

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento *in silico* de cumarinas como possíveis inibidores da Cinesina Eg5

JOÃO PEDRO SILVEIRA DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento *in silico* de cumarinas como possíveis inibidores da Cinesina Eg5

Dissertação apresentada por **João Pedro  
Silveira de Souza** para obtenção do GRAU  
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lucia Eifler-Lima

PORTO ALEGRE, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Rigon Zimmer  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabrício Figueiró  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilsane Lino Von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pablo Machado  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Silveira de Souza, João Pedro  
Planejamento in silico de cumarinas como possíveis  
inibidores da Cinesina Eg5 / João Pedro Silveira de  
Souza. -- 2021.  
85 f.  
Orientadora: Vera Lucia Eifler-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. Farmácia. 2. Química Medicinal. 3. Química  
Computacional. 4. Planejamento de fármacos. 5.  
Modelagem molecular. I. Eifler-Lima, Vera Lucia,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por mais esta oportunidade na minha vida.

À minha mãe Claudete e aos meus irmãos, Patrícia, Paula e Tiago que sempre me apoiaram e incentivaram a não desistir dos meus sonhos.

À professora Vera Lucia Eifler-Lima por aceitar este desafio comigo, compartilhar seus conhecimentos e contribuir com este trabalho.

Aos meus mestres Gustavo Neves e Luciano Kagami por dividirem suas experiências e conhecimentos em modelagem molecular comigo.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Adriano Spillere, Guilherme Arraché, Itamar Gonçalves, Leonardo Davi e Maristela Piedade pelas trocas de conhecimento, pelos momentos de descontração, pelos eventos e demais atividades em grupo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que acompanharam minha trajetória durante estes dois anos de trabalho e estudo.

À professora Gabriela Göethel e ao grupo do LaTOX pela parceria em testar as moléculas analisadas neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, professora Aline Rigon Zimmer, professor Fabrício Figueiró, professora Gilsane Von Poser e professor Pablo Machado, por disponibilizarem-se a avaliar e contribuir com suas correções e colocações para este trabalho.



## RESUMO

O câncer de pulmão é uma das maiores causas de morte no mundo, sendo responsável por aproximadamente 2,1 milhões de novos casos ao ano. No Brasil, é o quarto tipo de câncer mais comum entre homens e o quinto entre mulheres. A utilização de derivados de platina associado a outros quimioterápicos ainda é a principal escolha para o tratamento do câncer de pulmão, contudo o uso destes fármacos ocasiona efeitos adversos graves e pode apresentar diversos mecanismos de resistência. A cinesina Eg5 é uma enzima motor que se locomove utilizando os microtúbulos como trilhos, desempenhando papéis importantes nos processos celulares como: transporte intracelular, organização do citoesqueleto, transdução de sinal, mobilidade e divisão celular. A cinesina mitótica Eg5 é um possível alvo para tratamentos, pois sua inibição resulta na parada mitótica entre as fases G2/M do ciclo celular levando à apoptose. Sua inibição leva a uma seletividade sobre as células tumorais, consequentemente diminuindo os efeitos adversos e aumentando a eficácia de um antineoplásico promissor. Objetivando identificar novos inibidores da Eg5, foi realizada uma triagem virtual por *docking* molecular das cumarinas da quimioteca do LaSOM. Foram selecionadas cinco cumarinas pelo método *rank-by-rank* e foram analisadas suas propriedades físico-químicas e toxicológicas *in silico*. A partir destes resultados, o LaSOM 235 foi selecionado para continuar no estudo e ser testado *in vitro*. Adicionalmente duas outras cumarinas, LaSOM 229 e LaSOM 234, foram incluídas no estudo experimental. Foram realizados testes *in vitro* de viabilidade celular, estresse oxidativo e ensaio de potencial de membrana mitocondrial utilizando a linhagem de câncer de pulmão humano A549. Os resultados mostraram que o LaSOM 235 foi o que apresentou uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$  quando comparado ao grupo controle (100% da viabilidade celular), revelando ser a substância mais promissora entre as três avaliadas *in vitro*.

**Palavras-chave:** Cumarina. Câncer de pulmão. Cinesina Eg5. Triagem virtual. *In vitro*.





## ABSTRACT

Lung cancer is one of the biggest causes of death in the world, accounting for approximately 2.1 million new cases per year. In Brazil, it is the fourth most common type of cancer among men and the fifth among women. The use of platinum derivatives associated with other chemotherapeutics is still the main choice for the treatment of lung cancer, however the use of these drugs causes serious adverse effects and can present several resistance mechanisms. Kinesin Eg5 is a motor enzyme that moves using microtubules as rails, playing important roles in cellular processes such as: intracellular transport, cytoskeleton organization, signal transduction, mobility and cell division. Mitotic kinesin Eg5 is a possible target for treatments, as its inhibition results in mitotic arrest between the G2/M phases of the cell cycle leading to apoptosis. Its inhibition leads to selectivity on tumor cells, consequently reducing adverse effects and increasing the effectiveness of a promising antineoplastic agent. Aiming to identify new Eg5 inhibitors, a virtual screening by molecular *docking* of coumarins from the LaSOM chemo library was performed. Five coumarins were selected by the *rank-by-rank* method and their physicochemical and toxicological properties *in silico* were analyzed. From these results, LaSOM 235 was selected to continue the study and be tested *in vitro*. Additionally, two other coumarins, LaSOM 229 and LaSOM 234, were included in the experimental study. *In vitro* cell viability, oxidative stress and mitochondrial membrane potential assays were performed using the human lung cancer strain A549. The results showed that LaSOM 235 was the one that presented a decrease in cell viability at concentrations of 30, 40 and 50  $\mu\text{M}$  when compared to the control group (100% of cell viability), revealing to be the most promising substance among the three evaluated *in vitro*.

