

Revista Científica Eletrônica do Conselho Regional de Farmácia da Bahia

Bahia

ISSN: 2965-1514

http:\\rce.crf-ba.org.br

ARTIGO ORIGINAL

Identificação de novos candidatos a fármacos anticâncer inibidores da Proteína Quinase B através de métodos *in silico*

Identification of new potential anticancer drugs inhibiting Protein Kinase B by in silico methods

LARISSA OLIVEIRA DOURADO DI JUCELINO EVARISTO CARNEIRO NETO DE KALYANE COSTA SILVA DE MANOELITO COELHO DOS SANTOS JUNIOR FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE DE LA CONTROL DE LA

^{1,2,3,4}Departamento de Saúde, Laboratório de Modelagem Molecular (LMM), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

⁵Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Quimioinformática e Avaliação Biológica, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Histórico:

Recebido em 20/04/2024 Revisado em 29/07/2024 Aceito em: 02/10/2024 Publicado em 17/10/2024

Palavras-chave PKB, Câncer de mama,

Melosatina B, Inibidores

Keywords

PKB, Breast cancer, Melosatin B, Inhibitors Resumo. O câncer é um grave problema de Saúde Pública, devido a sua dimensão epidemiológica, econômica e social, sendo a segunda principal causa de mortes em todo o mundo. Dentre os tipos existentes, o câncer de mama apresenta-se como o tumor mais letal em mulheres no Brasil, o que torna seu controle, atualmente, um dos grandes desafios que a Saúde Pública enfrenta. Nesse cenário, a busca pela identificação de novos agentes anticâncer se faz urgente visando uma reversão do quadro e maior expectativa de vida para aqueles acometidos pela doença. A proteína quinase B alfa, também conhecida como PKB alfa, é uma enzima que atua como um ponto central na via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) - AKT frequentemente superestimulada em cânceres humanos. Este trabalho possui como objetivo detectar potenciais inibidores para PKB alfa por estratégias computacionais. Desse modo, selecionou-se 45 moléculas potenciais para o estudo, sendo igualmente distribuídas entre compostos provenientes de fontes naturais, busca aleatória e reposicionamento de fármacos através de uma triagem virtual hierárquica (análise de propriedades físico-químicas e acoplamento molecular). A investigação do grupo de moléculas selecionadas após aplicação de filtros físico-químicos, topológicos e predição de toxicidade apontaram a Melosatina B como molécula melhor qualificada no acoplamento molecular do programa AutoDock Vina e cálculo do índice de eficiência com posterior avaliação de interações intermoleculares de natureza hidrofóbica e ligações de hidrogênio analisada pelo servidor PLIP. Portanto, este estudo evidencia a eficácia das abordagens in silico na detecção de compostos promissores destinados ao tratamento do câncer, o que auxilia na investigação de novas terapias para esta doença de manifestação global.

Summary. Cancer is a serious Public Health problem, due to its epidemiological, economic and social dimensions, being the second leading cause of deaths worldwide. Among the existing types, breast cancer is the most lethal tumor in women in Brazil, which makes its control currently one of the greatest challenges facing Public Health. In this scenario, the search for the identification of new anti-cancer agents is urgent with a view to reversing the condition and increasing life expectancy for those affected by the disease. Protein kinase B alpha, also known as PKB alpha, is an enzyme that acts as a hub in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) - AKT signaling pathway frequently dysregulated in human cancers. This work aims to detect potential inhibitors for PKB alpha using computational strategies. In this way, 45 potential molecules were selected for the study, being equally distributed among compounds from natural sources, random search and repositioning of drugs through a hierarchical virtual screening. The investigation of the group of molecules selected after application of physicochemical, topological filters and toxicity prediction indicated Melosatin B as the best qualified molecule in the molecular coupling of the AutoDock Vina program and calculation of the efficiency index with subsequent evaluation of intermolecular interactions of a hydrophobic nature and hydrogen bonds analyzed by the PLIP server. Therefore, this study highlights the effectiveness of in silico approaches in detecting promising compounds intended for the treatment of cancer, marking a significant advance in the investigation of new therapies for this globally manifesting disease.

