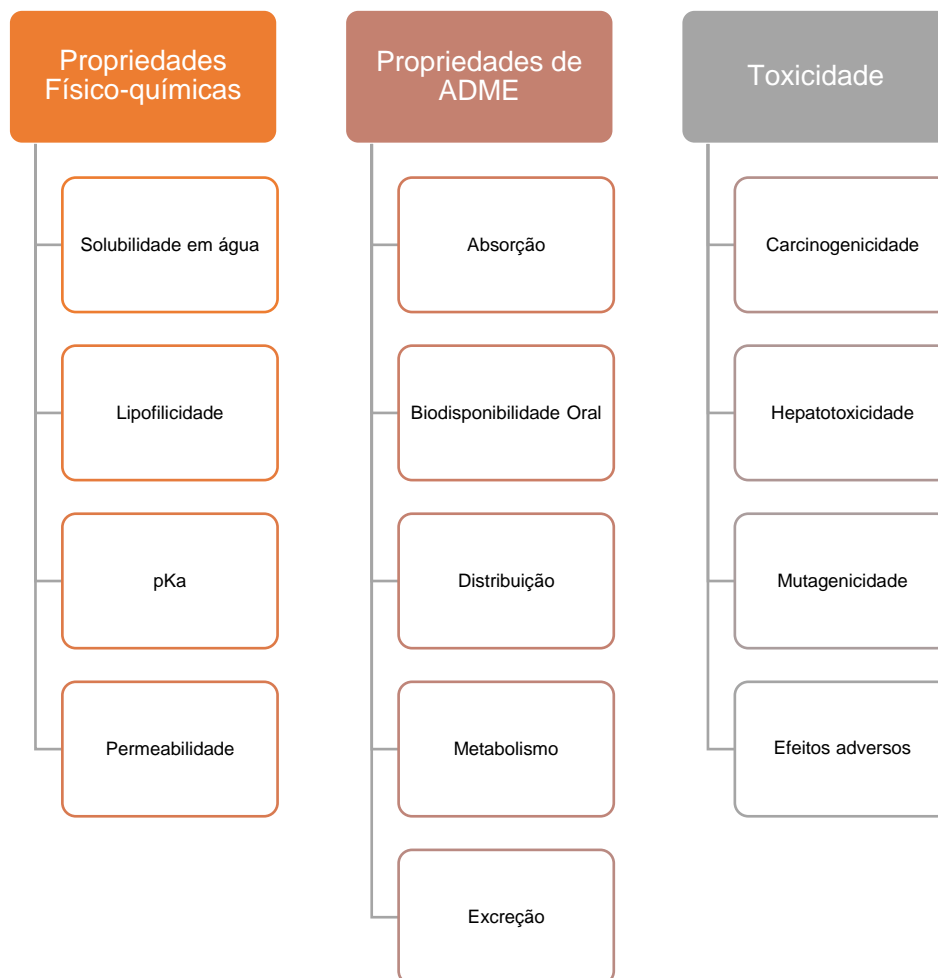
Figura 1 - Atracamento molecular e suas diversas aplicações na farmacologia



Fonte: Adaptado de Pinzi e Rastelli (2019).

Dentro da predição de efeitos adversos, ensaios de ADME-Tox (um acrônimo que se refere à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de substâncias químicas, especialmente fármacos) são importantes ferramentas. Esses parâmetros desempenham um papel crucial na determinação do perfil farmacocinético e toxicológico de uma molécula (ALQAHTANI, 2017). A absorção refere-se à capacidade da substância de entrar na corrente sanguínea após a administração. A distribuição envolve o movimento da substância pelos tecidos do corpo, afetado por fatores como a ligação a proteínas e a permeabilidade das membranas. O metabolismo refere-se à transformação química da substância pelo organismo, principalmente no fígado, que pode afetar sua atividade e toxicidade. A excreção refere-se à remoção da substância do organismo, principalmente pelos rins e pelo sistema biliar (KATZUNG; TREVOR, 2017). A toxicidade aborda os efeitos adversos que uma substância pode causar aos tecidos e órgãos do organismo. A avaliação dos parâmetros ADME-Tox desempenha um papel importante no desenvolvimento de fármacos, pois ajuda a identificar potenciais problemas de segurança, permitindo a seleção de moléculas com melhor perfil farmacocinético e toxicológico, otimizando a eficácia e minimizando os efeitos indesejados (LI, 2001). O esquema apresentado na Figura 2 ilustra os principais parâmetros utilizados em ensaios de ADME-Tox.

Figura 2 - Esquema apresentando diferentes características físico-químicas, propriedades de ADME e toxicidade de compostos com interesse farmacológico



Fonte: Adaptado de Alqahtani (2017).

Os códigos SMILES (do inglês *Simplified Molecular Input Line Entry System*) são utilizados para obtenção dessas informações *in silico*. Além disso, são uma forma de representação textual simplificada de estruturas moleculares utilizadas na área de bioinformática. Esses códigos são compostos por uma sequência de caracteres que descrevem a conectividade dos átomos em uma molécula, bem como informações sobre grupos funcionais e estereoquímica. Os códigos SMILES são úteis para armazenar e transmitir informações moleculares de forma compacta e fácil de ser interpretada por algoritmos computacionais. Eles desempenham um papel importante em várias aplicações bioinformáticas, como a pesquisa de moléculas em bancos de dados, o planejamento de síntese química e a modelagem molecular (WEININGER, 1988).

1.4 Banco de microrganismos MicroMarin

A Amazônia Azul é uma extensa área marítima situada na costa brasileira, que se estende desde o litoral do estado do Maranhão até o estado do Rio Grande do Sul. Também conhecida como Zona Econômica Exclusiva (ZEE), a Amazônia Azul compreende uma vasta extensão de aproximadamente 3,5 milhões de quilômetros quadrados de oceano (AB'SABER, 2003). Essa região é de grande importância estratégica e econômica para o Brasil, uma vez que abriga uma riqueza incomparável de recursos naturais marinhos. A Amazônia Azul possui uma ampla diversidade de ecossistemas marinhos, incluindo recifes de coral, estuários, manguezais, ilhas e uma grande variedade de espécies marinhas (CASTRO, et al., 2017).

De acordo com um levantamento realizado por Wilke e colaboradores (2021), que investigou a descoberta de produtos naturais marinhos brasileiros com potencial anticâncer, foram isoladas 393 moléculas entre os anos de 1980 e 2020. Dessas moléculas, 63 demonstraram potencial anticâncer. Dentre as quais, 31 foram objeto de estudos para entender o seu mecanismo de ação. Esses resultados destacam a relevância dos recursos marinhos brasileiros na busca por compostos com propriedades antitumorais, bem como a importância de investigar e compreender o mecanismo de ação dessas moléculas para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao câncer.

Com a utilização de microrganismos de origem marinha, os estudos apresentam maior sustentabilidade, uma vez que esses organismos podem ser cultivados em laboratório, tornando a pesquisa mais viável e com menor impacto nas comunidades marinhas. A diversidade de espécies e os potenciais inexplorados dos oceanos tornam essa vasta extensão aquática uma fonte promissora de produtos biotecnológicos e farmacêuticos. Essa abordagem oferece oportunidades para a descoberta de novos compostos e substâncias com propriedades terapêuticas, além de fornecer alternativas mais sustentáveis para a obtenção de produtos de origem marinha (WILSON et al., 2014).

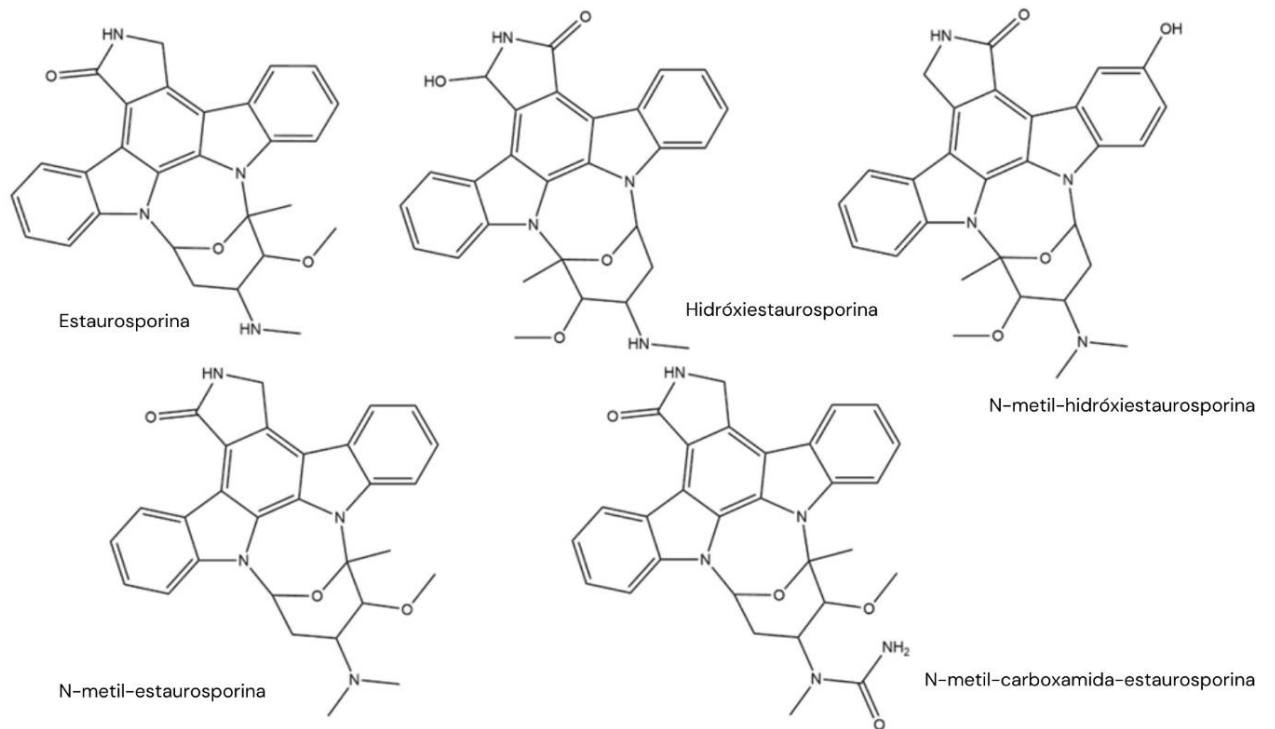
O MicroMarin é um banco de microrganismos que foram isolados em diferentes pontos da Amazônia Azul, abrangendo desde o Sul do Brasil até ilhas continentais, passando pelas regiões Sudeste e Nordeste do país. Esse banco abriga uma coleção de cerca de 1400 cepas de bactérias isoladas de diversas fontes, como sedimentos marinhos e organismos invertebrados, incluindo ascídias, esponjas e corais. Após a

identificação e catalogação, as cepas são preservadas criogenicamente, o que permite o estudo do potencial biotecnológico desses microrganismos, como a avaliação de sua citotoxicidade (MicroMarin, hospedado no site <https://www.labbmar.ufc.br/micromarinbr>).

No tratamento anticâncer, a busca por mecanismos citotóxicos é de extrema importância, uma vez que essas características podem levar as células tumorais à morte. A avaliação da toxicidade de extratos bacterianos tem possibilitado a identificação e o isolamento de várias moléculas citotóxicas, incluindo algumas que são inéditas. Estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa envolvido com o MicroMarin têm investigado o efeito dessas moléculas bioativas em linhagens tumorais, bem como o mecanismo de ação *in vitro* (FLORÊNCIO et al., 2021; GUIMARÃES et al., 2014), além de realizar triagens *in silico*, que selecionaram as mais promissoras para seguirem em etapas seguintes do desenvolvimento de fármacos (SILVA, 2022). Essas pesquisas visam contribuir para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias de combate ao câncer.

Dentre os resultados de Silva (2022), as estaurosporinas mostraram relevante potencial citotóxico. As estaurosporinas são um grupo de compostos químicos isolados a partir de várias espécies de bactérias, especialmente do gênero *Streptomyces*. Elas são conhecidas por exibirem uma ampla gama de atividades biológicas e têm despertado interesse na área da pesquisa farmacêutica, sobretudo na atividade anticâncer (WILKE, et al., 2021). Esses compostos possuem uma estrutura que consiste em um anel de indol e anéis pirrólicos fundidos, que são responsáveis por suas propriedades bioativas, como representados na Figura 3.

Figura 3 – Estaurosporinas isoladas das cepas de referência BRA 132, BRA 177, BRA 199 e BRA 213 do banco de microrganismos MicroMarin, coletadas em sedimento do arquipélago de São Pedro e São Paulo e estudadas por Silva (2022)



Fonte: Autoria própria, utilizando o *software* ChemDraw com base em SMILES do PubChem.

2 JUSTIFICATIVA

Compreender e tratar doenças complexas, como o câncer, é um desafio significativo na área da saúde. No entanto, a investigação de novos produtos naturais, especialmente os provenientes de organismos marinhos, pode oferecer novas opções terapêuticas. A natureza polifarmacológica da maioria desses compostos, ou seja, sua capacidade de interagir com múltiplos alvos biológicos, pode fornecer abordagens terapêuticas inovadoras (COSTANTINO; BARLOCCO, 2013; WHO, 2022).

O Brasil possui uma extensa área de ecossistemas marinhos, conhecida como Amazônia Azul, que abriga uma biodiversidade rica e pouco explorada. A caracterização das espécies marinhas presentes nessa região e a identificação das moléculas bioativas produzidas por organismos associados a ela têm um potencial significativo para impulsionar avanços nas áreas da farmacologia e ecologia. A investigação desses compostos bioativos permitirá não apenas o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias, além de permitir a compreensão das funções ecológicas e evolutivamente relevantes dessas substâncias no ambiente marinho (MILOSLAVICH et al., 2011; WILKE et al., 2021).

As moléculas identificadas que foram produzidas pelas bactérias do MicroMarin têm potencial não apenas como agentes citotóxicos, mas também podem desempenhar outras atividades, como a morte celular imunogénica e a autofagia (FLORÊNCIO et al., 2021; GUIMARÃES et al., 2014). Devido às limitações das metodologias de pesquisa convencionais, que geralmente são direcionadas para fins específicos, a investigação abrangente dos possíveis alvos e mecanismos de ação dessas moléculas pode ser difícil.

A otimização de fármacos é um processo crucial no desenvolvimento de novas terapias (AMARAL et al., 2003). No contexto das moléculas identificadas nos substratos do MicroMarin, a otimização envolve a reformulação de compostos que possuam eficácia terapêutica e apresentem menor toxicidade. Nesse sentido, abordagens *in silico* podem desempenhar um papel importante ao permitir a realização de estudos de triagem virtual, onde moléculas candidatas são selecionadas e avaliadas quanto à sua interação com alvos terapêuticos específicos (BRUNO et al., 2019).

Utilizando métodos computacionais avançados, é possível simular a interação entre os compostos e os alvos moleculares, prever propriedades farmacocinéticas,

estimar a toxicidade e realizar análises de atracamento molecular para identificar as conformações mais favoráveis. Essa abordagem computacional permite uma triagem rápida e com segura confiabilidade de um grande número de compostos, selecionando aqueles com maior probabilidade de sucesso terapêutico (PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019).

Além disso, a otimização de fármacos *in silico* também pode incluir a modificação estrutural das moléculas para melhorar sua atividade farmacológica, afinidade de ligação, seletividade e propriedades farmacocinéticas. Por meio de técnicas de modelagem molecular, é possível realizar simulações para refinar a estrutura dos compostos e avaliar sua estabilidade e interações com o alvo (VAN DEN ANKER et al., 2018).