**Keywords:** Coumarin. Lung cancer. Kinesin Eg5. Virtual screening. *In vitro*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> TIPOS DE CÂNCER COM MAIOR INCIDÊNCIA DE MORTES POR PAÍS NO ANO DE 2020.....	19
<b>FIGURA 2.</b> ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DA CISPLATINA, CARBOPLATINA E DO ETOPOSIDO. .....	20
<b>FIGURA 3.</b> SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA TUBULINA E PRODUTOS NATURAIS REPRESENTATIVOS DE FÁRMACOS RELACIONADOS AOS MICROTÚBULOS. ....	21
<b>FIGURA 4.</b> ORGANIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES DE TUBULINA EM UM MICROTÚBULO. ....	21
<b>FIGURA 5.</b> ESTRUTURA DO MONASTROL. ....	22
<b>FIGURA 6.</b> ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO NO BRASIL.....	27
<b>FIGURA 7.</b> ANTITUMORAIS QUE AFETAM A POLIMERIZAÇÃO/DESPOLIMERIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS... ..	28
<b>FIGURA 8.</b> ESTÁGIOS DA MITOSE .....	29
<b>FIGURA 9.</b> FUSO NORMAL E FUSO MONOPOLAR .....	30
<b>FIGURA 10.</b> ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DO ISPINESIBE, ESTRUTURA QUÍMICA DA S-TRITIL L-CISTEINA (STLC) E DEMAIS INIBIDORES EM ESTUDOS CLÍNICOS . ....	32
<b>FIGURA 11.</b> COMPLEXO CRISTALOGRAFICO DO ISPINESIBE LIGADO AO SÍTIO ALOSTÉRICO DA CINESINA EG5 (PDB ID: 4AP0), MOSTRANDO OS 3 BOLSÕES HIDROFÓBICOS. B1 (LARANJA), B2 (VERMELHO) E B3 (PRETO). .....	33
<b>FIGURA 12.</b> ESTRUTURA GERAL DAS CUMARINAS.....	33
<b>FIGURA 13.</b> ESTRUTURA QUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO DAS CUMARINAS COM AÇÃO ANTITUMORAL. ....	34
<b>FIGURA 14.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO LASOM 77 E LASOM 78.....	35
<b>FIGURA 15.</b> ESQUELETO GERAL DAS CUMARINAS DO LASOM.....	44
<b>FIGURA 16.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO ISPINESIBE, LIGANTE UTILIZADO NO REDOCKING. ....	54
<b>FIGURA 17.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS UTILIZADAS NO CROSSDOCKING. ....	55
<b>FIGURA 18.</b> GRÁFICOS DA CURVA ROC PARA AS MELHORES FUNÇÕES INDIVIDUAIS E PARA O CONSENSO ENTRE ELAS.....	57
<b>FIGURA 19.</b> CUMARINAS SELECIONADAS NA TRIAGEM VIRTUAL E O LIGANTE CRISTALOGRAFICO DE REFERÊNCIA.....	57
<b>FIGURA 20.</b> PRINCIPAIS INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS: LASOM 198, LASOM 206, LASOM 235, LASOM 312 E LASOM 321 COM OS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO DA CINESINA EG5 (PDB: 4AP0).....	59
<b>FIGURA 21.</b> INTERAÇÕES REALIZADAS PELO ISPINESIBE COM A CINESINA EG5 (PDB: 4AP0).....	59
<b>FIGURA 22.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO LASOM 229, LASOM 234 E LASOM 235. ....	61
<b>FIGURA 23.</b> INTERAÇÕES OBSERVADAS PELO LASOM 229 E LASOM 234 COM A CINESINA EG5 (PDB: 4AP0) .....	61
<b>FIGURA 24.</b> DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO. ....	62
<b>FIGURA 25.</b> PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E NITROGÊNIO (ERNS) .....	63
<b>FIGURA 26.</b> A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	63



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> AVALIAÇÃO CLÍNICA DE INIBIDORES DA EG5 .....	32
<b>TABELA 2.</b> LIGANTES UTILIZADOS NA ETAPA DE CROSSDOCKING. ....	47
<b>TABELA 3.</b> PESO MOLECULAR DOS LIGANTES UTILIZADOS COMO BASE PARA O FILTRO MOLECULAR.....	54
<b>TABELA 4.</b> VALORES DE ESCORE E RMSD DO REDOCKING. ....	55
<b>TABELA 5.</b> VALORES DE ESCORE E RMSD DO <i>CROSS-DOCKING</i> .....	56
<b>TABELA 6.</b> MÉTRICAS DE ENRIQUECIMENTO. ....	56
<b>TABELA 7.</b> FATOR DE ENRIQUECIMENTO. ....	57
<b>TABELA 8.</b> RANQUEAMENTO DA TRIAGEM VIRTUAL PELAS FUNÇÕES DE ESCORE INDIVIDUAIS E PELO MÉTODO CONSENSUAL.....	58
<b>TABELA 9.</b> VALORES DE ESCORE CALCULADOS UTILIZANDO A FUNÇÃO X-SCORE PARA AS MELHORES POSES OBTIDAS PELOS PROGRAMAS GOLD E DOCK6. ....	58
<b>TABELA 10.</b> PRINCIPAIS INTERAÇÕES COM OS AMINOÁCIDOS DE REFERÊNCIA OBTIDAS NO DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. ....	58
<b>TABELA 11.</b> PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DRUGLIKENESS.....	60
<b>TABELA 12.</b> PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS. ....	60



## LISTA DE ABREVIATURAS

Å – Ângstrons

A549 - Linhagem celular de carcinoma de pulmão

ACHN - Linhagem celular de adenocarcinoma de rim

ADP - Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

AUC - Área sob a curva (Area Under the Curve)

BEDROC - Discriminação aprimorada do ROC por Boltzmann (Boltzmann-Enhanced discrimination of ROC)

Caco-2 - Linhagem celular de carcinoma de cólon

CCRF-CEM - Linhagem celular linfoblástica

DHPM – Diidropirimidinonas

DSV – Discovery Studio Visualizer

EF – Fator de Enriquecimento (Enrichment Factor)

HepG2 - Linhagem de células hepáticas

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

LaSOM - Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal

MCF-7 - Linhagem celular de câncer de mama

MMFF - Merck Molecular Force Field

MM/GBSA - Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area

MM/PBSA - Molecular mechanics/poisson Boltzmann Surface Area

PLP – Potencial Linear por Partes

RIE - Aprimoramento inicial robusto (Robust Initial Enhancement)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Desvio da raiz quadrática média (Root-Mean-Square Deviation)

ROC curve - curva característica de operação do receptor (Receiver Operating Characteristic curve)

SBDD - Planejamento de fármacos baseado na estrutura (Structure Based Drug Design)

VS – Virtual Screening (Triagem virtual)