Introdução

O câncer é um grande grupo de doenças que podem começar em quase todos os órgãos ou tecidos do corpo quando células anormais crescem incontrolavelmente, ultrapassam os seus limites habituais para invadir partes adjacentes do corpo e/ou espalhar-se para outros órgãos¹. O tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo é o de mama (CM). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de incidência de câncer de mama para 2020 foram de 66.280 casos, o que representa 29,7% dos cânceres em mulheres. Para o sexo feminino, em 95% dos países, o CM é uma das principais causas de morte por câncer. No entanto, a sobrevivência é amplamente desigual entre os países: quase 80% das mortes por CM ocorrem em países em desenvolvimento².

A quimioterapia é o tratamento sistêmico habitual para CM que pode ser administrado de forma neoadjuvante ou adjuvante, sem perda de eficácia e com segurança, no caso de doença inicialmente operável. Os tratamentos preconizados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) são baseados na literatura científica e apresentam medicamentos antineoplásicos que costumam acompanhar uma série de efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, mielossupressão, alopecia, entre outros³. Para atenuar esses sintomas, uma estratégia amplamente utilizada consiste no planejamento de novos fármacos com foco na modulação de alvos moleculares importantes no desenvolvimento do câncer, além da adequação da melhor comodidade do paciente no tratamento. Sendo assim, nas últimas décadas, a oncologia atravessou intensas transformações, dentre elas, a incorporação de antineoplásicos administrados por via oral. A possibilidade de tratamento pelo uso oral reflete na melhoria da qualidade de vida dos doentes⁴.

Nesse contexto, a PKB (proteína quinase B, também conhecida como AKT) é uma serina/treonina quinase de grande interesse na oncologia devido à sua função crítica na regulação da proliferação, sobrevivência, metabolismo, metástase e invasão de células tumorais⁵. A desregulação da atividade da PKB, especialmente sua hiperativação, está intimamente associada ao desenvolvimento de vários cânceres humanos, com mutações oncogênicas de ativação identificadas e tem sido comprovadamente responsável pela resistência a diversas formas de tratamentos, incluindo terapias citotóxicas, anti-hormonais e direcionadas⁶. A busca por moléculas com ação frente à enzima PKB levou a uma ampla exploração de análogos de inibidores competitivos de pirrolopirimidina de ATP. Essa procura ocasionou na descoberta do AZD5363, aprovado em novembro de 2023 pela FDA como Capivasertib⁷. Este, por sua vez, após uso oral, mostrou redução da fosforilação de AKT e biomarcadores in vivo, além de inibição do crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto de Cm⁸.

Visando encontrar moléculas promissoras para o planejamento de candidatos a fármacos antitumorais disponíveis por via oral em um curto espaço de tempo, as técnicas computacionais, conhecidas como in silico, são amplamente utilizadas para aproveitar informações sobre estruturas de inibidores altamente eficazes e do alvo molecular. As metodologias de planejamento de fármacos assistidas por computador estão ganhando importância crescente na descoberta de novas terapêuticas, sendo fundamentais para a identificação econômica de candidatos promissores. Esses métodos apresentam como vantagens a redução do uso de modelos animais na pesquisa farmacológica, auxiliam no planejamento racional de novos medicamentos seguros e no reposicionamento de fármacos já comercializados9.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo utilizar estratégias computacionais para identificar moléculas promissoras frente a PKB por meio de construção de banco de inibidores e posterior acoplamento molecular, análise dos parâmetros físico-químicos e toxicológicos do melhor candidato a inibidor e interpretação do mapa de interações intermoleculares, contribuindo para a pesquisa e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antineoplásicos.

Materiais e Métodos

Para a busca por moléculas com potencial bioativo para o tratamento do CM foi empregada a triagem virtual hierárquica, utilizando estratégias baseadas em ligantes seguidas por triagem baseada no alvo molecular.

Construção do banco de moléculas

As moléculas a serem avaliadas foram selecionadas através de três métodos diferentes: reposicionamento de fármacos, busca em produtos naturais e triagem randômica.

Para o reposicionamento, 15 fármacos foram selecionados de forma aleatória com o critério de inclusão de que não foram previamente referenciadas, e/ou investigados para o tratamento do câncer¹0. Portanto, as seguintes moléculas foram eleitas: alprazolam, nitazoxanida, cloroquina, celecoxibe, diazepam, diclofenaco, indometacina, mefloquina, montelucaste, tafenoquina, propranolol, sildenafila, sulindaco, tolmetina e zolpidem.