A otimização de fármacos associada às abordagens *in silico* é uma estratégia eficaz para identificar e aprimorar compostos terapêuticos, maximizando sua eficácia e minimizando efeitos adversos. Essa abordagem de pesquisa colaborativa entre a bioinformática e a farmacologia tem o potencial de acelerar o desenvolvimento de novas terapias, beneficiando pacientes e avançando no campo da medicina personalizada (KONTOYIANNI, 2017).

2.1 Pergunta de partida

É possível diminuir a toxicidade das estaurosporinas sem interferir em sua atividade?

2.2 Hipótese

Modificações na estrutura das moléculas estaurosporina, hidróxiestaurosporina, n-metil-estaurosporina, n-metil-hidróxiestaurosporina e carboxamida-estaurosporina do MicroMarin, que diminuiriam sua toxicidade e manteriam seu efeito biológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Prospectar de forma alvo direcionada compostos com potencial antitumoral a partir do banco de dados MicroMarin utilizando por abordagens *in silico*.

3.2 Objetivos específicos

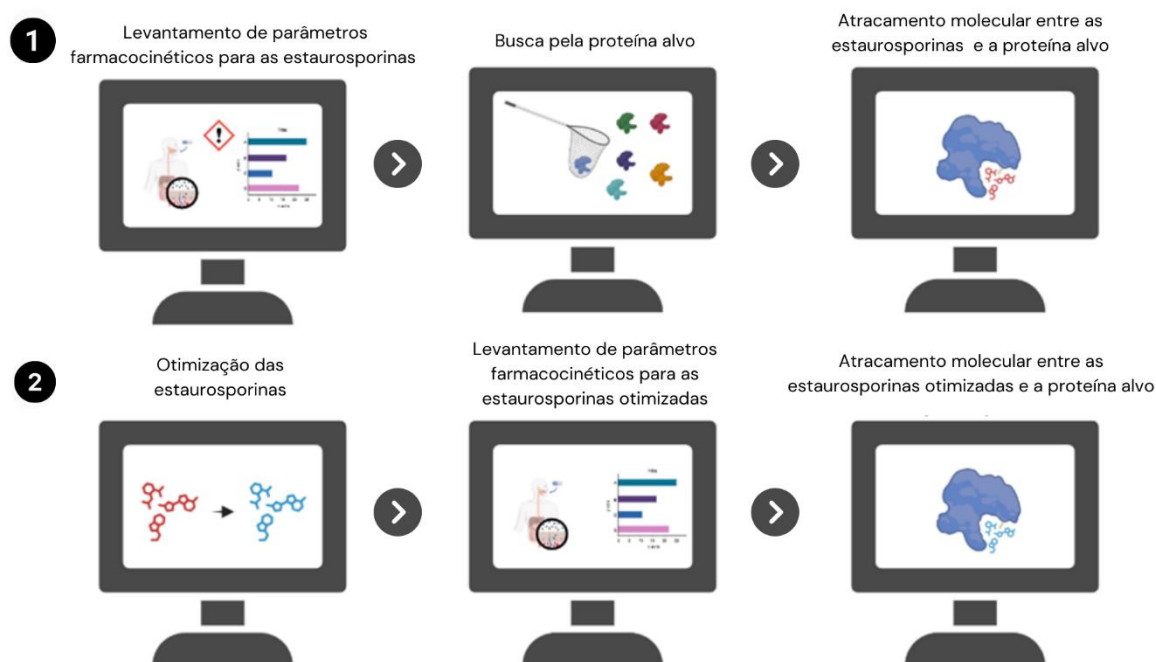
- Realizar levantamento acerca de dados farmacocinéticos, de propriedades físico-químicas e toxicidade das estaurosporinas presentes no MicroMarin, elencadas por Silva (2022) como promissoras farmacologicamente;
- Visualizar, através da bioinformática, interações entre alvos de interesse, selecionados por busca por alvo (do inglês, *target fishing*), farmacológico e oncológico das estaurosporinas presentes no MicroMarin;
- Otimizar parâmetros, por reestruturação química *in silico*, de interesse farmacológico das estaurosporinas estudadas, visando aprimoramento farmacocinético e de toxicidade sem causar alterações nas interações moleculares com alvos proteicos de interesse;
- Comparar interações com alvos proteicos antes e após a otimização estrutural das moléculas, utilizando *softwares* de visualização de interação ligante-proteína e interações intermoleculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental deste trabalho consistiu inicialmente no levantamento de características farmacocinéticas, propriedades físico-químicas e toxicidade de uma classe das moléculas mais promissoras destacadas por Silva (2022). Então, foi definido um alvo terapêutico através da técnica de busca por alvo, onde dados entre diferentes *softwares* foram cruzados chegando a uma tirosina quinase de interesse farmacológico, que foi utilizada como receptor alvo para técnicas de atracamento molecular com as moléculas de interesse, processo representado pela Figura 4.1. Dados *in silico* preliminares de toxicidade levaram à necessidade de otimização das moléculas, que foram submetidas a novos ensaios de características farmacocinéticas, propriedades físico-químicas e toxicidade. Finalmente, as moléculas com diminuição significativa na toxicidade foram submetidas a novos ensaios de atracamento molecular com a finalidade de testar interação com a proteína alvo anteriormente selecionada, representado pela Figura 4.2.

Figura 4 - Fluxo de trabalho para otimização das estaurosporinas estudadas



Fonte: Autoria própria, utilizando a plataforma BioRender.

4.2 Levantamento de características farmacodinâmicas e de toxicidade

Tais características foram obtidas utilizando códigos SMILES cruzados entre os dados prospectados por Silva (2022) e a base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). O SMILES (do inglês *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) é um modo de representação de estruturas químicas somente com caracteres normais, típicos de teclados alfanuméricos. Dados da classe de moléculas estaurosporinas foram submetidos nas plataformas online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017) e Protox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/) (BANERJEE et al., 2018).

O SwissADME é uma ferramenta computacional amplamente utilizada na área de descoberta de fármacos e desenvolvimento de medicamentos. Ela foi desenvolvida pelo *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) e tem como objetivo prever propriedades farmacocinéticas, além de solubilidade, permeabilidade através de membranas biológicas, potencial de inibição da bomba de efluxo, metabolismo hepático, potencial de interações com proteínas plasmáticas, entre outros. Além disso, o SwissADME também oferece recursos para a análise de propriedades físico-químicas, como a determinação do peso molecular, cálculo de polaridade e índices de lipofilicidade. Essas informações são cruciais para entender a relação estrutura-atividade de compostos químicos e guiar o processo de otimização de fármacos (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

O ProTox-II, é uma ferramenta computacional usada para prever a toxicidade de compostos químicos. Foi desenvolvida com o objetivo de auxiliar na avaliação do potencial de toxicidade de novos produtos químicos, como fármacos, agroquímicos, produtos químicos industriais, entre outros. O ProTox-II utiliza uma abordagem baseada em modelos de aprendizado de máquina para fazer previsões sobre diferentes aspectos de toxicidade, como toxicidade aguda, irritação dérmica, mutagenicidade, carcinogenicidade, entre outros. Os modelos são construídos com base em grandes conjuntos de dados experimentais e informações estruturais dos compostos, permitindo a classificação e a previsão da toxicidade de maneira rápida e eficiente (BANERJEE et al., 2018).

As propriedades obtidas vão desde características físico-químicas, farmacocinéticas, de semelhança medicamentosa e química medicinal à absorção, distribuição, metabolização e excreção das estaurosporinas em um organismo, sendo

também capazes de estimar sua toxicidade (pela LD50, a dose letal capaz de matar metade de uma população, ou em uma escala de 1 a 6, que utiliza os demais fatores em consideração), que compõem o APÊNDICE A deste trabalho.

A fase seguinte ao levantamento dessas características foi a prospecção *in silico* de alvos biológicos. Dois bancos de dados distintos, TargetNet e SwissTargetPrediction foram utilizados.

4.3 Busca por alvo

Para ensaios de busca por alvo de interesse (do inglês, *target fishing*) códigos SMILES das estaurosporinas foram submetidos nos servidores online SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2019) e TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index/>) (YAO et al., 2016). Os dados obtidos foram cruzados e a molécula alvo selecionada deveria estar presente em todos os arquivos de saída das duas plataformas.

O SwissTargetPrediction é uma ferramenta de bioinformática que tem como objetivo prever os alvos biológicos de pequenas moléculas químicas. Essa ferramenta utiliza um conjunto de modelos de aprendizado de máquina treinados em dados experimentais para fazer previsões sobre as interações entre as moléculas e proteínas-alvo. Ao inserir uma molécula na interface da SwissTargetPrediction, a ferramenta realiza uma análise computacional para identificar possíveis alvos biológicos associados a essa molécula. Esses alvos podem incluir proteínas, enzimas, receptores e outros componentes celulares relevantes para o efeito da molécula no organismo (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2019).

O TargetNet é uma plataforma *online* que oferece um conjunto de ferramentas para a predição de alvos farmacológicos de pequenas moléculas. Ele utiliza uma abordagem baseada em redes neurais convolucionais (bancos de dados com filtros para extrair características relevantes) treinadas em dados de interação entre compostos químicos e proteínas-alvo para prever as associações entre moléculas e alvos. De acordo com Yao et al. (2016), o valor de área sob a curva (AUC) foi identificado como o indicador com os melhores resultados na predição de alvos farmacológicos. Especificamente, o AUC mostrou uma forte correlação com o ECFP4 (do inglês, *Extended Connectivity Fingerprint up to Four Bonds*, ou impressão digital de conectividade estendida de até quatro títulos), que é um tipo de *fingerprint* (uma

impressão digital molecular) amplamente utilizado na área, ou seja, entre as várias impressões digitais moleculares disponíveis para descrever pequenas moléculas orgânicas, o ECFP4 seria o melhor aplicado na pesquisa de compostos com semelhança à fármacos (PROBST; REYMOND, 2018). Com o objetivo de filtrar um número menor de alvos e aumentar a probabilidade de interação, um limiar de corte de 0.9 foi adicionado. Isso significa que apenas as predições com uma pontuação de AUC igual ou superior a 0.9 serão consideradas como potenciais interações entre a molécula e o alvo.

Na fase seguinte foi realizado o teste de interação entre as moléculas candidatas e a proteína alvo selecionada através da busca por alvo, utilizando o servidor DockThor.

4.4 Atracamento molecular

A estrutura tridimensional do alvo foi selecionada do banco de dados ProteinDataBank (<https://www.rcsb.org/>), que é um banco de dados internacional e público que armazena informações estruturais de macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos. Esse banco é considerado uma das principais fontes de dados para pesquisadores em biologia estrutural e bioinformática. O código correspondente a proteína selecionada é 6NE7 (<https://www.rcsb.org/structure/6NE7>) (TERZYAN et al., 2019), uma mutação (no aminoácido glicina na posição 810 da sua sequência, sendo substituído por uma alanina, denominada G810A, que confere resistência tumoral à terapia medicamentosa) da proteína tirosina quinase RET que deriva a carcinogênese em diferentes tipos de câncer (HUANG et al., 2016).

Para a escolha da proteína alvo o banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizando a sequência em formato FASTA da proteína tirosina quinase RET (com o código de referência NP_001393672.1) disponível no banco de dados do NCBI, uma busca de similaridade foi realizada na plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O formato FASTA é um formato baseado em texto para representar tanto sequências de nucleotídeos quanto sequências de peptídeos. A busca na plataforma BLAST então finalizou com o achado da estrutura do domínio mutante G810A da proteína tirosina quinase RET expressa pelo proto-oncogene do receptor de tirosina-proteína quinase RET, com o código 6NE7.

As estruturas tridimensionais dos compostos foram selecionadas do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), uma base de dados aberta e pública mantida pelo NCBI, que faz parte da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos. Ele fornece informações detalhadas sobre as propriedades químicas, atividades biológicas e dados de estrutura de milhões de compostos químicos. Os SMILES fornecidos por Silva (2022) foram utilizados na barra de pesquisa do banco de dados a fim de garantir a exatidão na busca, e os resultados podem ser encontrados no APÊNDICE C deste trabalho.

As estruturas tridimensionais de proteínas alvo e ligantes em formato .pdb foram submetidas na plataforma online DockThor (<https://dockthor.incc.br/v2/>), um servidor gratuito para atracamento proteína-ligante, que permite prever a interação entre uma proteína e uma molécula pequena. Desenvolvido para auxiliar na descoberta de fármacos e na pesquisa em química medicinal.

O DockThor utiliza algoritmos de atracamento para prever a conformação e a afinidade de ligação entre a proteína alvo e a molécula ligante. Ele permite ao usuário enviar suas estruturas de proteína e moléculas ligantes para análise, executando cálculos de acoplamento e fornecendo resultados que podem auxiliar na seleção de candidatos a fármacos ou no estudo de interações moleculares (GUEDES et al., 2021). E os dados de saída, com os *bestrankings* (as posições que demonstraram melhor afinidade proteína-ligante), estão disponibilizados no APÊNDICE D deste trabalho.

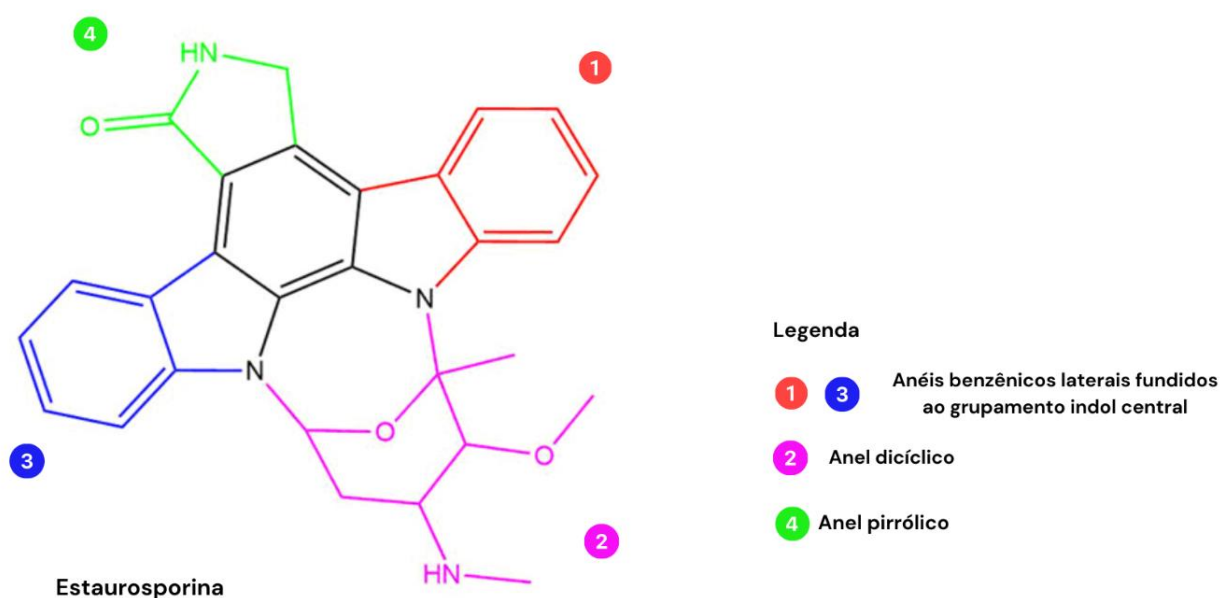
Os arquivos de saída obtidos no servidor de atracamento molecular DockThor foram analisados utilizando os *softwares* PyMOL, da empresa Schrödinger, para geração de representações tridimensionais e BIOVIA Discovery Studio Visualizer, da empresa Dassault Systèmes, para visualização das interações entre ligante e receptor. Após os ensaios de atracamento molecular, também foram realizados ensaios entre a proteína sob ação das estaurosporinas e o ATP, a fim de estabelecer um padrão de atividade *in silico* a servir de comparação para as moléculas após a otimização.