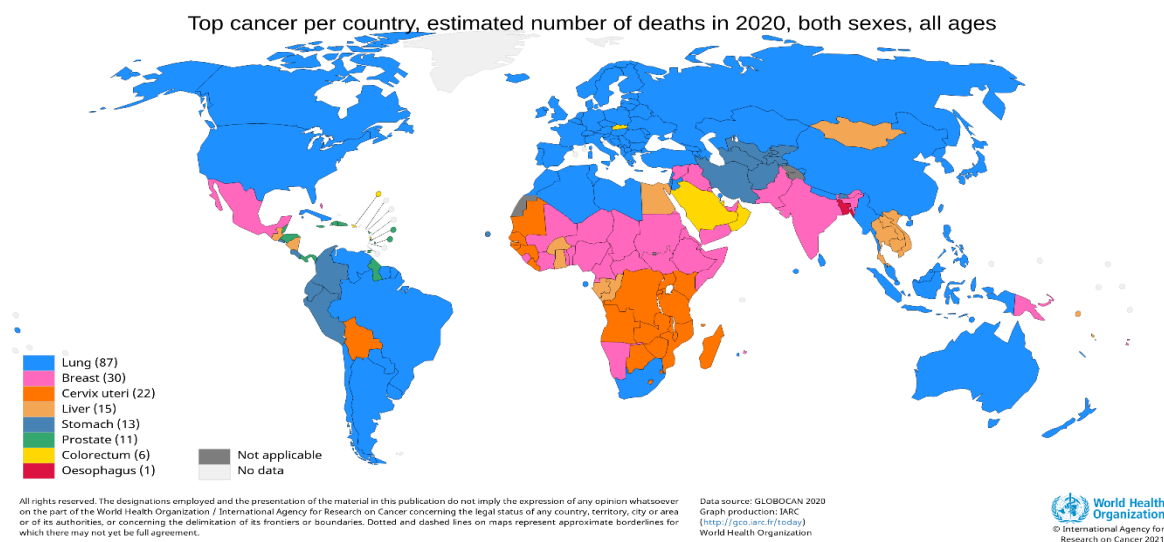
## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 CÂNCER DE PULMÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 SUPERFAMÍLIA DAS CINESINAS .....</b>	<b>28</b>
1.2.1 Cinesina Eg5 .....	29
<b>*Dados retirados do ClinicalTrials.gov.....</b>	<b>32</b>
1.2.2 Estrutura 3D da cinesina Eg5.....	32
<b>1.3. CUMARINAS .....</b>	<b>33</b>
1.3.1. Ação antitumoral das cumarinas .....	33
1.3.2. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa .....	34
<b>1.4 MODELAGEM MOLECULAR.....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Triagem virtual baseado na estrutura.....	35
1.4.2 Modelos tridimensionais para estudos <i>in silico</i> .....	36
1.4.3. <i>Docking</i> molecular.....	36
1.4.4. Programa GOLD .....	39
1.4.5. Programa DOCK6 .....	39
<b>1.5. AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. MODELAGEM MOLECULAR.....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Construção da quimioteca do LaSOM.....	44
3.1.1.1. Filtros moleculares .....	44
3.1.2. Validação da triagem virtual .....	44
3.1.2.1. <i>Redocking</i> .....	45
3.1.2.1.1. <i>Redocking</i> no programa GOLD 5.0 .....	45
3.1.2.1.2. <i>Redocking</i> no programa DOCK6.....	46
3.1.2.2 Cross-docking .....	46
3.1.2.3. Métricas de enriquecimento .....	47
3.1.3. Triagem virtual baseada em docking molecular .....	49
<b>3.2. AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3. AVALIAÇÃO DE ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> (célula A549)..</b>	<b>50</b>
3.3.1. Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> de três cumarinas.....	50

3.3.1.1 Reagentes .....	50
3.3.1.2 Cultura celular .....	51
3.3.1.3 Ensaio de citotoxicidade .....	51
3.3.1.3.1 Ensaio de redução do MTT .....	51
3.3.1.4 Avaliação de espécies reativas intracelulares .....	52
3.3.1.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ M) .....	52
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. MODELAGEM MOLECULAR .....</b>	<b>53</b>
4.1.1. Filtros moleculares .....	53
<b>4.1.2 VALIDAÇÃO DA TRIAGEM VIRTUAL .....</b>	<b>54</b>
4.1.2.1 Redocking .....	54
4.1.2.2 Cross-docking .....	55
4.1.2.3 Métricas de enriquecimento .....	56
4.1.3. Triagem virtual baseada em <i>docking</i> molecular .....	57
<b>4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>59</b>
4.2.1. Compostos adicionados aos ensaios <i>in vitro</i> e enzimático.....	60
<b>4.3. AVALIAÇÃO DE ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> (célula A549)..</b>	<b>61</b>
<b>5. CONCLUSÕES / PERSPECTIVAS .....</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

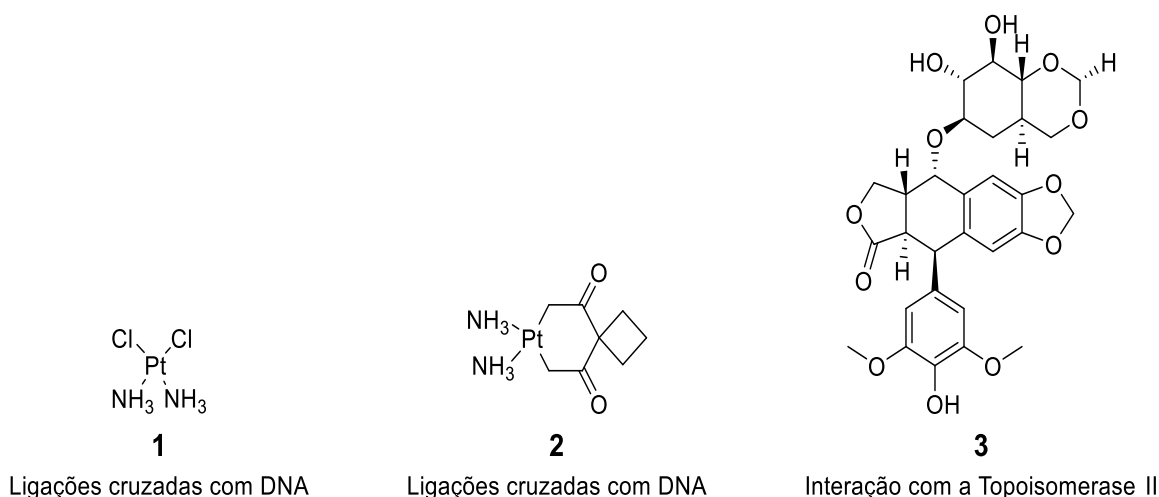
O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais letal (Figura 1) e o mais comum entre homens (1,4 milhões de casos) e o terceiro entre as mulheres (725.400 casos), sendo responsável por aproximadamente 2,1 milhões de casos de câncer de no mundo em 2018.[1] No Brasil, são estimados cerca de 625.370 novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), contabilizando 30.055 de novos casos de câncer de pulmão ao ano, sendo 17.726 homens e 12.329 mulheres, caracterizando o quarto tipo de câncer mais comum entre homens e o quinto entre mulheres no país.[2,3]