A seleção dos produtos naturais foi executada no banco de produtos naturais COCONUT¹¹, elegendo 15 estruturas aleatórias correspondentes aos seguintes códigos: CNP0266139, CNP0274001, CNP0287732, CNP0220185, CNP0234240, CNP0075646, CNP0272606, CNP0304778, CNP0305075, CNP0363370, CNP0251015, CNP0114214, CNP0122175, CNP0208147, CNP0266149.

Por fim, 15 moléculas não relacionadas as duas bibliotecas anteriores que não possuíssem registro de

atividade biológica para a patologia de interesse foram selecionadas de forma aleatória para compor o último banco de moléculas (Material Suplementar - S1).

As 45 moléculas, advindas das três abordagens, foram desenhadas no formato 2D e convertidas para o formato 3D no programa MarvinSketch¹² e submetidas às etapas subsequentes da triagem virtual baseada em ligantes.

Determinação de descritores físico-químicos, topológicos e predição de toxicidade

Dentre uma gama de filtros moleculares existentes, a regra de Lipinski¹³ e de Veber¹⁴ somam parâmetros válidos e importantes na busca de estruturas biodisponíveis por via oral, junto ao Teste de Ames¹⁵ responsável pela predição de mutagenicidade. Logo, a combinação desses três filtros foi empregada para filtrar os compostos selecionados.

Para tal, aquelas moléculas com uma ou mais penalidades nos seguintes descritores físicos-químicos foram excluídos, a saber: Massa Molecular ≤ 500 Da; cLogP ≤ 5 ; Número de átomos aceptores de hidrogênio ≤ 10 ; Número de átomos doadores de hidrogênio ≤ 5 .

Número de ligações rotacionáveis ≤ 10; Área de Superfície Polar (PSA, do inglês Polar Surface Area) < 140 Ų; Número de Doadores e Aceptores de ligação de Hidrogênio < 12. A seguir, as moléculas remanescentes foram avaliadas quanto ao perfil de mutagenicidade, aquelas com resultado negativo no teste de AMES foram selecionadas para a etapa de acoplamento molecular. O cálculo de todos os parâmetros foi efetuado através do servidor pkCSM¹6.

Seleção de alvo biológico 3D

A busca pelo complexo cristalográfico da PKB alfa foi realizada no Protein Data Bank 17 (PDB) onde a seleção foi efetuada com base no método de determinação (difração de raio X), organismo de interesse (humano), resolução ($\leq 2,0$ Å) e a presença de ligante cristalográfico.

Preparo da proteína e realização de cálculos de acoplamento

Previamente aos cálculos de acoplamento, a estrutura da PKB alfa (PDB ID: 4GV1) foi preparada com auxílio do programa AutoDock Tools mediante as etapas de retirada de artefatos da cristalografia, moléculas de água, adição dos hidrogênios e cálculo da carga Gasteiger. Em seguida, definiu-se o espaço de busca (grid box) utilizando as coordenadas espaciais do ligante cristalográfico como referência. Dessa forma, foi construído um grid box centralizado no ligante cristalográfico, o inibidor AZD5363, com grid spacing = 1,0 Å, dimensões 20 x 20 x 20 Å e coordenadas x, y e z, respectivamente, -19,724, 4,599 e 11,591. O acoplamento molecular foi realizado no programa AutoDock Vina, os parâmetros do acoplamento molecular (tamanho e posicionamento da caixa) foram

avaliados através do cálculo da diferença da pose gerada pelo AutoDock Vina e pose cristalográfica, através da determinação do RMSD (valor do desvio médio quadrático), considerou-se satisfatório quando o RMSD foi inferior a 2Å¹⁸. As moléculas selecionadas nas etapas anteriores foram submetidas ao acoplamento molecular e classificadas por número de acordo com a função de pontuação do programa.

A eficiência de acoplamento molecular foi avaliada através do reacoplamento e da análise ROC através do SigmaPlot¹⁹ empregando um conjunto de seis moléculas inibidoras (ativas) frente a PKB na proporção 1:50 e falsas-positivas geradas no DUD-E, empregados para realizar a validação e delimitação da AUC (Área Sob a Curva).