Na fase seguinte foi realizada a otimização dos compostos, visando a diminuição de sua toxicidade, utilizando o *software* ChemDraw, com posteriores comparações entre dados obtidos das estaurosporinas antes e após a otimização.

4.5 Otimização das estaurosporinas

O *software* ChemDraw foi utilizado para otimização das estaurosporinas estudadas. Com o ChemDraw, foi possível desenhar e visualizar diferentes análogos e derivados das moléculas iniciais, realizando alterações estruturais. Essas modificações rápidas e precisas, permitiram a geração de uma série de compostos relacionados para avaliação de atividade biológica e propriedades farmacocinéticas. A Figura 5 mostra as modificações feitas na estrutura das estaurosporinas.

Figura 5 - Modificações realizadas nos anéis cíclicos das estaurosporinas



Fonte: Autoria própria utilizando o *software* ChemDraw.

No processo de otimização de fármacos utilizando o ChemDraw, as modificações nas estruturas das moléculas eram realizadas nas partes coloridas separadas, geralmente divididas em quatro partes. Para gerar uma nova molécula, apenas uma estrutura era removida, e a denominação da nova molécula era baseada na estrutura que foi retirada. Por exemplo, se a estrutura "1" fosse removida da estaurosporina representada na Figura 5, seria gerada a estaurosporina 1, e assim por diante. No entanto, em alguns casos, ao remover determinadas estruturas, as moléculas resultantes eram exatamente iguais, o que levava a um número menor de moléculas otimizadas do que o esperado. As moléculas otimizadas podem ser encontradas no APÊNDICE C.

Após otimização, novos ensaios de características farmacocinéticas, propriedades físico-químicas e toxicidade foram realizados, com as informações integralmente disponibilizadas no APÊNDICE A. Os resultados mais promissores foram submetidos a ensaios de atracamento molecular com o intuito de visualizar modificações nas interações entre a proteína alvo e as estaurosporinas otimizadas, os resultados entre os ensaios de atracamento molecular foram comparados.

O atracamento molecular realizado após a otimização também foi realizado com moléculas de ATP e a proteína sob ação das estaurosporinas otimizadas, a fim de monitorar a atividade *in silico* dos compostos, verificando se sua capacidade de interferir com a interação intramolecular entre ATP e proteína tirosina quinase era mantida.

5 RESULTADOS

5.1 Levantamento de características farmacodinâmicas e de toxicidade

O levantamento das características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas das estaurosporinas e das estaurosporinas reformuladas resultou no APÊNDICE A, as Tabelas 1 e 2 mostram seus valores mais relevantes:

Tabela 1 - Dados mais relevantes de características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas das estaurosporinas

Molécula	Fórmula	Absorção gastrointestinal	Permeação a barreira hematoencefálica	Substrato da glicoproteína P	Dentro das regras de Lipinski	Peso molecular (g/mol)	TPSA (Å ²)	Log P o/w (consenso)	Solubilidade (Log S/ESOL)
Estaurosporina	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	Alto	Sim	Sim	Sim	466.53	69.45	3.11	Moderadamente solúvel
Hidróxiestaurosporina	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₄	Alto	Não	Sim	Sim	482.53	89.68	2.35	Moderadamente solúvel
Metil-estaurosporina	C ₂₉ H ₂₈ N ₄ O ₃	Alto	Sim	Sim	Sim	480.56	60.66	3.33	Moderadamente solúvel
Metil-hidróxiestaurosporina	C ₂₉ H ₂₈ N ₄ O ₄	Alto	Não	Sim	Sim	496.56	80.89	2.97	Moderadamente solúvel
Carboxamida-estaurosporina	C ₂₉ H ₂₇ N ₅ O ₄	Alto	Não	Sim	Sim; apenas peso molecular > 500	509.56	103.75	2.51	Moderadamente solúvel

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Dados mais relevantes de características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas das estaurosporinas otimizadas

Solubilidade (Log S/ESOL)	Absorção gastrointestinal	Permeação a barreira hematoencefálica	Substrato da glicoproteína P	Dentro das regras de Lipinski	Peso molecular (g/mol)	TPSA (Å ²)	Log P o/w (consenso)	Fórmula	Molécula
Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Sim	Sim	466.53	69.45	3.11	C28H26N4O3	Estaurosporina 1
Moderadamente solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	482.53	89.68	2.35	C28H26N4O4	Estaurosporina 2
Solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	408.45	96.78	1.45	C22H24N4O4	Hidróxiestaurosporina 1
Solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	408.45	96.78	1.37	C22H24N4O4	Hidróxiestaurosporina 2
Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Sim	Sim	406.48	67.76	2.11	C23H26N4O3	N-metil-estaurosporina 1
Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Sim	Sim	406.48	67.76	2.12	C23H26N4O3	N-metil-estaurosporina 2
Solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	422.48	87.99	1.77	C23H26N4O4	N-metil-hidróxiestaurosporina 2
Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Sim	Sim	441.52	51.79	3.72	C27H27N3O3	N-metil-hidróxiestaurosporina 3
Solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	435.48	110.85	1.30	C23H25N5O4	N-carboxamida-estaurosporina 2
Moderadamente solúvel	Alto	Não	Sim	Sim	454.52	74.65	3.28	C27H26N4O3	N-carboxamida-estaurosporina 3

Fonte: Autoria própria.

Dentre os parâmetros, o peso molecular pode determinar a dosagem correta de um composto, para avaliar sua estabilidade e solubilidade, o TPSA (Área Superficial Polar Total, do inglês *Total Polar Surface Area*) é uma medida que quantifica a área superficial polar de uma molécula e é utilizado como uma medida de polaridade e capacidade de interação de uma molécula com outras substâncias, como receptores biológicos, também sendo responsável pela capacidade de atravessar membranas biológicas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; VAN DEN ANKER et al., 2018).

O Log P o/w (coeficiente de partição octanol/água em logaritmo) é uma medida que indica a lipofilia de uma molécula. Também é utilizado para estimar a capacidade de uma molécula atravessar membranas biológicas, como a barreira hematoencefálica, e para prever sua distribuição nos tecidos. Moléculas com um Log P o/w alto são mais lipofílicas e têm maior tendência a se acumular em tecidos adiposos, enquanto moléculas com um Log P o/w baixo são mais hidrofílicas e tendem a se distribuir mais facilmente na água. O consenso do Log P o/w é uma estimativa obtida a partir de diferentes métodos e modelos de cálculo disponíveis na literatura. É considerado um valor médio que leva em conta várias abordagens para determinar a lipofilia de uma molécula (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2014).

A solubilidade de uma substância é uma medida da sua capacidade de se dissolver em um solvente específico, geralmente água. O Log S, ou Logaritmo da Solubilidade, é uma forma de expressar numericamente a solubilidade de uma molécula em um determinado solvente. O valor de Log S/ESOL é uma estimativa específica fornecida pelo programa ESOL (*Estimated Log S*) que utiliza um modelo de aprendizado de máquina para prever a solubilidade de uma molécula em água. Um valor positivo de Log S indica alta solubilidade em água, enquanto um valor negativo indica baixa solubilidade. Essa medida é particularmente relevante na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, pois a solubilidade de uma substância está relacionada à sua absorção, distribuição e eficácia no organismo (DELANEY, 2004).

A regra dos 5 de Lipinski é um conjunto de critérios desenvolvidos por Christopher A. Lipinski, um cientista farmacêutico, para avaliar a adequação de um composto químico para ser um fármaco oral eficaz. Essas regras são frequentemente utilizadas na fase inicial do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos para filtrar e priorizar compostos com maior probabilidade de sucesso. As regras de Lipinski são as seguintes: seu peso molecular (PM) não deve exceder 500 Daltons;

Log P não deve ser superior a 5; o número de doadores de hidrogênio ligados ao nitrogênio não deve ser superior a 5; o número de aceitadores de hidrogênio não deve ser superior a 10 (LIPINSKI, 2004).

A glicoproteína P (P-gp), também conhecida como MDR1 (*Multidrug Resistance Protein 1*), é uma proteína de transporte presente em várias membranas do organismo, incluindo a membrana celular do intestino, fígado, rins e barreira hematoencefálica. A principal função da glicoproteína P é atuar como uma bomba de efluxo, transportando uma ampla variedade de compostos para fora das células, incluindo muitos fármacos (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001). Ela desempenha um papel crucial na farmacocinética de vários medicamentos, pois pode reduzir sua absorção, distribuição e excreção, resultando em níveis sanguíneos mais baixos e menor eficácia terapêutica. Portanto, identificar se um fármaco é um substrato da glicoproteína P é importante para entender seu perfil de transporte e possíveis interações medicamentosas (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

O levantamento das toxicidades das estaurosporinas e estaurosporinas otimizadas resultou no APÊNDICE A, as Tabelas 3 e 4 mostram seus valores mais relevantes:

Tabela 3 - Dados mais relevantes de toxicidade das estaurosporinas

Molécula	Toxicidade prevista	LD50 previsto (mg/kg)	Imunotoxicidade	Mutagenicidade	Citotoxicidade
Estaurosporina	4	1000	++	-	++
Hidróxiestaurosporina	2	11	++	-	+
Metil-estaurosporina	4	1000	++	-	+
Metil-hidróxiestaurosporina	2	11	++	-	+
Carboxamida-estaurosporina	2	11	++	-	+

Legenda: ++: altamente ativo; +: ativo; -: inativo.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Dados mais relevantes de toxicidade das estaurosporinas otimizadas

Molécula	Toxicidade prevista	LD50 previsto (mg/kg)	Imunotoxicidade	Mutagenicidade	Citotoxicidade
Estaurosporina 1	4	2000	-	-	++
Estaurosporina 2	6	12800	++	-	++
Hidróxiestaurosporina 1	4	2000	++	-	+
Hidróxiestaurosporina 2	5	5000	+	-	+
N-metil-estaurosporina 1	4	2000	++	-	+
N-metil-estaurosporina 2	6	12800	+	-	+
N-metil-hidróxiestaurosporina 2	6	12800	++	-	+
N-metil-hidróxiestaurosporina 3	3	125	++	-	-
N-carboxamida-estaurosporina 2	6	12800	++	-	+
N-carboxamida-estaurosporina 3	2	16	++	-	-

Legenda: ++: altamente ativo; +: ativo; - inativo.

Fonte: A autoria própria.

As tabelas contam com indicativos de alta e baixa atividade mutagênica, imunotóxica ou citotóxica, sendo representados como altamente ativo para a determinada característica como “++” e com baixa atividade para a característica como “+”. Enquanto os indicativos de “-” referem-se à inatividade da característica pela molécula. São desejáveis inatividade imunotóxica e mutagênica, porém, atividade citotóxica é o esperado de um medicamento sendo prospectado pelo seu potencial anticancerígeno (ALMEIDA et al., 2005).

A mutagenicidade refere-se à capacidade de uma substância causar danos ao material genético (DNA) das células. Substâncias mutagênicas têm o potencial de induzir alterações permanentes no DNA (CHATTERJEE; WALKER, 2017). A citotoxicidade é a capacidade de uma substância causar danos às células e levar à sua morte ou disfunção. Substâncias citotóxicas podem afetar diferentes tipos de células no organismo, incluindo células saudáveis (SUN et al., 2020). A imunotoxicidade refere-se à capacidade de uma substância ou medicamento causar alterações no sistema imunológico. Substâncias imunotóxicas podem afetar a

resposta imunológica normal do organismo, incluindo a capacidade de combater infecções e doenças (HASTINGS, 2018). Isso pode resultar em um aumento da suscetibilidade a infecções, supressão do sistema imunológico ou reações imunológicas indesejadas (BANERJEE et al., 2018).

Características citotóxicas de compostos são explicadas por diferentes mecanismos celulares já bem definidos em fármacos empregados na clínica do tratamento do câncer, dentre eles estão: a inibição da divisão celular, indução da apoptose, danos ao DNA e até a inibição de vias de sinalização celular, como a inibição de proteínas responsáveis pela proliferação celular (KATZUNG; TREVOR, 2017).

As toxicidades apresentadas, LD50 ou prevista, são respectivamente a dose letal média, um parâmetro utilizado para medir a toxicidade aguda de uma substância e a previsão entre 1 e 6 da toxicidade geral do composto, sendo 1 a maior toxicidade que o *software* pode prever e 6 a menor. A LD50 representa a dose única de uma substância que é esperada para causar a morte de 50% de uma população de animais de teste, geralmente ratos ou camundongos, quando administrada por via oral, dérmica ou inalatória. A LD50 é expressa em miligramas (mg) de substância por quilograma (kg) de peso corporal dos animais (BANERJEE et al., 2018).

A otimização das moléculas estudadas através do *software* ChemDraw resultou no APÊNDICE C deste trabalho, onde podem ser encontradas tanto as estaurosporinas antes das modificações na estrutura, quanto as que resultaram dessas.

5.2 Busca por alvo

Ensaio de busca por alvo (do inglês, *target fishing*) realizados nas plataformas online TargetNet e SwissTargetPrediction resultaram no APÊNDICE B. A proteína foi selecionada utilizando cruzamento de dados entre as duas plataformas, sendo a proteína tirosina quinase RET a única presente nas duas plataformas quando todas as cinco estaurosporinas iniciais foram submetidas.

E posteriormente foi submetida a ensaios de atracamento molecular, que serão comentados mais a frente. A tirosina quinase RET (do inglês, *Rearranged during Transfection*) é uma enzima que desempenha um papel crucial no desenvolvimento e na função do sistema nervoso, bem como na regulação do crescimento celular e na

sobrevivência (SAARMA, 2009). A tirosina quinase RET é especialmente conhecida por seu envolvimento em doenças como o câncer de tireoide e o câncer de pulmão de pequenas células (MULLIGAN, 2014).

Dentre os resultados presentes nas buscas por alvo, em sua maioria foi notado a presença de quinases, corroborado com dados da literatura que a caracterizam como um inibidor multiquinases (OMURA et al., 1995; ÔMURA; ASAMI; CRUMP, 2018). Entre as quinases presentes, também recorrentes (mas não em todas as buscas) foram as proteínas tirosina quinase SYK e ZAP-70. A tirosina quinase SYK está envolvida na transdução de sinal em uma variedade de tipos celulares, e sua regulação aberrante está associada a diferentes doenças alérgicas e doenças autoimunes mediadas por anticorpos, como artrite reumatoide, asma e rinite alérgica (RICCABONI; BIANCHI; PETRILLO, 2010). Também desempenhando um papel importante no crescimento descontrolado de células tumorais, particularmente células B do sistema imune (CORNALL et al., 2000).

Já a tirosina quinase ZAP-70 possui peso molecular de 70 kDa (kilodaltons), responsável por seu nome e é um membro da família proteína tirosina quinase homólogo próximo da tirosina quinase SYK. Normalmente expressa perto da membrana superficial dos linfócitos (células T, células natural killer e um subconjunto de células B) (CHEN; MOORE; RINGSHAUSEN, 2020). Devido ao seu papel na sinalização linfocitária, o ZAP-70 tem sido associado a diversas doenças que afetam os linfócitos, sendo um indicador significativo da sobrevivência de linfócitos e tem sido notavelmente associada à leucemia linfocítica crônica (LIU et al., 2018).