**Figura 1.** Tipos de câncer com maior incidência de mortes por país no ano de 2020.[1]

O risco de câncer de pulmão está, em grande proporção, relacionado diretamente ao hábito de fumar [4] e apresenta uma dose-resposta relacionada ao número de cigarros consumidos ao dia, grau de inalação (fumante passivo) e idade de início do hábito de fumar.[5,6] Em sinergia, a exposição ambiental e ocupacional pode aumentar os riscos de câncer de pulmão. São conhecidos como carcinógenos pulmonares: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), cristais de sílica, amianto, radônio e radiação ionizante.[7]

Os principais tipos de tratamento utilizados para o câncer de pulmão são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou uma combinação destes. No Brasil, o esquema terapêutico de escolha com quimioterápicos envolve a associação de cisplatina **(1)** ou carboplatina **(2)** com etoposido **(3)**(Figura 2).[8]



**Figura 2.** Estrutura química e mecanismo de ação da cisplatina (1), carboplatina (2) e do etoposido (3).

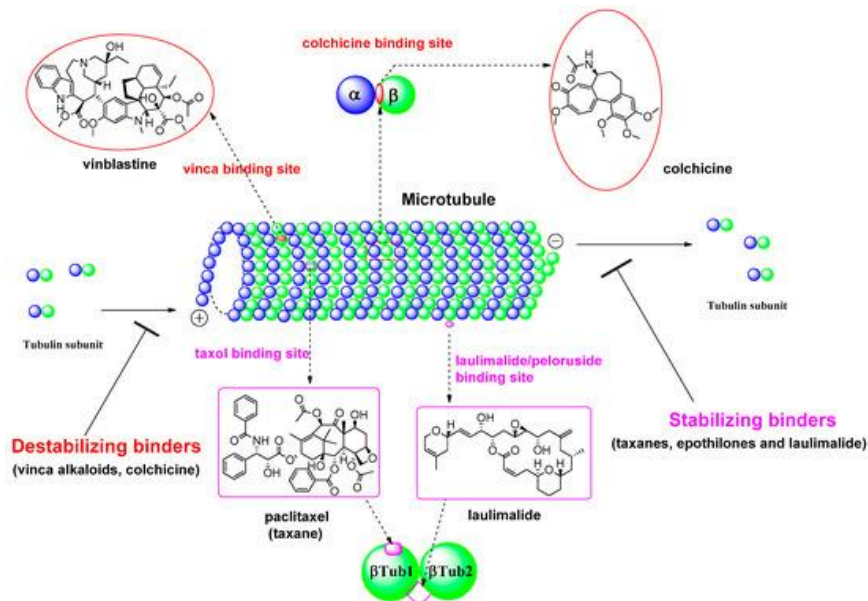
Esses fármacos podem causar efeitos adversos que incluem: toxicidade renal, náusea e vômito, atribuídos à cisplatina (1) e carboplatina (2)[9,10] e, mielossupressão, leucopenia e trombocitopenia, efeitos causados pelo etoposido (3).[11]

As terapias combinadas de compostos à base de platina têm sido altamente consideradas para superar a resistência destes fármacos frente ao tratamento do câncer, visto que a resposta celular que confere a resistência é multifatorial e ainda precisa ser mais bem compreendida. Os mecanismos de resistência propostos incluem alterações na captação celular e efluxo de cisplatina (1), aumento da biotransformação e destoxificação no fígado, aumento no reparo do DNA e mecanismos anti-apoptóticos.

A principal característica do câncer é o crescimento e a divisão descontrolada das células. Agentes químicos e biológicos que antagonizam essas características são utilizados no tratamento clínico do câncer. Dentre estes, estão os que atuam na tubulina, tais como os taxanos, que estabilizam os microtúbulos, e os alcalóides da vinca, que inibem a formação dos microtúbulos na metáfase do fuso mitótico (Figura 3).

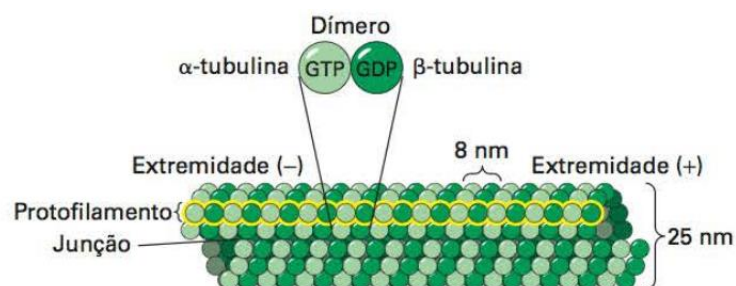
Os microtúbulos estão envolvidos em uma série de funções celulares, como divisão celular, motilidade celular, manutenção de organelas, vesículas sinápticas, formato celular e transporte intracelular. Como os microtúbulos são de suma importância no fuso mitótico, a interrupção da sua dinâmica impede a divisão celular, tanto em células saudáveis como em células tumorais.[12] Portanto, interromper

sua formação pode levar a efeitos adversos, como perda de cabelo, perda de peso corporal e neurotoxicidade.