Para auxiliar na seleção das moléculas, foi realizado um pós-processamento dos dados com o emprego do cálculo do índice de eficiência (IE) pela seguinte fórmula:

IE = EA/NAP

IE: Índice de Eficiência²⁰

EA: Energia de Afinidade calculada pelo AutoDock

Vina

NAP: Número de Átomos Pesados

O mapa de interações intermoleculares foi construído no servidor online PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler)²¹ e visualização 3D no programa Pymol²².

Resultados e discussão

O estudo das propriedades físico-químicas durante o planejamento de fármacos é uma etapa muito relevante para a predição da biodisponibilidade oral de moléculas promissoras²³. Com a aplicação dos filtros físico-químicos nas 30 moléculas selecionadas de produtos naturais e busca randômica, a triagem realizada pelos descritores de cada filtro contabilizou-se um total 9 moléculas aprovadas pelas regras de Lipinski e de Veber e pelo Teste de Ames. Esses compostos foram reunidos na tabela 1 com os respectivos valores dos descritores: 7 foram oriundas de produtos naturais e 2 de origem randômica (abreviada como RD na tabela).

Com o objetivo de garantir capacidade de visualização adequada da macromolécula em questão e verificando os critérios estabelecidos, a estrutura escolhida no PDB foi a de código de identificação 4GV1, com fator de resolução igual a 1,49 Å, método experimental difração de raio X e complexada com o candidato clínico AZD5363. O reacoplamento molecular foi empregado para avaliar a capacidade do programa de acoplamento em reproduzir a pose determinada na cristalografia. Os resultados apontaram, utilizando os parâmetros do grid box no AutoDock Vina, um RMSD = 0,49 Å (Figura 1) entre a pose do

Tabela 1. Resultado da aplicação dos filtros de Lipinski, Veber e Teste de Ames. Propriedades que foram penalizadas estão destacadas em vermelho.

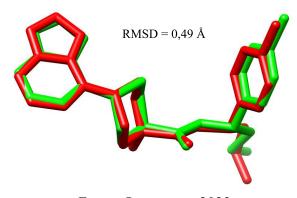
Moléculas	MM (Da)	xLogP	ALH	DLH	ASP (Å ²)	LR	ALH + DLH	AMES
CNP0266139	352,4	3,17	4	1	152,5	1	5	Não
CNP0274001	384,4	2,82	5	2	164,6	4	7	Não
CNP0220185	188,2	2,70	3	1	82,6	0	4	Não
CNP0075646	204,0	1,79	2	2	89,0	3	4	Não
CNP0272606	353,4	3,79	4	1	152,8	8	5	Não
CNP0304778	327,3	3,31	5	2	140,9	4	7	Não
CNP0363370	293,0	3,77	2	1	129,9	6	3	Não
RD1 ¹	180,0	1,19	3	3	74,3	2	6	Não
RD2 ²	164,1	1,49	2	2	69,5	2	4	Não

Legenda: MM = Massa Molecular, ALH = Aceptores de Ligação de Hidrogênio, DLH = Doadores de Ligação de Hidrogênio, ASP = Área de Superfície Polar, LR = Ligações Rotacionais, AMES = Potencial mutagênico.

Fonte: Os autores, 2023.

ligante cristalográfico e pose encontrada pelo programa de acoplamento molecular. Desta forma, os parâmetros foram considerados como adequados, pois quanto menor o RMSD mais próximos no espaço as duas moléculas se encontram. Além disso, de acordo com a literatura, um RMSD < 2 Å demonstra que a pose gerada pelo programa está próxima daquela determinada experimentalmente¹⁸.

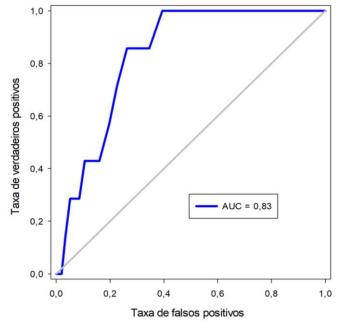
Figura 1. Resultado para a avaliação dos parâmetros do acoplamento molecular. Em vermelho: pose cristalográfica; em verde: pose gerada pelo AutoDock Vina.



Fonte: Os autores, 2023

Após a avaliação do acoplamento molecular, foi possível calcular a AUC chegando a um resultado de 0,83 comprovando a capacidade satisfatória do modelo em diferenciar as moléculas verdadeiro-positivas das falso-positivas.