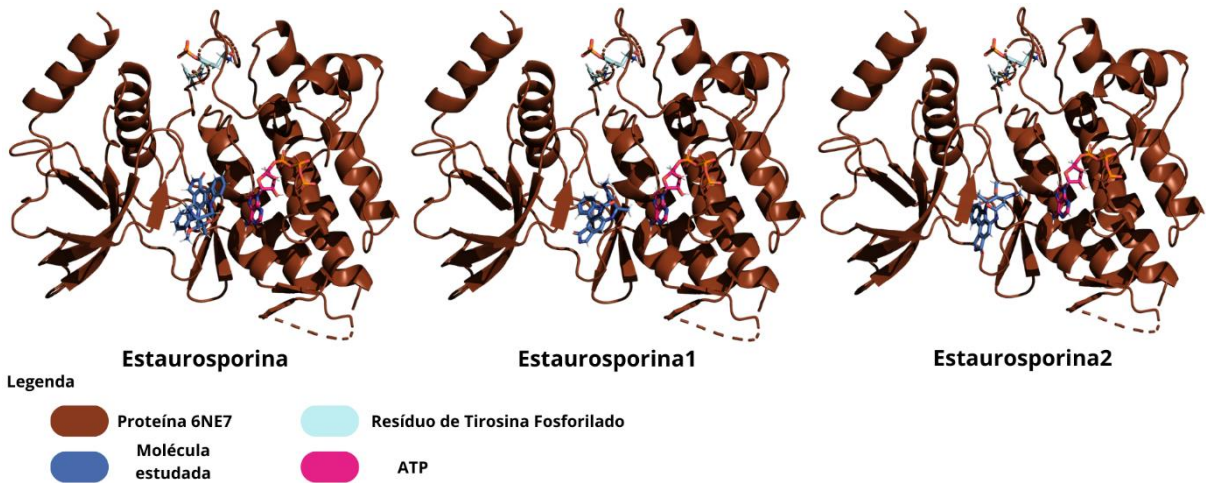
Dentre os achados, foram encontradas também interações das estaurosporinas com um membro da superfamília de proteínas do citocromo P450, a CYP11B2. Essas enzimas são responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis, enquanto a isoforma CYP11B2 é uma enzima envolvida na biossíntese do mineralocorticoide aldosterona e outros esteroides (TAKEDA et al., 2021).

5.3 Atracamento molecular

Dados referentes a energia de ligação e forças eletrostáticas envolvendo os ensaios de atracamento molecular estão apresentadas no APÊNDICE D deste

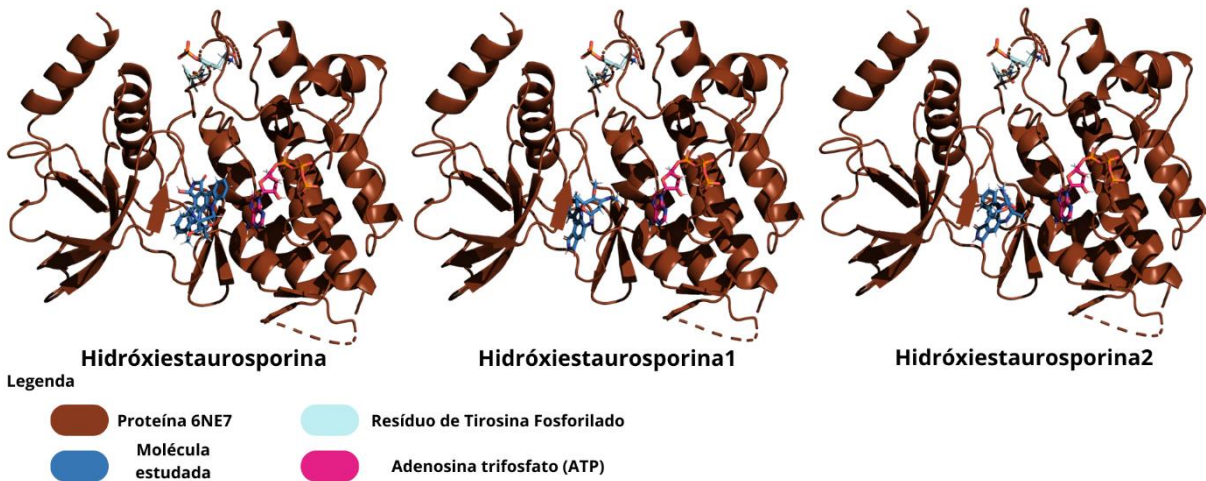
trabalho. As Figuras 6 a 10 representam as interações entre receptor proteico e ligante de baixo peso molecular.

Figura 6 - Ensaio de atracamento molecular entre as estaurosporinas e a proteína 6NE7



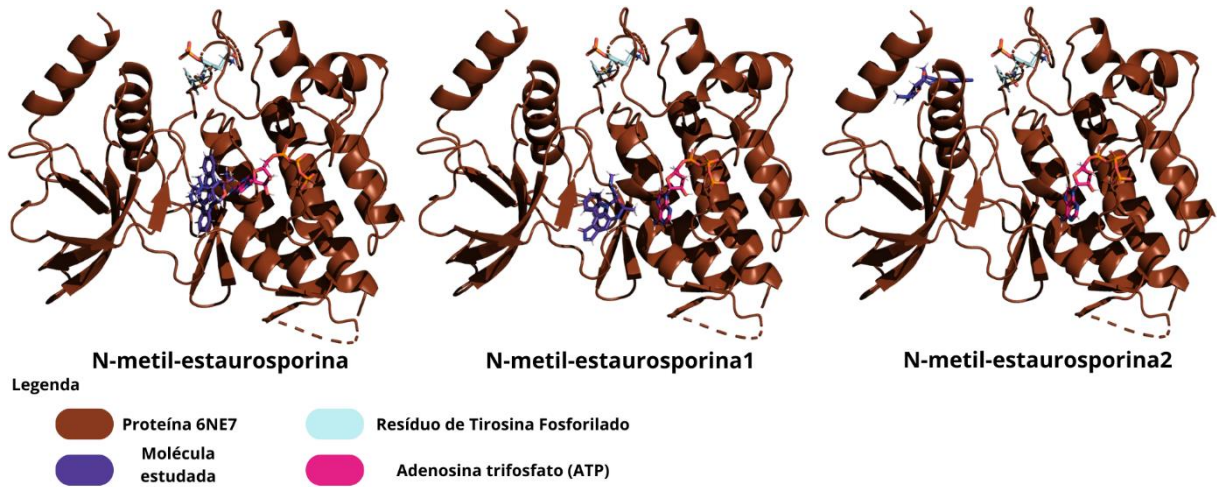
Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Ensaio de atracamento molecular entre as hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7



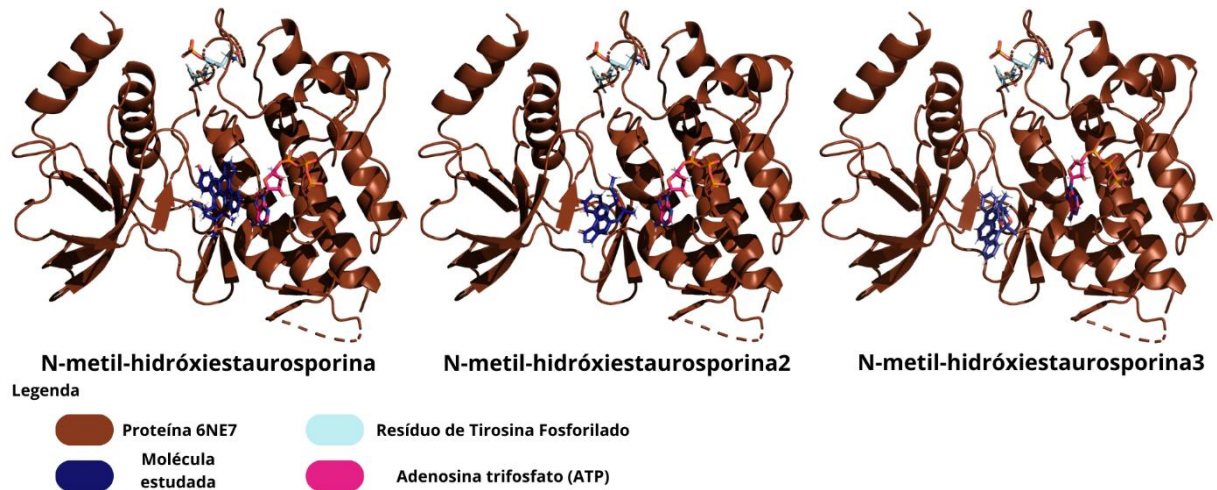
Fonte: Autoria própria.

Figura 8 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-metil-estaurosporinas e a proteína 6NE7



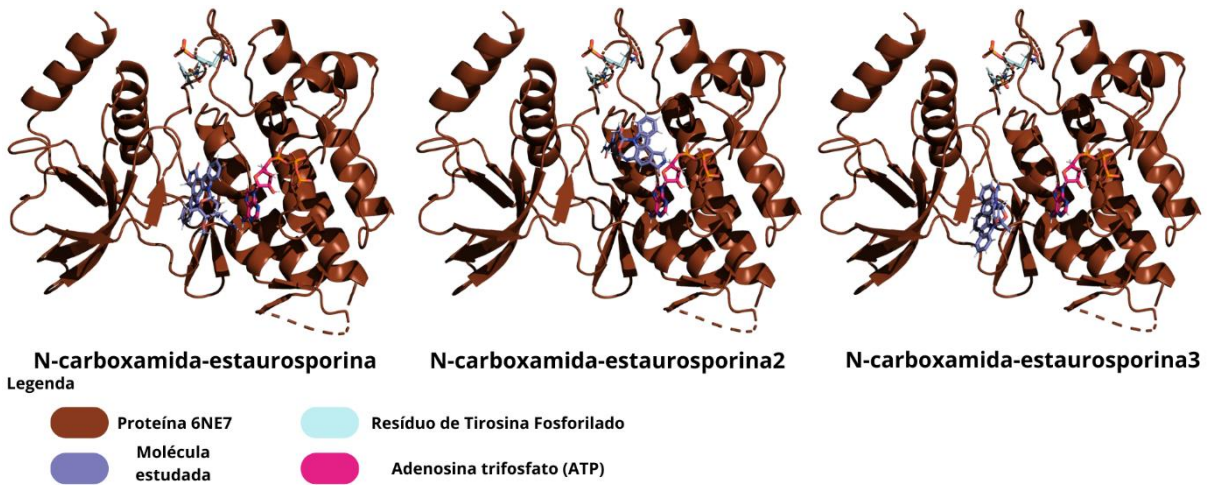
Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-metil-hidróxiestaurosporinas a proteína 6NE7



Fonte: Autoria própria.

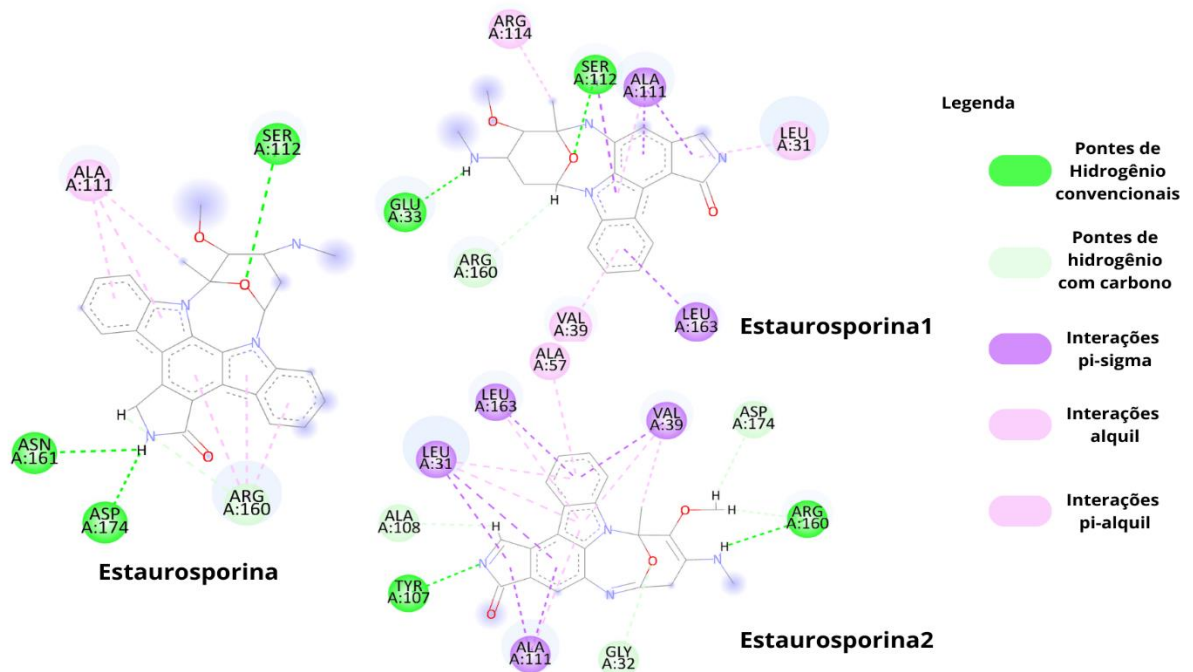
Figura 10 - Ensaio de atracamento molecular entre as N-carboxamida-estaurosporinas e a proteína 6NE7



Fonte: Autoria própria.

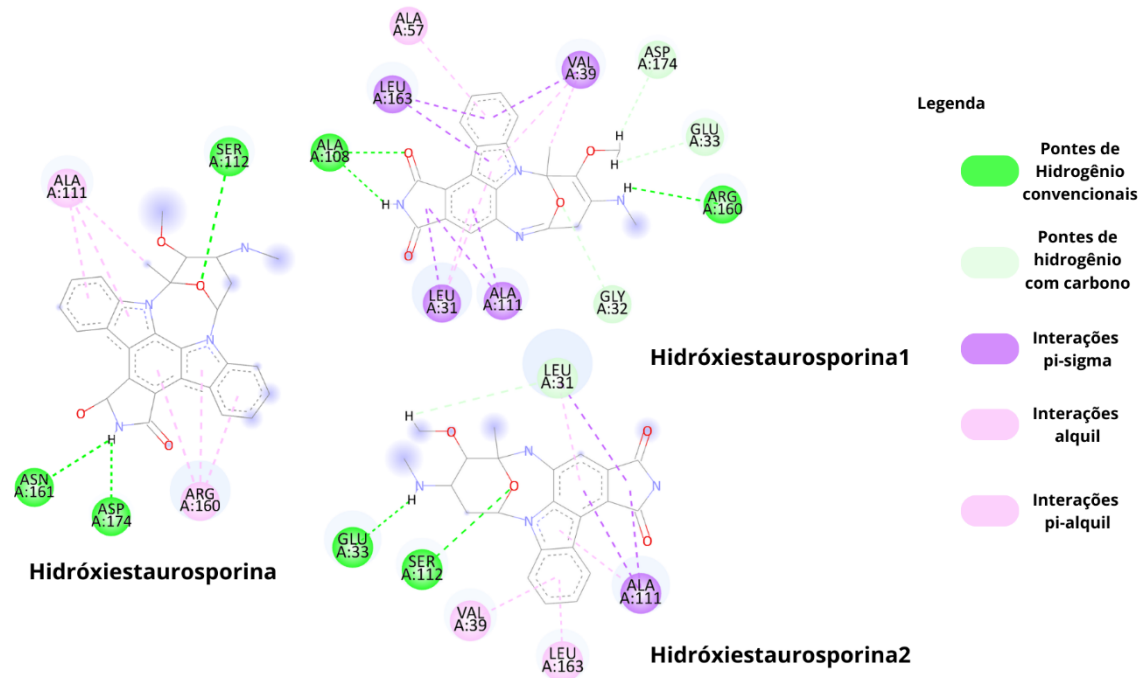
As interações moleculares entre as proteínas e as moléculas de forma mais detalhada estão representadas nas Figuras 11 a 15, apresentadas a seguir:

Figura 11 - Interações moleculares entre as estaurosporinas e a proteína 6NE7



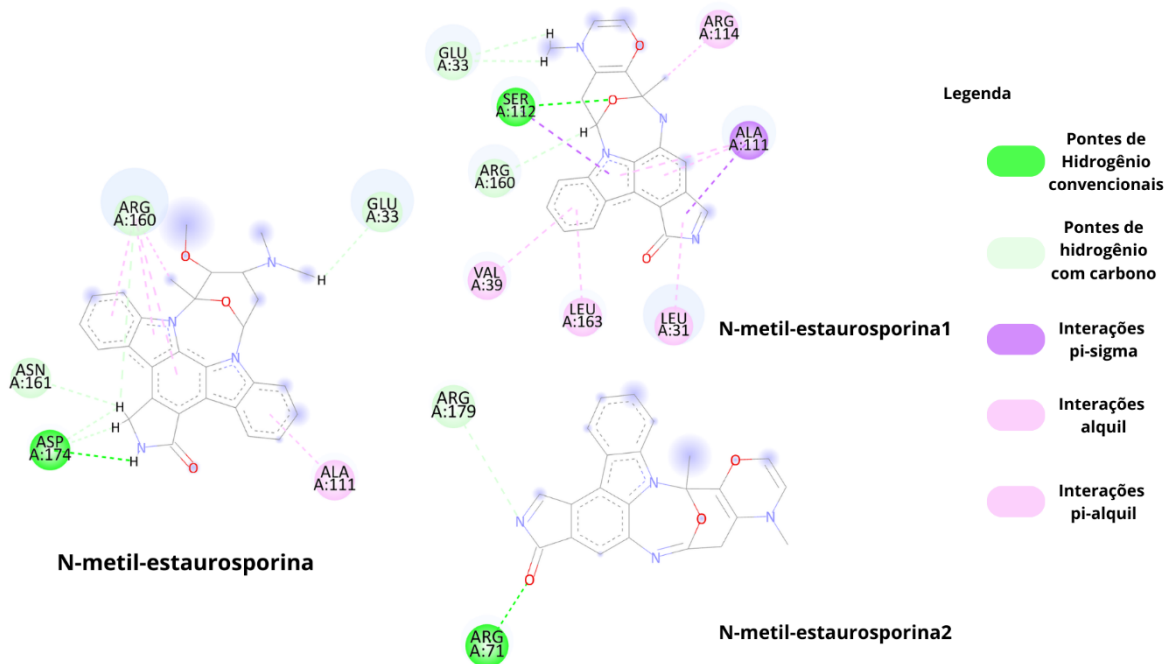
Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Interações moleculares entre as hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7



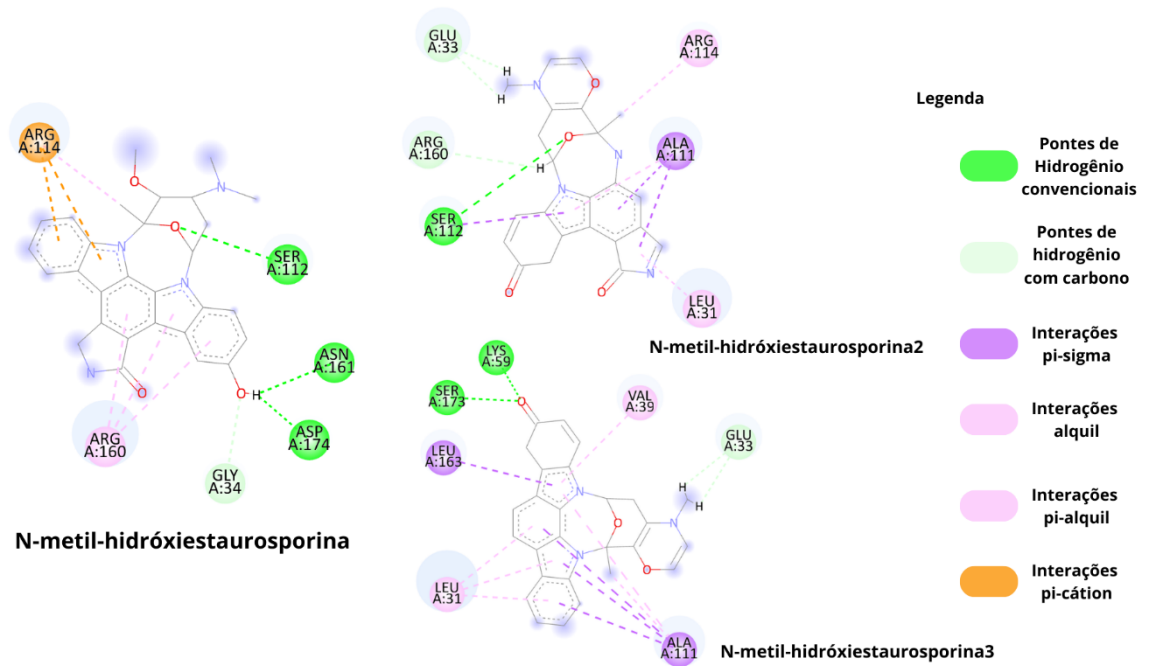
Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Interações moleculares entre as N-metil-estaurosporinas e a proteína 6NE7



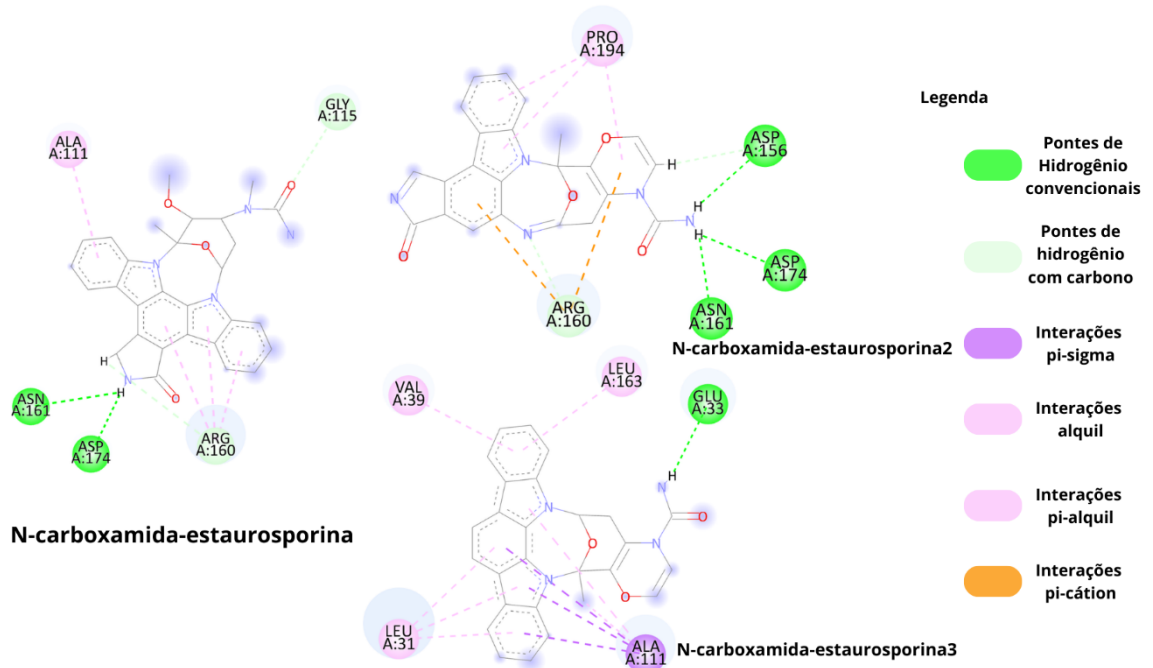
Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Interações moleculares entre as N-metil-hidróxiestaurosporinas e a proteína 6NE7



Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Interações moleculares entre as N-carboxamida-estaurosporinas e a proteína 6NE7



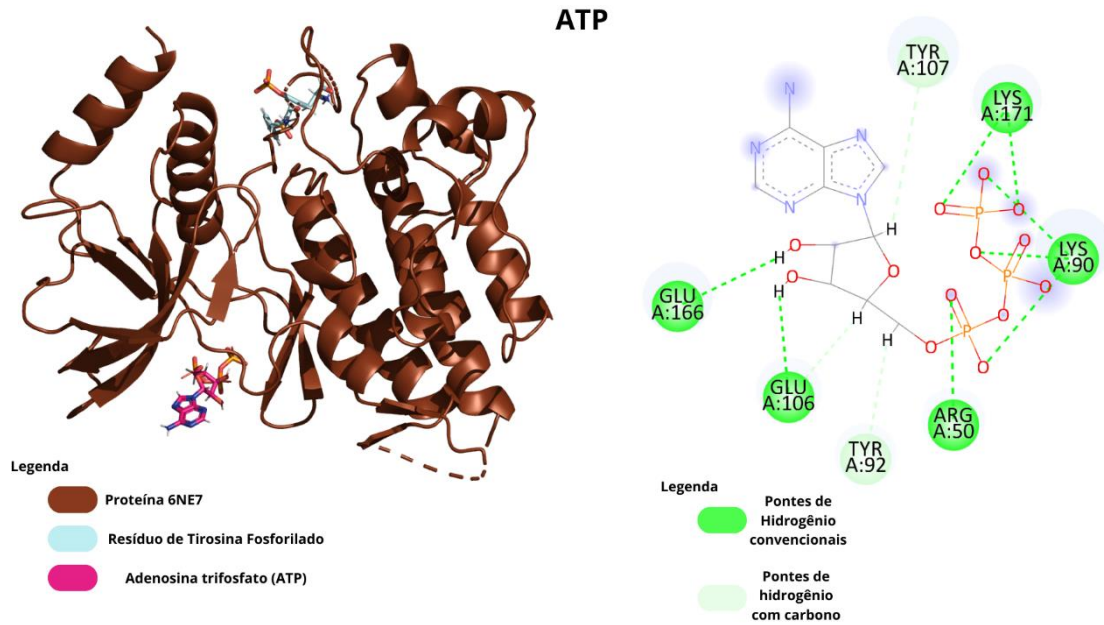
Fonte: Autoria própria.

Após os ensaios iniciais, de interações entre as moléculas estudadas e a proteína alvo, a atividade *in silico* foi investigada. A Figura 16, apresentada a seguir, será utilizada como modelo de interação entre a proteína alvo e o ATP. Modulações nessas interações serão consideradas como efeitos *in silico* das moléculas estudadas (SILVA, et al., 2019).

As tirosinas quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas-alvo. A fosforilação da tirosina é uma modificação pós-traducional importante que regula a atividade de muitas proteínas celulares (HUBBARD; TILL, 2000). O ATP serve como uma fonte de energia para a atividade das tirosinas quinases. Durante a reação de fosforilação, uma molécula de ATP é hidrolisada, liberando uma molécula de adenosina difosfato (ADP) e um grupo fosfato. Esse grupo fosfato é transferido para o resíduo de tirosina na proteína-alvo, resultando na fosforilação da tirosina (TRAXLER et al., 1997). Inibidores de tirosina quinase comumente possuem um grupo farmacofórico que mimetiza a adenina (um dos componentes do ATP), além de grupos aromáticos, oxigenados ou nitrogenados que penetram na fenda catalítica da proteína quinase, realizando interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (SILVA, et al., 2019).

O modelo utiliza o ATP e correlaciona suas interações entre as estaurosporinas e o nintedanibe. O nintedanibe um fármaco regulamentado e utilizado na clínica como inibidor de quinases, ao qual a proteína alvo, tirosina quinase RET G810A, é sensível (TERZYAN et al., 2019; HUANG, et al., 2016)). O nintedanibe se liga competitivamente ao sítio de ligação de ATP do receptor e bloqueia a sinalização intracelular, crucial para a proliferação.

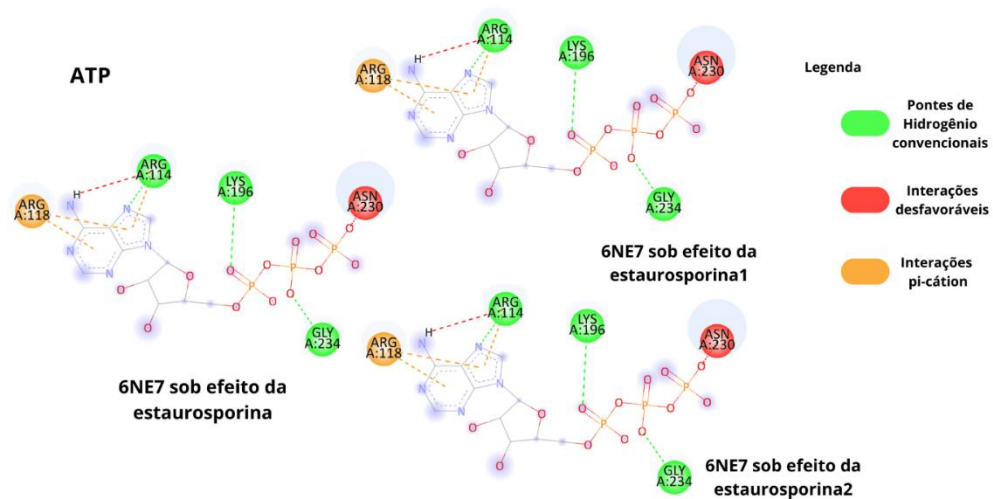
Figura 16 - Atracamento molecular e interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, que serão utilizados como interações modelo para atividades *in silico* das moléculas estudadas



Fonte: Autoria própria.

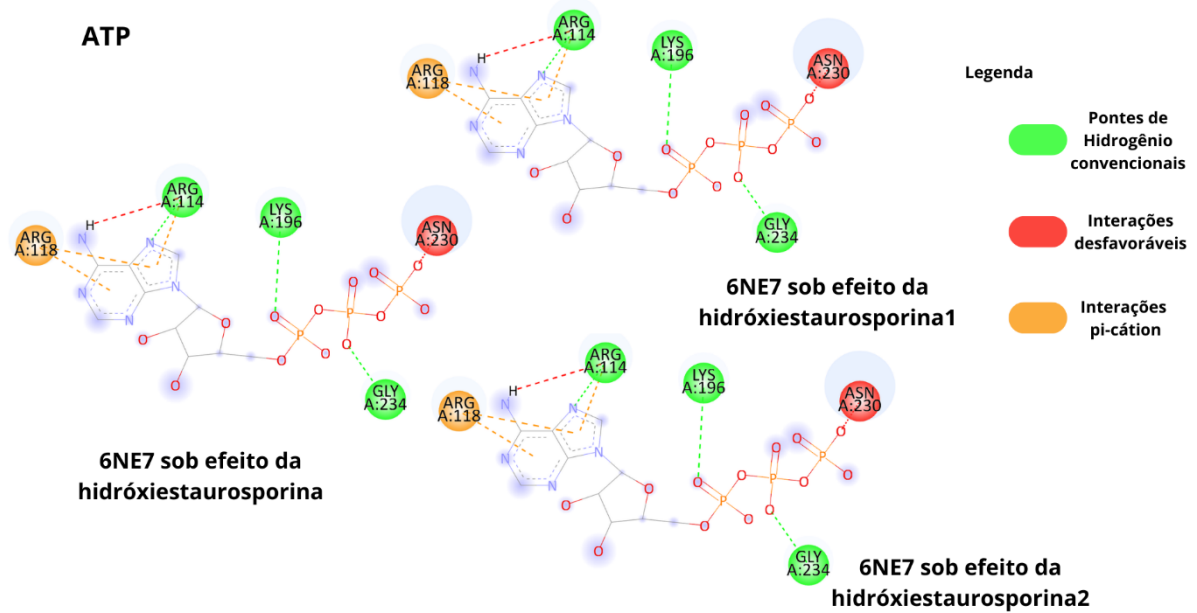
As Figuras 17 a 21 demonstram interações entre o ATP, molécula a ser bloqueada, o receptor de interesse sob efeito dos compostos estudados após a otimização estrutural.