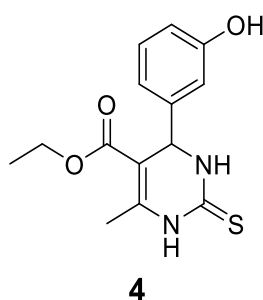
**Figura 3.** Sítios de ligação da tubulina e produtos naturais representativos de fármacos relacionados aos microtúbulos. [13]

Os microtúbulos são polímeros dinâmicos formados por  $\alpha,\beta$ -tubulina e são essenciais para a organização intracelular, transporte de organelas e segregação cromossômica (Figura 4).[14] Uma maneira de afetar a dinâmica dos microtúbulos é inibindo a cinesina Eg5. Essa proteína motora impede o movimento dos microtúbulos, regulando o alongamento do fuso na prófase, contribuindo para a separação dos centrossomas, dos quais o material genético se move para os polos da célula durante a metáfase. A inibição desta enzima dispõe um fenótipo característico denominado fuso monopolar, resultando a parada mitótica entre as fases G2/M do ciclo celular e conseqüentemente levando à apoptose.[15]



**Figura 4.** Organização das subunidades de tubulina em um microtúbulo. [16]

Diferente dos agentes antimitóticos tradicionais citados anteriormente (taxanos e alcalóides da vinca), os inibidores da Eg5 representam um alvo atraente devido ser superexpresso em células tumorais e pouco expresso em células saudáveis, resultando em menos efeitos adversos e maior eficácia.[17] A partir da identificação do monastrol (**4**) (Figura 5) como inibidor seletivo da cinesina Eg5 em 1999, foi possível evidenciar esta proteína como um possível alvo para o tratamento tumoral.[18] O monastrol (**4**) provoca uma inibição reversível no sítio alostérico da Eg5, causando uma mudança conformacional que impede a liberação de ADP (adenosina difosfato) e formando o complexo ADP-Eg5.[19]



**Figura 5.** Estrutura do monastrol.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa visa desenvolver compostos com atividade farmacológica através de reações verdes, com alta eficiência sintética e com menor impacto ambiental possível, sendo as cumarinas um dos principais heterociclos pesquisados e sintetizados no Laboratório de Síntese e Química Medicinal (LaSOM). A literatura explana que algumas cumarinas apresentam efeitos antitumorais, atuando na regulação da resposta imune, crescimento e diferenciação celular. [20]

Esta dissertação visa utilizar ferramentas *in silico* para triar as cumarinas da quimioteca do LaSOM frente à enzima cinesina Eg5 e avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos selecionados utilizando a linhagem celular derivada de câncer de pulmão humano (A549) com o intuito de identificar novas moléculas bioativas.

O conteúdo das páginas 23 a 74 foi suprimido em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico. Consta da fundamentação teórica, objetivos, materiais e métodos, resultados e conclusões referentes aos ensaios *in silico* e *in vitro*.





















































































































## 6. REFERÊNCIAS

1. BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A.. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p.394-424, **2018**.
2. BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019. 122 p.
3. FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D.. Cancer Estimates in Brazil Reveal Progress for the Most Lethal Malignancies. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 22, p. 1962-1966, **2020**.
4. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. World Health Organization. **Cancer Today**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>. Acesso em: 10 nov. 2020.
5. HECHT, S. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 14, p.1194-1210, **1999**.
6. TYCZYNSKI, J.; BRAY, F.; PARKIN, D. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. **The Lancet Oncology**, v. 4, n. 1, p.45-55, **2003**.
7. BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P.. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes & Control**, v. 8, n. 3, p. 444-472, **1997**.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 957, de 26 de Setembro de 2014. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Pulmão. Brasília (DF); Ministério da Saúde;
9. DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B.. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364-378, **2014**.
10. SOUSA, G. F.; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G.. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 693-701, **2014**.
11. MONTECUCCO A.; ZANETTA F.; BIAMONTI G.. Molecular mechanisms of etoposide. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 95-108, **2015**.
12. QI, C.; WANG, X.; SHEN, Z.; CHEN, S.; YU, H.; WILLIAMS, N.; WANG, G.. Anti-mitotic chemotherapeutics promote apoptosis through TL1A-activated death receptor 3 in cancer cells. **Cell Research**, v. 28, n. 5, p. 544-555, **2018**.

13. BANERJEE, S.; HWANG, D.; LI, W.; MILLER, D.. Current Advances of Tubulin Inhibitors in Nanoparticle Drug Delivery and Vascular Disruption/Angiogenesis. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1468, **2016**.
14. BROUHARD, G. J.; RICE, L. M.. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 7, p.451-463. **2018**.
15. DING, S.; ZHAO, Z.; SUN, D.; WU, F.; BI, D.; LU, J.; XING, N.; SUN, L.; WU, H.; DING, K.. Eg5 inhibitor, a novel potent targeted therapy, induces cell apoptosis in renal cell carcinoma. **Tumor Biology**, v. 35, n. 8, p.7659-7668, **2014**.
16. O ciclo celular dos eucariotos. In: LODISH, Harvey; BERK, Arnold; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; KRIEGER, Monty; PLOEGH, Hidde; AMON, Angelika; SCOTT, Matthew P.. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 875-926.
17. EL-NASSAN, H. B.. Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p.614-631, **2013**.
18. GOOD, J. A. D.; BERRETTA, G.; ANTHONY, N. G.. The Discovery and Development of Eg5 Inhibitors for the Clinic. In: KOZIELSKI, F. (ed.). **Kinesins and Cancer**. London: Springer Science, **2015**. p. 27-52.
19. RIVEIRO, M. E.; SHAYO, C.; MONCZOR, F.; FERNÁNDEZ, N.; BALDI, A.; DE KIMPE, N.; ROSSI, J.; DEBENEDETTI, S.; DAVIO, C.. Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxycoumarins from *Pterocaulon polystachyum*. **Cancer Letters**., 210, 179-188. **2004**
20. GONÇALVES, I. L.; ROCKENBACH, L.; NEVES, G. M.; GÖETHEL, G.; NASCIMENTO, F.; KAGAMI, L. P.; FIGUEIRÓ, F.; AZAMBUJA, G. O.; DIAS, A. F.; AMARO, A.. Effect of N-1 arylation of monastrol on kinesin Eg5 inhibition in glioma cell lines. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 995-1010, **2018**.
21. UEHARA, C.; JAMNIK, S.; SANTORO, I. L.. Câncer de pulmão. **Medicina**, v. 31, n. 2, p.266-276, **1998**.
22. RAJ, V.; BAJAJ, A.; ENTWISLE, J. J.. Implications of new (seventh) TNM classification of lung cancer on general radiologists - A pictorial review. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, v. 40, n. 2, p.85-93, **2011**.
23. FIDLER-BENAOUDIA, M. M.; TORRES, L. A.; BRAY, F.; FERLAY, J.; JEMAL, A.. Lung cancer incidence in young women vs. young men: A systematic analysis in 40 countries. **International Journal of Cancer**, p.1-10, **2020**.
24. TRAVIS, W. D.. Pathology of Lung Cancer. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p.669-692, **2011**.