Figura 2. Curva ROC obtida a partir de moléculas verdadeiras e falsas-positivas para Proteína Quinase B.



Fonte: Os autores, 2023

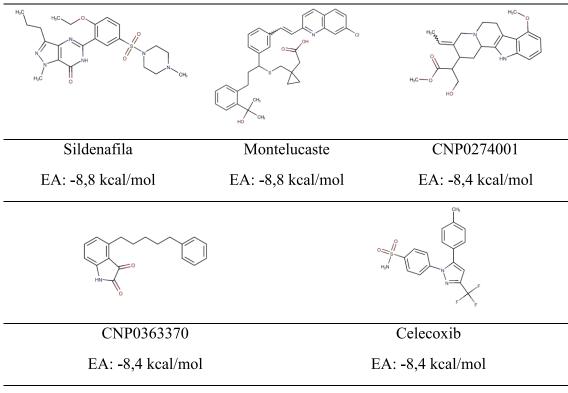
Em sequência, às nove moléculas selecionadas em adição aos 15 fármacos foram submetidas ao acoplamento molecular por meio do AutoDock Vina. Os resultados do acoplamento molecular para as 5 melhores moléculas estão descritos na tabela 2.

Com o objetivo de aumentar a robustez dos dados do acoplamento molecular, foi empregado o índice de eficiência

¹Ácido cafeico

²Ácido *p*-cumárico

Tabela 2. Resultados do acoplamento molecular das 5 melhores moléculas e seus respectivos valores de energia de afinidade (EA).



Fonte: Os autores, 2023

Este pode ser definido com uma medida molecular de comparação entre ligantes, podendo estar relacionada ao tamanho molecular (massa molecular, número de átomos pesados ou número de carbonos) ou área de superfície molecular. Desta forma, o índice de eficiência foi calculado pela razão entre a EA de cada molécula e o seu número de átomos pesados (IE = EA/AP, onde IE: índice de eficiência; EA: energia de afinidade; AP:

átomos pesados)²⁴. Analogamente, conforme a tabela 3, detectou-se pelo índice de eficiência da ligação que o produto natural de código CNP0363370, conhecido como a Melosatina B, identifica-se como a melhor molécula considerando os parâmetros relacionados. Assim, foi gerado o mapa de interações intermoleculares a fim de corroborar os achados no cálculo do índice eficiência de ligação.

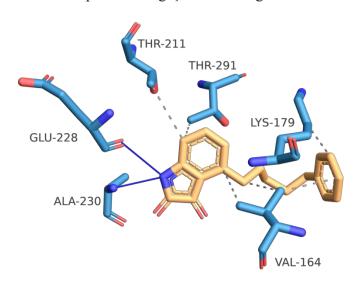
Tabela 3. Índice de eficiência entre o valor de energia de afinidade e massa molecular dos compostos melhor ranqueados

Molécula	Energia de afinidade (kcal/mol)	Átomos pesados	Índice de Eficiência
CNP0363370	-8,4	22	-0,381
Celecoxibe	-8,4	26	-0,323
CNP0274001	-8,4	28	-0,300
Sildenafila	-8,8	33	-0,266
Montelucaste	-8,8	41	-0,214

Fonte: Os autores, 2023

Através da observação das interações intermoleculares entre o sítio da PKB alfa e a Melosatina B, nota-se não apenas interações hidrofóbicas com resíduos Val164, Lis179, Tre211 e Tre219 como duas ligações de hidrogênio com os resíduos Glu228 e Ala230 (figura 3). O sítio ortostérico da proteína quinase B possui resíduos que facilitam o reconhecimento molecular através de interações hidrofóbicas, essa característica molecular está de acordo com os dados encontrados entre a Melosatina B e a enzima.

Figura 3. Interações intermoleculares entre a Melosatin B e os resíduos de aminoácidos do alvo proteína quinase B alfa. O ligante está representado em laranja e os resíduos de aminoácidos em azul. Traços cinzas correspondem às interações hidrofóbicas e linhas azuis correspondem a ligações de hidrogênio.



Fonte: PLIP, 2023.