Figura 17 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das estaurosporinas



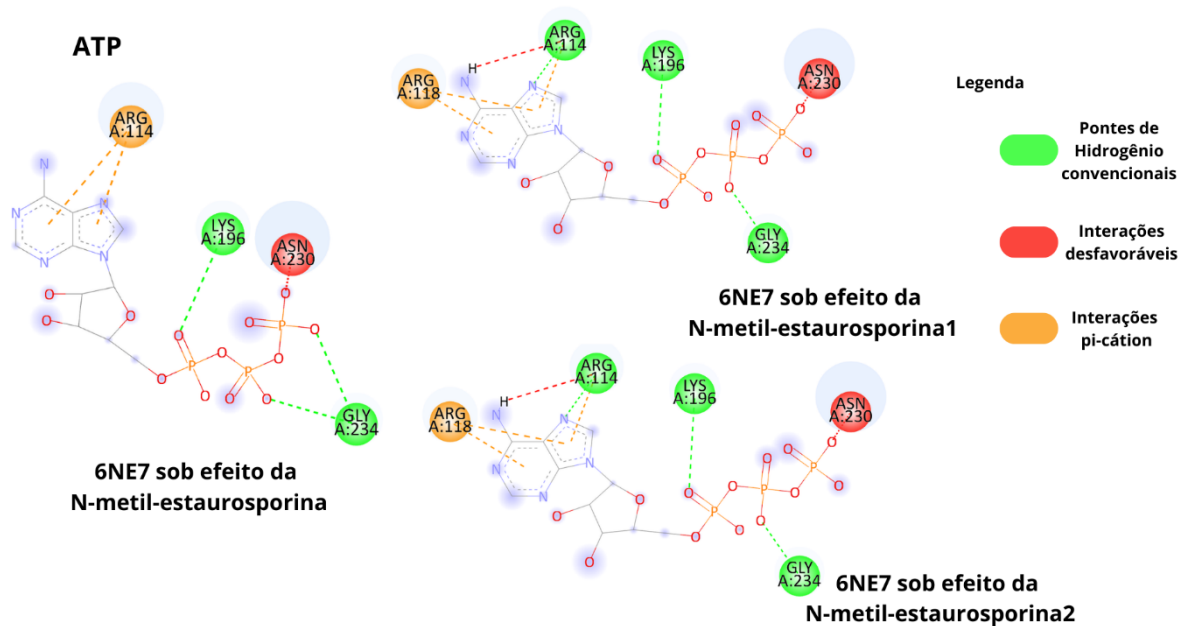
Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das hidróxiestaurosporinas



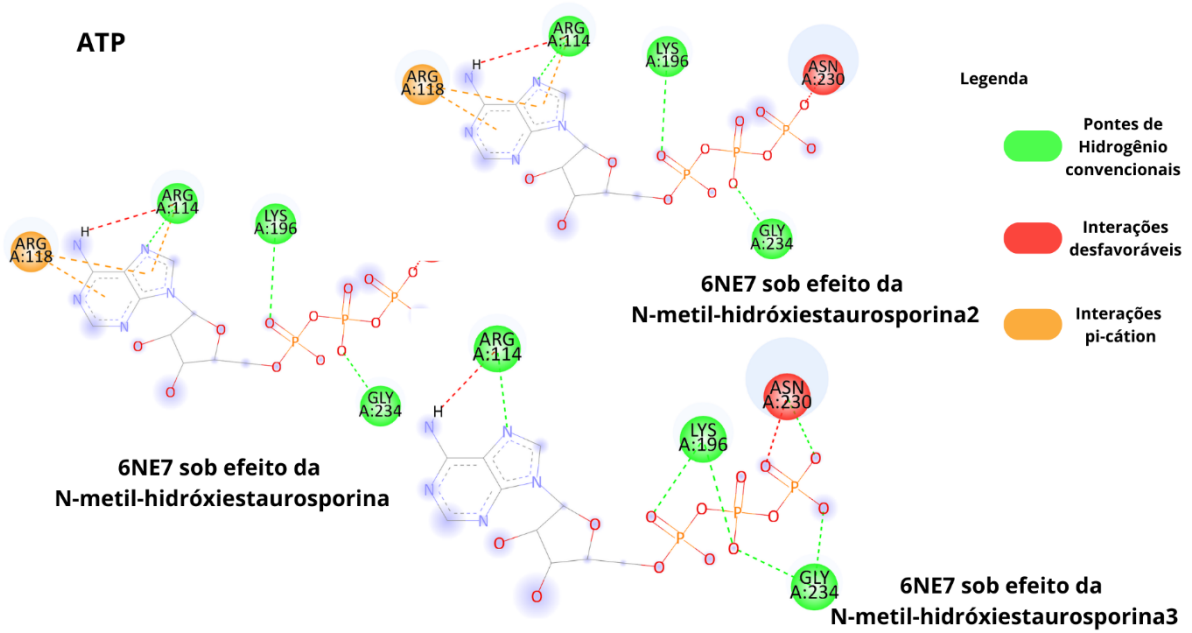
Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-metil-estaurosporinas



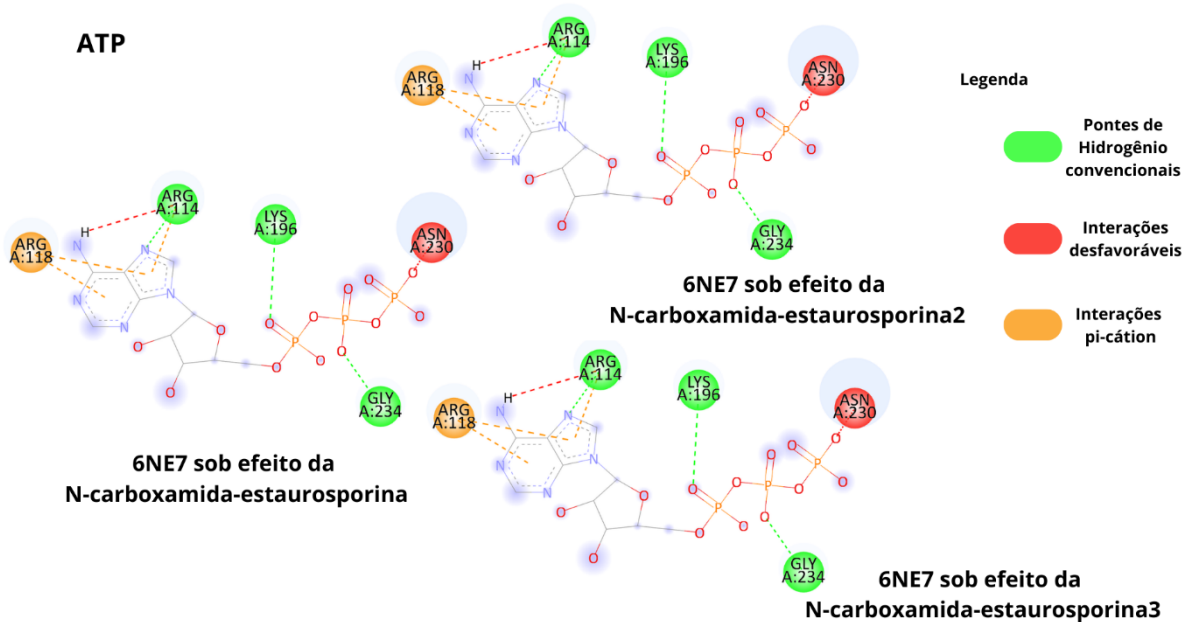
Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-metil-hidróxiestaurosporinas



Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Interações moleculares entre o ATP e a proteína 6NE7, sob efeito das N-carboxamida-estaurosporinas



Fonte: Autoria própria.

As interações intermoleculares apresentadas foram divididas em: pontes de hidrogênio convencionais, interações atrativas entre um átomo de hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo (como oxigênio, nitrogênio ou flúor) e outro átomo eletronegativo. Sendo responsáveis por muitas propriedades físicas e químicas importantes, como a solubilidade da água e a estabilidade de estruturas biológicas, como o DNA (KLEIN, 2017; (HERSCHLAG; PINNEY, 2018).

Também são apresentadas pontes de hidrogênio com o carbono, embora a ponte de hidrogênio seja mais comum entre o hidrogênio e os átomos eletronegativos, também é possível ocorrer pontes de hidrogênio com carbono. Isso acontece quando um átomo de hidrogênio ligado a um carbono eletronegativo (como um grupo carbonila) interage com outro átomo eletronegativo, como oxigênio ou nitrogênio. Essas interações podem ocorrer em compostos orgânicos, como cetonas e ésteres, e também podem ter efeitos importantes nas propriedades químicas dessas moléculas (DUTTA et al., 2022).

As demais interações apresentadas: pi-sigma, pi-alquil, ou pi-cátion referem-se a interações fracas entre uma nuvem eletrônica pi (ligação pi) e uma nuvem eletrônica sigma (ligação sigma), um grupo alquila ou um cátion (ion carregado positivamente), respectivamente. As ligações pi são encontradas em sistemas conjugados de dupla ou tripla ligação, onde os elétrons são distribuídos acima e abaixo do plano da molécula. Os grupos alquil são grupos de hidrocarbonetos (por exemplo, metil, etil, propil) que consistem apenas em carbono e hidrogênio. Essas interações podem ter influência nas propriedades físicas e químicas de compostos orgânicos, podendo influenciar a conformação molecular, a estabilidade de compostos e reações químicas (ALONSO et al., 2014).

As interações alquil, também conhecidas como interação hidrofóbicas, referem-se a uma interação fraca entre grupos alquila em moléculas diferentes. Essas interações ocorrem quando os grupos alquil evitam a interação com a água ou outros solventes polares, agrupando-se para minimizar o contato com a fase aquosa. Essa é uma das principais forças que contribuem para a formação de micelas e agregados moleculares em sistemas não polares ou anfífilos (KLEIN, 2017).

As interações químicas desfavoráveis, são interações químicas de repulsão e referem-se a forças eletrostáticas que ocorrem entre cargas ou nuvens eletrônicas que se repelem mutuamente. Essas interações são importantes na compreensão da estrutura molecular e nas reações químicas. Dentre as possíveis interações químicas,

as mais comumente encontradas são a repulsão entre cargas, repulsão entre nuvens eletrônicas, repulsão estérica e a repulsão de elétrons desemparelhados (SOLOMONS, FRYHLE, 1999).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho o potencial farmacológico das estaurosporinas presentes no MicroMarin foi explorado, com toxicidade prevista *in silico* por metodologias que levantem parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade utilizando os *softwares* SwissADME e Protox-II. Apresentando alta toxicidade, modificações nas estruturas foram realizadas e aquelas que demonstraram melhorias em comparação a toxicidade das estaurosporinas protótipos foram consideradas como otimizadas. A técnica de atracamento molecular também foi aplicada e resultados para as moléculas antes e após a otimização foram comparados a fim de verificar a permanência do efeito *in silico*.

Os parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos levantados pelo *software* SwissADME preveem o comportamento do composto dentro do organismo, essas previsões são fundamentais para auxiliar na seleção de compostos com maior probabilidade de sucesso no desenvolvimento de medicamentos. Ao fornecer informações também sobre biodisponibilidade, o SwissADME ajuda a identificar candidatos promissores com boa absorção e disponibilidade sistêmica, além de auxiliar na otimização de moléculas para melhorar suas propriedades farmacocinéticas.

Os parâmetros analisados foram levados em consideração pelo *software* SwissADME para prever a solubilidade das moléculas estudadas. Prevendo sua capacidade de absorção no trato gastrointestinal e sua permeação a barreira hematoencefálica. Onde a primeira representa o processo pelo qual as substâncias são absorvidas do trato digestivo para a corrente sanguínea. A absorção gastrointestinal é um processo complexo e variável, e a compreensão de seus mecanismos e fatores influentes é importante para o desenvolvimento de medicamentos com eficácia adequada por via oral. Uma vez que a facilidade na via de administração do tratamento contribui para a adesão do paciente ao esquema terapêutico (BALKRISHNAN, 1998; KATZUNG; TREVOR, 2017).

E a segunda, permeação da barreira hematoencefálica, é essencial para a homeostase e proteção do sistema nervoso central, garantindo um ambiente adequado para o seu funcionamento. Dessa forma, fármacos capazes de penetrá-la são capazes de desencadear efeitos terapêuticos e colaterais no sistema nervoso central (BALLABH; BRAUN; NEDERGAARD, 2004). Portanto, o desenvolvimento de

estratégias de entrega de medicamentos que possam contornar ou atravessar a barreira hematoencefálica de forma seletiva é uma área ativa de pesquisa na busca por tratamentos de doenças cerebrais. Enquanto fármacos com alto potencial citotóxico não devem preferencialmente atravessá-la (KATZUNG; TREVOR, 2017).

A permeação à barreira hematoencefálica está intimamente relacionada à lipofilia do composto, representado nos resultados pelo TPSA. Compostos com alta polaridade, representada por um alto valor de TPSA, geralmente têm maior dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica. Isso ocorre porque a barreira hematoencefálica é altamente lipídica e hidrofóbica, o que torna mais difícil para substâncias polares atravessarem essa membrana (KATZUNG; TREVOR, 2017). Portanto, fármacos com baixa polaridade, baixa TPSA e características mais lipofílicas têm maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o sistema nervoso central em concentrações eficazes, representados na tabela de resultados como aqueles com valores de TPSA abaixo de 70 ($TPSA < 70$).

Dentre as estaurosporinas otimizadas com melhores resultados, apenas a N-metil-estaurosporina² foi predita como capaz de permear a barreira hematoencefálica, logo, os demais compostos possuem baixa ação no sistema nervoso, apesar de serem citotóxicos (característica desejada para fármacos no tratamento do câncer), não deverão ser capazes de permear o líquido cefalorraquidiano, sem ação nervosa central (KATZUNG; TREVOR, 2017).

Outro achado do estudo foi a correlação entre TPSA, propriedade físico-química já comentada anteriormente e relacionada com a permeação a barreira hematoencefálica, e o coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{o/w}$). Enquanto a primeira está relacionada de forma inversamente proporcional à permeação no sistema nervoso central, o segundo possui correlação direta, uma vez que representa a lipofilia dos compostos. Logo, compostos mais lipofílicos (maiores valores de $\log P_{o/w}$ e menores valores de TPSA) permeiam a barreira hematoencefálica mais facilmente, o que pode ser um risco para compostos altamente citotóxicos, como compostos com potencial anticanceroso, sendo uma característica a ser evitada (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2014).

Os substratos da glicoproteína P são geralmente compostos eficientemente bombeados para fora das células pela ação dessa proteína. A presença da glicoproteína P no sistema nervoso central desempenha um papel importante na proteção do cérebro contra a entrada de substâncias indesejáveis, inclusive diversos

tipos de fármacos, como antiarrítmicos, bloqueadores dos canais de cálcio, quimioterápicos, antirretrovirais, imunossupressores, entre outros (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

A glicoproteína P atua como uma bomba de efluxo, impedindo a acumulação excessiva de certos compostos ação (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001). Os dados referentes a atividade da P-gP mostraram que todas as moléculas, protótipos ou otimizadas, são alvos do seu efluxo, revelando uma proteção de órgãos do corpo contra as estaurosporinas, porém, fator que diminui sua biodisponibilidade, consequentemente diminuindo seu potencial de ação.

As regras de Lipinski visam garantir boa absorção pelo trato gastrointestinal, lipofilia, com compostos moderadamente lipofílicos sendo preferíveis, basicidade moderada, evitando compostos que sejam mal absorvidos e consideram a capacidade de compostos de formar pontes de hidrogênio e interações com receptores biológicos, capazes de apresentar eficácia e afinidade (LIPINSKI, 2004).