25. BIERMAN, A. S.. Functional status. **Journal Of General Internal Medicine**, v. 16, n. 11, p.785-786, **2001**.
26. STERWART, B. W.; WILD, C. P. (ed.). **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2014. p. 351-362.
27. WISTUBA, I. I.; GAZDAR, A. F.. Lung cancer preneoplasia. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, n. 1, p.331-348, **2006**.
28. CHABNER, B. A.; BERTINO, J.; CLEARY, J.; ORTIZ, T.; LANE, A.; SUPKO, J. G. RYAN, D.. Agentes citotóxicos. In: BRUNTON, L. L; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012, p. 1677-1729.
29. TAYMAZ-NIKEREL, H.; KARABEKMEZ, M. E.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B.. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, **2018**.
30. CHABNER, B. A.. Princípios gerais da quimioterapia do câncer. In: BRUNTON, L. L; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012, p. 1667-1676.
31. JORDAN, A.; HADFIELD, J. A.; LAWRENCE, N .J.; MCGOWN, A. T.. Tubulin as a target for anticancer drugs: Agents which interact with the mitotic spindle. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, n. 4, p.259-296. **1998**.
32. RELLO-VARONA S.; VITALE I.; KEPP O.. Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5. **Cell Cycle**, v. 8, p.1030–1035, **2009**.
33. VERHEY, K. J.; WALCZAK, C.E.. The Kinesin Superfamily. In: KOZIELSKI, F.(ed.). **Kinesins and Cancer**. London: Springer Science, 2015. p. 12-26.
34. MIKI, H.; OKADA, Y.; HIROKAWA, N.. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 9, p.467-476, **2005**.
35. LU, M.; ZHU, H.; WANG, X.; ZHANG, D.; XIONG, L.; XU, L.; YOU, Y.. The prognostic role of Eg5 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Pathology**, v. 48, n. 3, p.214-218, **2016**.
36. LIU, L.; LIU, X.; MARE, M.; DUMONT, A. S.; ZHANG, H.; YAN, D.; XIONG, Z.. Overexpression of Eg5 correlates with high grade astrocytic neoplasm. **Journal of Neuro-oncology**, v. 126, n. 1, p.77-80, **2015**.
37. WISSING, M. D.; DE MORRÉE, E. S.; DEZENTJÉ, V. O.; BUIJS, J. T.; DE KRIJGER, R. R.; SMIT, V. T.; VAN WEERDEN, W. M.; GELDERBLUM, H.; VAN DER PLUIJM, G.. Nuclear Eg5 (kinesin spindle protein) expression predicts docetaxel response and prostate cancer aggressiveness. **Oncotarget**, v. 5, n. 17, p.7357-7367, **2014**.

38. SUN, L.; LU, J.; NIU, Z.; DING, K.; BI, D.; LIU, S.; LI, J.; WU, F.; ZHANG, H.; ZHAO, Z.; DING S.. A Potent Chemotherapeutic Strategy with Eg5 Inhibitor against Gemcitabine Resistant Bladder Cancer. **Plos One**, v. 10, n. 12, p.1-15, **2015**.
39. SAIJO, T.; ISHII, G.; OCHIAI, A.; YOH, K.; GOTO, K.; NAGAI, K.; KATO, H.; NISHIWAKI, Y.; SAIJO, N.. Eg5 expression is closely correlated with the response of advanced non-small cell lung cancer to antimitotic agents combined with platinum chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 54, n. 2, p.217-225, **2006**.
40. MAYER, T. U.. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science*, v. 286, n. 5441, p. 971-974, **1999**.
41. JOHNSON R.K.; MCCABE F.L.; CAULDER E.. SB-715992, a potent and selective inhibitor of the mitotic kinesin KSP, demonstrates broadspectrum activity in advanced murine tumors and human tumor xenografts. **Cancer Research**, v.43, **2002**.
42. ZHANG, B.; LIU, J. F.; XU, Y.; NG, S. C.. Crystal structure of HsEg5 in complex with clinical candidate CK0238273 provides insight into inhibitory mechanism, potency, and specificity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 4, p.565-570, **2008**.
43. LAD, L.; LUO, L.; CARSON, J. D.; WOOD, K. W.; HARTMAN, J. J.; COPELAND, R. A.; SAKOWICZ, R.. Mechanism of inhibition of human KSP by Ispinesib. **Biochemistry**, v. 47, n. 11, p.3576-3585, **2008**.
44. DEBONIS, S.; SKOUFIAS, D. A.; INDORATO, R. L.; LIGER, F.; MARQUET, B.; LAGNER, C.; JOSEPH, B.; KOZIELSKI, F.. Structure–activity relationship of s-trityl-l-cysteine analogues as inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p.1115-1125, **2008**.
45. MYERS, S. M.; COLLINS, I.. Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 463-489, **2016**.
46. GOOD, J. A. D.; WANG, F.; RATH, O.; KAN, H. Y. K.; TALAPATRA, S. K.; PODGÓRSKI, D.; MACKAY, S. P.; KOZIELSKI, F.. OptimizedS-Triyl-l-cysteine-Based Inhibitors of Kinesin Spindle Protein with Potent in Vivo Antitumor Activity in Lung Cancer Xenograft Models. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1878-1893, **2013**.
47. TALAPATRA, S. K.; SCHÜTTELKOPF, A. W.; KOZIELSKI, F.. The structure of the ternary Eg5–ADP–ispinesib complex. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 68, n. 10, p. 1311-1319, **2012**.
48. TORRES, F.C.; BRUCKER, N.; ANDRADE, S. F.; KAWANO, D. F.; GARCIA, S. C.; POSER, G. L.; EIFLER-LIMA, V. L.. New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 22, p.2600-2623, **2014**.