No entanto, é importante notar que as regras de Lipinski são apenas diretrizes gerais e não garantem a eficácia de um fármaco. Muitos compostos que não atendem a essas regras podem ainda ser desenvolvidos como fármacos bem-sucedidos. Portanto, as regras de Lipinski são apenas um ponto de partida e outros fatores, como mecanismo de ação, especificidade do alvo, toxicidade e eficácia terapêutica, também devem ser considerados durante o processo de desenvolvimento de fármacos. Visto que por via de regra produtos naturais tendem a não respeitar as regras de Lipinski e mesmo assim são utilizados na clínica (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Apesar de serem produtos naturais, as estaurosporinas respeitaram as regras de Lipinski apresentando características ideais para se tornarem fármacos.

As enzimas do CYP450 são um grupo de enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo de muitos medicamentos e substâncias químicas no organismo. Elas desempenham um papel importante na conversão dessas substâncias em formas mais facilmente elimináveis pelo corpo. No entanto, a alteração na atividade dessas enzimas pode resultar em alterações significativas na farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de outros medicamentos ou substâncias químicas (GUENGERICH, 2019).

A enzima CYP11B2, membro da superfamília CYP450, foi um dos alvos da busca por alvos realizada. Ela é uma das enzimas envolvidas na síntese de hormônios esteroides no organismo humano e é expressa principalmente nas glândulas adrenais,

especificamente nas células da zona glomerulosa (SCHIFFER et al., 2015). Sua indução ou inibição pode resultar na desregulação da aldosterona, inibidores da ECA (Enzima de Conversão da Angiotensina) são capazes de reduzir a atividade da CYP11B2, consequentemente reduzindo a produção de aldosterona, fator desejável no tratamento da hipertensão, pois ajuda a diminuir a retenção de sal e líquidos (BASSETT; WHITE; RAINEY, 2004).

Efeitos das estaurosporinas corroboram com os dados encontrados, como a inibição da biossíntese de aldosterona estudada por Bureik e colaboradores (2005), que também investigou a hipotensão causada pelo composto, relacionando com sua ação inibidora de quinases C e interação com a enzima da família da CYP. Para os demais alvos citados, as quinases SYK e seu homólogo ZAP-70, Garcia e Percival (2017) relatam inibição por um análogo da estaurosporina, a midostaurina (aprovado para uso clínico através do nome de Rydapt), com eficácia comprovada e utilizado na clínica como medicamento no tratamento da leucemia mieloide aguda.

Ao submeter um composto ao Protox-II, ele retorna previsões sobre a toxicidade do composto, fornecendo informações sobre sua potencialidade tóxica. Essas previsões são baseadas em modelos estatísticos e algoritmos que foram desenvolvidos e treinados com base em dados experimentais de toxicidade. Dentre os cálculos previstos a translação para dados experimentais esperada, também calculada pelas plataformas, em torno dos 60% de confiabilidade. Demonstrando uma capacidade de agilizar procedimentos de prospecção e desenvolvimento de fármacos, além de focar o uso de experimentos naqueles compostos que sejam esperados com resultados mais promissores a se tornarem fármacos utilizados na clínica (VICECONTI; DALL'ARA, 2019).

A imunotoxicidade apresentada pela estaurosporina é corroborada por dados da busca por alvo (a exemplo da tirosina quinase SYK, responsável pela função de células B imunes) e dados da literatura em que inibidores da quinase SYK, apresentam efeitos deletérios no sistema imune murino (WEISBERG et al., 2020).

Os compostos anticancerígenos são projetados para ter como alvo células cancerígenas e inibir seu crescimento ou induzir sua morte. Dessa forma, a citotoxicidade é desejável dentre as otimizações das estaurosporinas, contudo, a imunotoxicidade não é um bom achado, com os dois fatores sendo encontrados como atividade das estaurosporinas otimizadas (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001).

Para as otimizações das características farmacocinéticas e de toxicidade, os cinco melhores achados (estaurosporina2, hidróxiestaurosporina2, N-metil-estaurosporina2, N-metil-hidróxiestaurosporina2 e N-carboxamida-estaurosporina2) apresentaram toxicidades previstas relevantemente menores se comparados a seus compostos protótipos (diminuição de nível 2 a 4 para 5 a 6, com LD 50 prevista sendo alterada de 1000 mg/kg a 11mg/kg das estaurosporinas protótipos para 5000 mg/kg a 12800 mg/kg das estaurosporinas otimizadas). Foi recorrente a diminuição da toxicidade para os compostos que tiveram exclusão em apenas um dos dois anéis pirrólicos laterais fundidos, aumentando a relevância de estudos de estereoisomeria, não totalmente levados em consideração no estudo desenvolvido, uma vez que os SMILES utilizados não consideravam todos os isômeros das moléculas (SMILES canônicos) diferentemente de SMILES isoméricos, não fornecidos pelo *software* ChemDraw, utilizado no decorrer da pesquisa.

As estaurosporinas otimizadas também apresentaram um número menor de cadeias aromáticas pesadas quando correlacionadas com seus protótipos. Algumas cadeias aromáticas pesadas, como anéis policíclicos ou compostos aromáticos com substituintes volumosos, podem apresentar maior reatividade química, formando produtos metabólicos tóxicos ou interagindo com biomoléculas importantes no organismo. Além disso, esses compostos podem ser mais persistentes no ambiente ou no organismo, levando a um acúmulo ao longo do tempo (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2010).

Um exemplo bem conhecido é o caso das dioxinas e dos PCBs (bifenilas policloradas), que são compostos aromáticos pesados e persistentes. Eles são considerados altamente tóxicos devido à sua capacidade de se acumular nos tecidos e ao seu potencial de causar efeitos adversos à saúde, como distúrbios endócrinos, imunotoxicidade e carcinogenicidade (TAVAKOLY SANY et al., 2015).

Essas ferramentas são úteis para cientistas e pesquisadores que estão envolvidos no desenvolvimento de novos produtos químicos, pois permite identificar substâncias que possam apresentar potenciais efeitos adversos à saúde humana ou ao meio ambiente. Dessa forma, tanto o ProTox-II quanto o SwissADME auxiliam na triagem e seleção de compostos mais seguros, ajudando a reduzir a necessidade de testes experimentais extensivos, o tempo e os custos associados a essas análises.

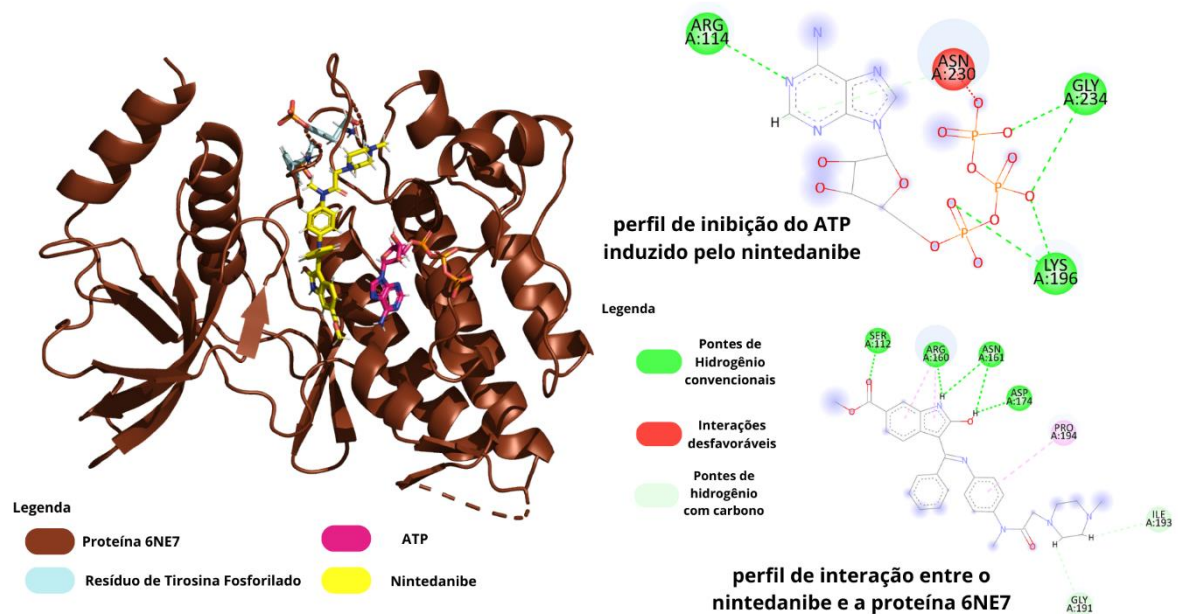
No entanto, é importante ressaltar que os servidores são ferramentas de previsão e, como tal, possuem limitações. Embora sejam ferramentas úteis na

avaliação preliminar de toxicidade, os resultados fornecidos devem ser interpretados com cautela e sempre corroborados com dados experimentais e outras informações relevantes, sobretudo para a LD50 prevista pelo Protox-II, pois a utilização de modelos computacionais pode auxiliar na triagem e seleção de compostos com menor potencial tóxico, mas estudos experimentais são necessários para a determinação precisa da LD50 e outras informações toxicológicas relevantes.

Aos ensaios de atracamento molecular, variações foram observadas com relação à interação proteína-ligante entre as moléculas antes e após a otimização. Na maioria dos casos, o número total de interações aumentou, apresentando um maior número de pontes de hidrogênio entre o receptor e as estaurosporinas otimizadas em relação as estaurosporinas protótipo, comentados anteriormente como fatores importantes da afinidade e eficácia de um fármaco com seu receptor alvo. O que pode ser indicativo de maiores efeitos adversos ou melhor seletividade, com ensaios *in vitro* mais elucidativos sendo necessários.

O medicamento de escolha para tratamento de pacientes com tumores com a mesma mutação da proteína alvo (G810A), é o nintedanibe. Medicamento aprovado para o tratamento de certas condições pulmonares, como fibrose pulmonar idiopática (FPI) e câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC), que atua inibindo múltiplas tirosina quinases. Interferindo nos processos de proliferação, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e fibrogênese (produção excessiva de tecido cicatricial), através da competição pelo sítio de ligação do ATP (LIU et al., 2018; TERZYAN et al., 2019). A Figura 22 demonstra o perfil molecular entre a interação proteína-ligante para a proteína 6NE7 e o nintedanibe e também seu perfil de inibição competitiva do sítio do ATP.

Figura 22 - Interações moleculares entre o nintedanibe e a proteína 6NE7, com perfil de inibição competitiva do ATP na proteína 6NE7 sob efeito do nintedanibe



Fonte: Autoria própria.

A inibição induzida pelo nintedanibe e já relatada na literatura por Liu e colaboradores (2018) e Terzyan e colaboradores (2019) demonstrou um padrão muito semelhante àquele apresentado pelas estaurosporinas.

Dentre os medicamentos inibidores de quinases na clínica, o imatinibe (Gleevec) e a midostaurina (Rydapt) já são bem consolidados em seus usos, com o primeiro sendo derivado de um produto natural marinho que é seletivo para a tirosina quinase BCR-ABL e utilizado na leucemia mieloide crônica e em alguns tumores do estroma gastrointestinal (STAGNO et al., 2016; ERIKSSON; JOENSUU, 2021). O segundo, um análogo da estaurosporina inibidor de multiquinases, inclusive das quinases FLT3 e KIT, que sob mutação desempenha a proliferação celular desordenada na leucemia mieloide aguda e mastocitose sistêmica avançada, sendo esses os principais usos da midostaurina (DÖHNER et al., 2022; PAPAYANNIDIS et al., 2022).

Dessa forma, com os dados apresentados, o potencial farmacológico da estaurosporina entra em foco, com a importância de um produto natural marinho retirado da biodiversidade brasileira que pode ser empregado na clínica do tratamento de doenças graves, como o câncer. Apesar de sua não seletividade, compartilhada

pelo seu análogo empregado na clínica (midostaurina), as otimizações apresentaram toxicidade reduzida em comparação com seus compostos protótipo.

Estaurosporinas otimizadas apresentaram menores valores de toxicidade prevista, maiores LD50 e características farmacocinéticas semelhantes a fármacos disponibilizados no mercado. Também apresentaram melhores interações com a tirosina quinase RET com mutação G810A, selecionada por busca de alvo. Indicando maior seletividade alvo direcionada mesmo se comparado com o fármaco de escolha no tratamento de doenças associadas a essa mutação (nintedanibe), fator importante na diminuição de efeitos adversos.

Não menos importante, a viabilidade de síntese dos compostos otimizados não foi levada em consideração. Sendo um dos principais gargalos para a prospecção de produtos naturais, a obtenção de forma sustentável de compostos sintéticos deverá ser levada em consideração para ensaios futuros, que também deverão utilizar abordagens que permitam o estudo de estereoisômeros, podendo ser um fator decisivo na toxicidade (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho conseguimos otimizar as moléculas estaurosporina, hidróxiestaurosporina, n-metil-estaurosporina, n-metil-hidróxiestaurosporina e carboxamida-estaurosporina do MicroMarin utilizando métodos *in silico* que concluíram com a observação de cinco moléculas otimizadas oriundas dos protótipos. Levantamentos de dados físico-químicos e de toxicidade das estaurosporinas foram analisados antes e após a otimização, com alteração da LD50 e toxicidades previstas de 11 a 1000 mg/kg para 5000 a 12800 mg/kg e 2 a 4 para 5 a 6, respectivamente variando entre compostos. Visualizações nas interações moleculares entre a tirosina quinase RET sob mutação G810A, selecionada por busca por alvo (*target fishing in silico*), tanto com estaurosporinas protótipos quanto com o nintedanibe, fármaco de escolha para tratamento de cânceres associados à mutação, mostraram permanência de atividade *in silico* e um total maior de pontes de hidrogênio, representando maior seletividade das moléculas, o que pode resultar em menores efeitos adversos sistêmicos.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Brazilian coast. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 28–28, jan. 2003.
- ALMEIDA, V. L. DE et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118–129, fev. 2005.
- ALONSO, M. et al. Understanding the fundamental role of π/π , σ/σ , and σ/π dispersion interactions in shaping carbon-based materials. **Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)**, v. 20, n. 17, p. 4931–4941, 22 abr. 2014.
- ALQAHTANI, S. *In silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2 nov. 2017.
- AMARAL, P. DE A. et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 351–363, dez. 2003.
- ANIGHORO, A.; BAJORATH, J.; RASTELLI, G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 7874–7887, 9 out. 2014.
- BALKRISHNAN, R. Predictors of medication adherence in the elderly. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 764–771, 1 jul. 1998.
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–13, jun. 2004.
- BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2 jul. 2018.

BARBOSA, M. L. D. C. Multifactorial Diseases and the Challenges in the Design of Multitarget Drugs: The Contribution of the Laboratory of Evaluation and Synthesis of Bioactive Substances - LASSBio®. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, 2015.

BASSETT, M. H.; WHITE, P. C.; RAINEY, W. E. The regulation of aldosterone synthase expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 217, n. 1–2, p. 67–74, mar. 2004.

BRUNO, A. et al. The In Silico Drug Discovery Toolbox: Applications in Lead Discovery and Optimization. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 21, p. 3838–3873, 2019.

BUREIK, M. et al. Inhibition of aldosterone biosynthesis by staurosporine. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 663–669, jul. 2005.

CHAI, A. B.; CALLAGHAN, R.; GELISSEN, I. C. Regulation of P-Glycoprotein in the Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14667, 24 nov. 2022.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, jun. 2017.

CHAUDHARI, R. et al. Computational polypharmacology: a new paradigm for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 3, p. 279–291, 4 mar. 2017.

CHEN, J.; MOORE, A.; RINGSHAUSEN, I. ZAP-70 Shapes the Immune Microenvironment in B Cell Malignancies. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 595832, 27 out. 2020.

CHEN, M. H.; KERKELÄ, R.; FORCE, T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. **Circulation**, v. 118, n. 1, p. 84–95, 1 jul. 2008.

CHENG, F. In Silico Oncology Drug Repositioning and Polypharmacology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1878, p. 243–261, 2019.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy research: PTR**, v. 35, n. 9, p. 4660–4702, set. 2021.

CORNALL, R. J. et al. Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1713–1718, 15 fev. 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Challenges in the design of multitarget drugs against multifactorial pathologies: a new life for medicinal chemistry? **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 5–7, jan. 2013.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 12, p. 3284–3301, 22 dez. 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357–W364, 2 jul. 2019.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 7, p. 1007–1017, 1 jul. 2001.

DELANEY, J. S. ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000–1005, 2004.

DÖHNER, H. et al. Midostaurin plus intensive chemotherapy for younger and older patients with AML and FLT3 internal tandem duplications. **Blood Advances**, v. 6, n. 18, p. 5345–5355, 27 set. 2022.

DRILON, A. et al. Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 151–167, mar. 2018.

DUTTA, J. et al. Carbon-Centered Hydrogen Bonds in Proteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 8, p. 1998–2008, 25 abr. 2022.

ERIKSSON, M.; JOENSUU, H. Adjuvant imatinib for GIST: duration likely matters. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 32, n. 4, p. 434–436, abr. 2021.

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

FLORÊNCIO, K. G. D. et al. **Chromomycin A5 induces bonafide immunogenic cell death in metastatic melanoma**. bioRxiv, , 20 set. 2021. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.18.460876v1>>. Acesso em: 19 jun. 2023

GALATI, S. et al. Recent Advances in In Silico Target Fishing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5124, 24 ago. 2021.

GARCIA, J. S.; PERCIVAL, M. E. Midostaurin for the treatment of adult patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia that is FLT3 mutation-positive. **Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 53, n. 10, p. 531–543, out. 2017.

GUEDES, I. A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 4 fev. 2021.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 5, p. 1671–1680, 1 fev. 2019.

GUIMARÃES, L. A. et al. Chromomycin A2 Induces Autophagy in Melanoma Cells. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 5839–5855, dez. 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HASTINGS, K. L. Immunotoxicology: A Brief History. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1803, p. 3–13, 2018.

HERSCHLAG, D.; PINNEY, M. M. Hydrogen Bonds: Simple after All? **Biochemistry**, v. 57, n. 24, p. 3338–3352, 19 jun. 2018.

HUANG, Q. et al. Preclinical Modeling of KIF5B-RET Fusion Lung Adenocarcinoma. **Molecular cancer therapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2521–2529, out. 2016.

HUBBARD, S. R.; TILL, J. H. Protein tyrosine kinase structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 373–398, 2000.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, p. 2148–2154, 2010.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, mar. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon, France: IARC, 2010. (**IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 92).

JALENCAS, X.; MESTRES, J. On the origins of drug polypharmacology. **MedChemComm**, v. 4, n. 1, p. 80–87, 20 dez. 2012.

KARUPPASAMY, R. et al. Current progress and future perspectives of polypharmacology: From the view of non-small cell lung cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 68, p. 84–91, jan. 2021.

KAUR, T. et al. Molecular Docking in Formulation and Development. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 16, n. 1, p. 30–39, 2019.

KLEIN, D. **Química orgânica: uma aprendizagem baseada em solução de problemas**. Tradução Oswaldo Esteves Barcia, Edilson Clemente da Silva, v. 1, 2017.

KONTOYIANNI, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1647, p. 255–266, 2017.

KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 2, p. 172–187, 14 jul. 2005.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, n. 7, p. 357–366, abr. 2001.

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

LIU, X. et al. Drug resistance profiles of mutations in the RET kinase domain. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 17, p. 3504–3515, set. 2018a.

LIU, Y. et al. ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 483, p. 82–88, ago. 2018b.

LOPES, N. R.; ABREU, M. T. C. L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 449–453, 2009.

MILOSLAVICH, P. et al. Marine Biodiversity in the Atlantic and Pacific Coasts of South America: Knowledge and Gaps. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e14631, 31 jan. 2011.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. Em: KUKOL, A. (Ed.). **Molecular Modeling of Proteins**. Methods Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 365–382.

MULLIGAN, L. M. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 3, p. 173–186, mar. 2014.

OMURA, S. et al. Staurosporine, a Potentially Important Gift from a Microorganism. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 7, p. 535–548, 1995.

ŌMURA, S.; ASAMI, Y.; CRUMP, A. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 688–701, ago. 2018.

PAPAYANNIDIS, C. et al. Treatment of Advanced Systemic Mastocytosis with Midostaurin: Practical Guidance for Optimal Therapy and Management. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. e2022073, 2022.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, jan. 2019.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. et al. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. Em: **In Silico Drug Design**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 19–44.

PROBST, D.; REYMOND, J.-L. A probabilistic molecular fingerprint for big data settings. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, p. 66, 18 dez. 2018.

RICCABONI, M.; BIANCHI, I.; PETRILLO, P. Spleen tyrosine kinases: biology, therapeutic targets and drugs. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 13–14, p. 517–530, jul. 2010.

SAARMA, M. GFL Neurotrophic Factors: Physiology and Pharmacology. Em: **Encyclopedia of Neuroscience**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 711–720.

SCHIFFER, L. et al. The CYP11B subfamily. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, p. 38–51, jul. 2015.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SILVA, J. Y. G. da. Prospecção in silico de moléculas identificadas em extratos citotóxicos contra células tumorais de bactérias marinhas da Amazônia Azul. 84 f. **Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2022.

SOLOMONS, TW Graham; FRYHLE, Craig B. Química orgânica. Limusa, 1999.

STAGNO, F. et al. Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia: frontline treatment and long-term outcomes. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 16, n. 3, p. 273–278, 2016.

STAGNO, F. et al. Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia: frontline treatment and long-term outcomes. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 16, n. 3, p. 273–278, 2016.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. Em: **Progress in Medicinal Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 60p. 273–343.

STEEGHS, N.; NORTIER, J. W. R.; GELDERBLUM, H. Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 2, p. 942–953, fev. 2007.

SUN, H. et al. Predictive models for estimating cytotoxicity on the basis of chemical structures. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 115422, 15 maio 2020.

TAKEDA, Y. et al. DNA Methylation of the Angiotensinogen Gene, AGT, and the Aldosterone Synthase Gene, CYP11B2 in Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4587, 27 abr. 2021.

TAVAKOLY SANY, S. B. et al. Dioxin risk assessment: mechanisms of action and possible toxicity in human health. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 24, p. 19434–19450, dez. 2015.

TERZYAN, S. S. et al. Structural basis of resistance of mutant RET protein-tyrosine kinase to its inhibitors nintedanib and vandetanib. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10428–10437, 5 jul. 2019.

TORRY, D. S.; COOPER, G. M. Proto-oncogenes in development and cancer. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 25, n. 3, p. 129–132, abr. 1991.

TRAXLER, P. et al. Design and synthesis of novel tyrosine kinase inhibitors using a pharmacophore model of the ATP-binding site of the EGF-R. **Journal De Pharmacie De Belgique**, v. 52, n. 2, p. 88–96, 1997.

VAN DEN ANKER, J. et al. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58 Suppl 10, p. S10–S25, out. 2018.

VICECONTI, M.; DALL'ARA, E. From bed to bench: How in silico medicine can help ageing research. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 177, p. 103–108, jan. 2019.

WEININGER, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 28, n. 1, p. 31–36, 1 fev. 1988.

WEISBERG, E. et al. The combination of FLT3 and SYK kinase inhibitors is toxic to leukaemia cells with CBL mutations. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 3, p. 2145–2156, fev. 2020.

WILKE, D. V. et al. Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Medica**, v. 87, n. 01/02, p. 49–70, fev. 2021.

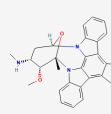
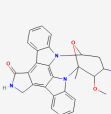
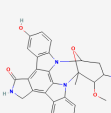
WILSON, M. C. et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, v. 506, n. 7486, p. 58–62, fev. 2014.

YAO, Z.-J. et al. TargetNet: a web service for predicting potential drug–target interaction profiling via multi-target SAR models. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 30, n. 5, p. 413–424, 1 maio 2016.

APÊNDICE B - Busca por alvo, Target fishing

Nome	Semi-gramática				Metadados	Semi-gramática				Metadados	Semi-gramática				Metadados	Semi-gramática				Metadados
	Atualizado	Atualizado	Atualizado	Atualizado		Atualizado	Atualizado	Atualizado	Atualizado		Atualizado	Atualizado	Atualizado	Atualizado		Atualizado	Atualizado	Atualizado	Atualizado	
Esturospina	Hidroxiesturospina	N-metil-esturospina	N-metil-hidroxiesturospina	
Carboximidaesturospina	Carboximidaesturospina	Carboximidaesturospina	Carboximidaesturospina	

APÊNDICE C - Estaurosporinas

Classe	Molécula	Nome no PubChem	Extraído de (extrato de referência no MicroMar)	SMILES	SMILES do PubChem	Imagem
Estaurosporina	Estaurosporina	Staurosporine	BRA-132, BRA-215, BRA-551	<chem>O=C1NC2=C(C3=C4C5=C(C=C4)CC=CC5)C(=O)C2(C)C1</chem>	<chem>CC12C(C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>	
	Hidróxiestaurosporina	7-Hydroxystaurosporine	BRA-132, BRA-215, BRA-551	<chem>O=C1NC2=C(C3=C4C5=C(C=C4)CC=CC5)C(=O)C2(C)C1</chem>	<chem>CC12C(C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>	
	N-metil-estaurosporina	SCHMBL454227	BRA-132, BRA-215, BRA-551	<chem>O=C1NC2=C(C3=C4C5=C(C=C4)CC=CC5)C(=O)C2(C)C1</chem>	<chem>CC12C(C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>	
	N-metil-hidróxiestaurosporina	4-(Dimethylamino)-7-hydroxy-3-methoxy-2-methyl-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	BRA-132, BRA-215, BRA-551	<chem>O=C1NC2=C(C3=C4C5=C(C=C4)CC=CC5)C(=O)C2(C)C1</chem>	<chem>CC12C(C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>	
	N-carboxamido-estaurosporina	1-(3-Methoxy-2-methyl-5-oxo-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one)-1-methylurea	BRA-132, BRA-215	<chem>O=C1NC2=C(C3=C4C5=C(C=C4)CC=CC5)C(=O)C2(C)C1</chem>	<chem>CC12C(C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>	
Estaurosporinas otimizadas	Estaurosporina 1	(6S)-7-methoxy-6-methyl-8-(methylamino)-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Estaurosporina 2	(10S)-9-methoxy-10-methyl-8-(methylamino)-1,2,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Estaurosporina 3/Hidroxiestaurosporina 3	14-methoxy-N,N'-trimesityl-12,13,14,15-tetrahydro-1H-16-oxo-10b,15a-diazol-11,15-methanodibenz[6,7]cyclonona[4,1]-as-indacen-13-amine	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Estaurosporina 4/N-metil-estaurosporina 4/N-carboxamido-estaurosporina 4	6,7,12,13-tetrahydro-9H-indolo[2,3-a]pyrrolo[5,4-c]carbazol-5-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Hidroxiestaurosporina 1	1-hydroxy-9-methoxy-10-methyl-8-(methylamino)-1,2,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Hidroxiestaurosporina 2	3-hydroxy-7-methoxy-6-methyl-8-(methylamino)-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	Hidroxiestaurosporina 4	7-hydroxy-6,7,12,13-tetrahydro-9H-indolo[2,3-a]pyrrolo[5,4-c]carbazol-5-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-estaurosporina 1	8-(dimethylamino)-7-methoxy-6-methyl-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-estaurosporina 2	8-(dimethylamino)-9-methoxy-10-methyl-1,2,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-estaurosporina 3	12-methoxy-N,N'-trimesityl-12,13,14,15-tetrahydro-1H-16-oxo-10b,15a-diazol-11,15-methanodibenz[6,7]cyclonona[4,1]-as-indacen-13-amine	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-hidroxiestaurosporina 1	8-(dimethylamino)-9-methoxy-10-methyl-1,2,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-hidroxiestaurosporina 2	8-(dimethylamino)-14-hydroxy-7-methoxy-6-methyl-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-9-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-hidroxiestaurosporina 3	15-(dimethylamino)-12-methoxy-11-methyl-12,13,14,15-tetrahydro-1H-16-oxo-10b,15a-diazol-11,15-methanodibenz[6,7]cyclonona[4,1]-as-indacen-13-amine	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-metil-hidroxiestaurosporina 4	3-hydroxy-6,7,12,13-tetrahydro-9H-indolo[2,3-a]pyrrolo[5,4-c]carbazol-5-one	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-carboxamido-estaurosporina 1	1-(7-methoxy-6-methyl-1-oxo-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-8-yl)-1-methylurea	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-carboxamido-estaurosporina 2	1-(9-methoxy-10-methyl-3-oxo-2,3,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-6,10-epoxy-1,4-diazaino[1,2,3-im]pyrrolo[5,4-c]carbazol-8-yl)-1-methylurea	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			
	N-carboxamido-estaurosporina 3	1-(12-methoxy-11-methyl-12,13,14,15-tetrahydro-1H-16-oxo-10b,15a-diazol-11,15-methanodibenz[6,7]cyclonona[4,1]-as-indacen-13-yl)-1-methylurea	<chem>CC12C(C(C)N)N3C4=CC=CC=C4C5=C6C(=C7C8=CC=CC(=C7)C3)C9=C6=O)N1C2=O</chem>			

APÊNDICE D - Atracamento Molecular no DockThor

Molécula		Receptor	Afinidade	Energia total	Molécula		Receptor	Afinidade	Energia total	Molécula		Receptor	Afinidade	Energia total
Estaurosporina	ATP	6 F E K	-7.071	-34.777	Hidróiestaurina	ATP	6 F E K	-7.071	-34.777	N-carboxamida-estaurosporina	ATP	6 F E K	-7.071	-34.777
	STU		-8.710	27.888		UCN		-7.825	17.935		CARBOX		-8.078	18.778
	STU2		-9.061	54.905		UCN2		-9.469	33.310		CARBOX2		-8.198	36.517
	STU1		-8.345	53.819		UCN1		-9.131	38.041		CARBOX3		-9.265	61.150
	ATP	6 N E 7	-7.493	-43.674		ATP	6 N E 7	-7.493	-43.674		ATP	6 N E 7	-7.493	-43.674
	STU		-8.438	33.846		UCN		-8.528	22.527		CARBOX		-8.079	22.540
	STU2		-8.907	55.886		UCN2		-8.115	42.070		CARBOX2		-7.731	39.389
	STU1		-9.061	54.905		UCN1		-8.949	42.783		CARBOX3		-8.973	64.635
Molécula		Receptor	Afinidade	Energia total	Molécula		Receptor	Afinidade	Energia total					
N-metil-estaurosporina	ATP	6 F E K	-7.071	-34.777	N-metil-hidróiestaurina	ATP	6 F E K	-7.071	-34.777					
	METSTU		-7.879	54.694		METUCN		-7.660	51.138					
	METSTU2		-8.151	47.262		METUCN2		-8.168	44.449					
	METSTU1		-8.256	46.547		METUCN3		-9.603	71.867					
	ATP	6 N E 7	-7.493	-43.674		ATP	6 N E 7	-7.493	-43.674					
	METSTU		-8.256	46.547		METUCN		-7.979	52.290					
	METSTU2		-7.731	52.329		METUCN2		-8.130	43.488					
	METSTU1		-8.151	47.262		METUCN3		-9.067	71.931					