49. STEFANACHI, A.; LEONETTI, F.; PISANI, L.; CATTO, M.; CAROTTI, A.. Coumarin: a natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 250-283, **2018**.
50. VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B.. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-14, **2013**.
51. MURRAY, R. D. H.. Coumarins. **Natural Product Reports**, v. 6, n. 6, p.591-624, **1989**.
52. AL-MAJEDY, Y. K.; AL-DUHAIHAHAWI, D. L.; AL-AZAWI, K. F.; AL-AMIERY, A. A.; KADHUM, A. A.; MOHAMAD, A. B.. Coumarins as potential antioxidant agents complemented with suggested mechanisms and approved by molecular modeling studies. **Molecules**, v. 21, n. 2, p.135-146, **2016**.
53. KIRSCH, G.; ABDELWAHAB, A.; CHAIMBAULT, P.. Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 10, p.1322-1335. **2016**.
54. THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V.. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p.476-495, **2015**.
55. Hassan, M. Z.; Osman, H.; Ali, M. A.; Ahsan, M. J.. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p.236-255, **2016**.
56. SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V.; SMYTH, W.. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, p.421-426, **2009**.
57. SHI, Y.; ZHOU, C. H. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 21, 956-960. **2011**.
58. GONÇALVES, G. A.; CERECETTO, H.; VON POSER, G. L.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L.. Chagas Disease and Coumarins: A Review of Natural and Synthetic Coumarins As Anti-Trypanosoma Cruzi Agents. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, v. 21, **2021**.
59. GONÇALVES, G. A.; SPILLERE, A. R.; DAS NEVES, G. M.; KAGAMI, L. P.; VON POSER, G. L.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L.. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 203, p. 1-15, **2020**.
60. SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; DODDA, R. P.; KRISHNA, N. N.; AGARWAL, P.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K.. Coumarin–trioxane hybrids: Synthesis and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 12, p.3926-3930. **2012**.

61. KIM, E.; KWON, K.; SHIN, B.; SEO, E.; LEE, Y.; KIM, J.; PARK, J.; PARK, B.; RYU, D.. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor  $\kappa$ B and caspase-3. **Life Sciences**, v. 77, n. 7, p.824-836, **2005**.
62. CHU, C; TSAI, Y; WANG, C; LIN, W; TSENG, T. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 416, n. 1-2, p.25-32, **2001**.
63. WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R.. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 32, p.4236-4260, **2009**.
64. WEBER, U.S.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C.P. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxycoumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. **Research communications in molecular pathology and pharmacology's**, v.99, p.193-206, **1998**.
65. JUNG, J.; KIM, J.; PARK, O. Simple and cost effective syntheses of 4-hydroxycoumarin. **Synthetic Communications**, v. 29, n. 20, p.3587-3595, **1999**.
66. ATHANASELLIS, G.; MELAGRAKI, G.; CHATZIDAKIS, H.; AFANTITIS A.; DETSI, A.; IGGLESSI-MARKOPOULOU, O.; MARKOPOULOS, J. Novel short-step synthesis of functionalized  $\gamma$ -phenyl- $\beta$ -hydroxybutenoates and their cyclization to 4-hydroxycoumarins via the n-hydroxybenzotriazole methodology. **Synthesis**, v. 2004, n. 11, p.1775-1782, **2004**.
67. VIANNA, D. R.; BUBOLS, G.; MEIRELLES, G.; SILVA, B. V.; DA ROCHA, A.; LANZMASTER, M.; MONSERRAT, J. M. GARCIA, S.C.; VON POSER, G.; EIFLER-LIMA V. L.. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p.7260-7270, **2012**.
68. SOARES, F. G. N.; GÖETHEL, G.; KAGAMI, L. P.; NEVES, G. M.; SAUER, E.; BIRRIEL, E.; VARELA, J; GONÇALVES, I. L.; VON POSER, G.; GONZÁLEZ, M.; KAWANO, D. F.; PAULA, F. R.; MELO, E. B.; GARCIA, S. C.; CERECETTO, H.; EIFLER-LIMA, V. L.. Novel coumarins active against *Trypanosoma cruzi* and toxicity assessment using the animal model *Caenorhabditis elegans*. **Bmc Pharmacology And Toxicology**, v. 20, n. 1, p.1-13, **2019**.
69. VIANNA, D. R.; Ruschel, L.; Dietrich, F.; Figueiró, F.; Morrone, F. B.; Canto, R. F. S.; Corvello, F.; Velho, A.; Crestani, A.; Teixeira, H.; von Poser, G. L.; Battastini, A. M. O.; Eifler-Lima, V. L.. 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p.905-911, **2015**.
70. VIANNA, D. R.; HAMERSKI, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A.; VISENTIN, L.C.; PIRES, E.N.s.; TEIXEIRA, H.F.; SALBEGO, C.G.; EIFLER-LIMA, V.L.; BATTASTINI, A.M.O.. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell



lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 268-274, **2012**.

71. ALVES, A. C. S.; MUNHOZ, T.; SOARES, F. G. N.; ROCKENBACH, L.; GAUER, B.; KAWANO, D. F.; VON POSER, G. L.; GARCIA, S. C.; EIFLER-LIMA, V. L.. Synthesis and in vitro Evaluation of 1,2,3-triazole-4-chloromethylcoumarins with Antioxidant Activity. **Letters In Drug Design & Discovery**, v. 15, n. 7, p. 700-705, **2018**.

72. TORRES, F. C. Isolamento de cumarinas de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e síntese de 4-metilcumarinas. PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, 2014.

73. BIELSKA, E.; LUCAS, X.; CZERWONIEC, A.; KASPRZAK, J. M.; KAMINSKA, K. H.; BUJNICKI, J. M.. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. **Biotechnologia**, v. 3, p.249-264, **2011**.

74. MILLER, W. H.. Perspective: Quantum or classical coherence?. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 21, p.210901-210907, **2012**.

75. TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.631-639, **2004**.

76. STENTA, M. An introduction to quantum chemical methods applied to drug design. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, n. 1, p.1061-1078, **2009**.

77. DA SILVA ROCHA, S. F. L.; OLANDA, C. G.; FOKOUE, H. H.; SANT'ANNA, C. M. R.. Virtual screening techniques in drug discovery: review and recent applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 19, p.1751-1767, **2019**.

78. FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p.13384-13421, **2015**.

79. FERREIRA, R. S; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p.1770-1778, **2011**.

80. PICCIRILLO, E.; AMARAL, A.. BUSCA VIRTUAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS: conceitos e aplicações. **Química Nova**, p. 1-16, **2018**.

81. LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694-2718, **2016**.

82. SANT'ANNA, C. M. R.. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p.49-57, **2009**.

83. ANDERSON, A. C.. The process of structure-based drug design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p.787-797, **2003**.
84. BERMAN, H. M.. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p.235-242, **2000**.
85. KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J.. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p.935-949, **2004**.
86. RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P.. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-776, **2012**.
87. MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M.. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p.146-157, **2011**.
88. SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W.. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p.334-395, **2013**.
89. WARREN, G. L.; ANDREWS, C. W.; CAPELLI, A. M.; CLARKE, B.; LALONDE, J.; LAMBERT, M. H.; LINDVALL, M.; NEVINS, N. SEMUS, S. F.; SENGER, S.; TEDESCO, G.; WALL, I. D.; WOOLVEN, J. M.; PEISHOFF, C. E.; HEAD, M. S.. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p.5912-5931, **2006**.
90. KROEMER, R. T.. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein & Peptide Science**, v. 8, n. 4, p.312-328, **2007**.
91. PEACH, M. L; NICKLAUS, M. C. Combining docking with pharmacophore filtering for improved virtual screening. **Journal of Cheminformatics**, v. 1, n. 1, p.1-15, **2009**.
92. PAUL, N.; ROGNAN, D. ConsDock: A new program for the consensus analysis of protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47, n. 4, p.521-533, **2002**.
93. GENHEDEN, S.; RYDE, U.. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion On Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p.449-461, **2015**.
94. JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p.727-748, **1997**.
95. ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P.. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring

function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes.. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 11, n. 5, p.425-445, **1997**.

96. MOOIJ, W. T. M.; VERDONK, M.L.. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 2, p.272-287, **2005**.

97. KORB, O; STÜTZLE, T; EXNER, T.E.. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with plants. **Journal of Chemical Information And Modeling**, v. 49, n. 1, p.84-96, **2009**.

98. LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p.737-748, **2012**.

99. VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HRTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D.. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p.609-623, **2003**.

100. ALLEN, W.J.; BALIUS, T.E.; MUKHERJEE, S.; BROZELL, S. R.; MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; CASE, D. A.; KUNTZ, I. D.; RIZZO, R. C. DOCK 6: Impact of New Features and Current Docking Performance. **Journal of Computational Chemistry**. 36: 1132-1156, **2015**.

101. ALLEN, W.J.; BALIUS, T.E.; MUKHERJEE, S.; BROZELL, S. R.; MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; CASE, D. A.; KUNTZ, I. D.; RIZZO, R. C.. DOCK 6.9 Users Manual. **2018**.

102. RAIES, A. B.; BAJIC, V. B.. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Computational Molecular Science**, v. 6, n. 2, p.147-172, **2016**.

103. 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.1-13, **2017**.

104. ACD/ChemSketch. Versão 12.0. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, **2012**.

105. Discovery Studio Visualizer 4.0, Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego: *Dassault Systèmes*, **2013**.

106. HANWELL, M. D; CURTIS, D.; LONIE, D. C; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p.1-17, **2012**.

107. MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N.

H.; COUTINHO, K. (Org.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, **2007**. p. 489–531.

108. GANI, O. Signposts of docking and scoring in drug design. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 70, n. 4, p.360-365, **2007**.

109. PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E.. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p.1605-1612, **2004**.

110. CAROLI, A.; BALLANTE, F.; WICKERSHAM 3RD, R. B.; CORELLI, F.; RAGNO, R.. Hsp90 Inhibitors, Part 2: Combining ligand-based and structure-based approaches for virtual screening application. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.54, n 3, p. 970-977, **2014**.

111. KIRCHMAIR, J.; MARKT, P.; DISTINTO, S.; WOLBER, G.; LANGER, T.. Evaluation of performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection – What can we learn from earlier mistakes? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, n. 3, p. 213-228, **2008**.

112. TRUCHON, J-F.; BAYLY, C. I. Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the “Early Recognition” Problem. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 2, p. 488-508, **2007**.

113. WANG, L.; PANG, X.; LI, Y.; ZHANG, Z.; TAN, W.. RADER: a RApid DEcoy Retriever to facilitate decoy based assessment of virtual screening. **Bioinformatics**, p.1235-1237, **2016**.

114. EMPEREUR-MOT, C.; ZAGURY, J.; MONTES, M.. Screening Explorer—An Interactive Tool for the Analysis of Screening Results. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2281-2286, **2016**.

115. WANG, R.; WANG, S. How does Consensus Scoring Work for Virtual Library Screening? Na Idealized Computer Experiment. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 5, p. 1422-1426, **2001**.

116. WANG, R.; LAI, L.; WANG, S.. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal Of Computer-aided Molecular Design**, v. 16, n. 1, p.11-26, **2002**.

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

118. SANDER, T.; FREYSS, J.; VON KORFF, M.; RUFENER, C.. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, v. 55, n. 2, p.460-473, **2015**.

119. RAO, K. M.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D. L.; COHEN, H. J.; CURRIE, M. S.; WEINBERG, J. B.. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, p. 496–500, **1992**.
120. SMITH, J. A.; WEIDEMANN, M. J.. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v. 162, p. 261–268, **1993**.
121. SCADUO JR. R. C.; GROTYOHANN L. W.. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. **Biophysical Journal**, v. 76, p. 469–477, **1999**.
122. GOUD, N. S.; POOLADANDA, V.; MAHAMMAD, G. S.; JAKKULA, P.; GATREDDI, S.; QURESHI, I. A.; ALVALA, R.; GODUGU, C.; ALVALA, M.. Synthesis and biological evaluation of morpholines linked coumarin–triazole hybrids as anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 94, n. 5, p. 1919-1929, **2019**.
123. MUSA, M. A.; LATINWO, L. M.; VIRGILE, C.; BADISA, V. L. D.; GBADEBO, A. J.. Synthesis and in vitro evaluation of 3-(4-nitrophenyl)coumarin derivatives in tumor cell lines. *Bioorganic Chemistry*. **Bioorganic Chemistry**, v. 58, p. 96–103, **2015**.