A Melosatina B é um alcaloide isatina isolado da espécie Melochia tomentosa L. conhecida como candieiro, erva nativa da caatinga no nordeste brasileiro, da família Malvaceae e subfamília Sterculiaceae. A melosatina B é um alcaloide amarelo que apresenta a reação de cor verde azulada com o ácido sulfúrico, típica das isatinas²⁵. A síntese do alcaloide melosatina B perpassa quatro rotas sintéticas principais que foram exploradas: (1) A reação de Diels-Alder entre trans-1,3-butadieno-1-carbamato de benzila e 8-feniloct-2-inoato de etila; (2) rearranjos 3,3 e 2,3-sigmatrópicos do dioxindol; (3) Síntese de ácido oxindol-4-carboxílico a partir de 2-metil-3-nitrobenzaldeído e (4) a síntese do oxindol de Gassman²⁶.

Mediante ao exposto, é possível chegar à conclusão de que a Melosatina B, quando complexada com a PKB, apresenta interações mais energéticas em relação às demais moléculas analisadas. Com isso, torna-se necessário ressaltar que produtos de origem natural, como a Melosatina B, corrobora com o que trabalhos publicados, como os de Cragg e colaboradores²⁷, descrevem: 61% da análise de novos

fármacos aprovados pelo FDA e por entidades reguladoras de outros países, no período de 1983 a 1994²⁸, indicaram que os medicamentos recomendados para tratamento de doenças infecciosas e do câncer atingiram 520 novos, dos quais 61% dos antineoplásicos eram de origem natural²⁹.

Conclusão

No presente estudo, foi possível identificar, através de métodos de triagem in silico, moléculas com potencial de inibição frente à enzima PKB. Após o acoplamento molecular os cinco melhores compostos ranqueados que passaram pelos filtros físico-químicos, topológicos e toxicológicos, descobriu-se que 3 eram fármacos conhecidos e 2 se tratavam de produtos naturais.

A análise de interações intermoleculares após os estudos de acoplamento molecular mostrou interações de natureza hidrofóbica e ligações de hidrogênio entre o alvo e a Melosatina B, o produto natural de melhor índice de eficiência ilustrando ser o composto que possui uma melhor efetividade no delineamento das interações com a PKB.

Historicamente, a maioria dos novos medicamentos é derivada de produtos naturais, incluindo compostos derivados desses produtos, que, apesar de serem produzidos para benefício próprio, são reconhecidos como verdadeiras fontes de uma ampla gama de produtos químicos. O fato de a Melosatin B ter sido o melhor inibidor para a proteína quina B alfa, ratifica esse dado e fomenta a pesquisa de novos inibidores advindos de produtos naturais.

Além disso, também deve-se considerar a importância da possibilidade do reposicionamento como estratégia inicial para triagem, visto que 4 das 5 moléculas mais promissoras dentro do universo das 45 escolhidas inicialmente se tratam de fármacos já aprovados no mercado, que possuem um relativo nível de segurança e praticidade.

Declaração de conflito de interesse: Os autores não declaram conflitos de interesse relevantes ou relações financeiras.

Participação dos autores: Os autores contribuíram de maneira igualitária na elaboração do manuscrito.

Agradecimentos: À Universidade Estadual de Feira de Santana pelo suporte na pesquisa.

Referências

- 1. Organização Mundial da Saúde. "Cancer." WHO, 3 de fevereiro de 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 10 jun. 2024.
- 2. Organização Mundial da Saúde. "WHO Launches New Roadmap on Breast Cancer." WHO, 3 de fevereiro de 2023.

- 3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: câncer de mama. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- 4. Mignani, S., Rodrigues, J., Tomas, H., Jalal, R., Singh, P. P., Majoral, J. P.; Vishwakarma, R. A.; Drug Discovery Today 2018, 23, 605.
- 5. Almeida, V. L. de . et al (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Química Nova, 28(1), 118–129. Doi: 10.1590/S0100-40422005000100021.
- 6. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-capivasertib fulvestrant-breast-cancer.
- 7. Primavera, E. et al. Computer-Aided Identification of Kinase-Targeted Small Molecules for Cancer: A Review on AKT Protein. Pharmaceuticals 2023, 16 (7), 993. Doi: 10.3390/ph16070993.
- 8. Stephens L. et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. Science. 1998 J a n 3 0; 2 7 9 (5 3 5 1): 7 1 0 4. D o i: 10.1126/science.279.5351.710. PMID: 9445477.
- 9. Brogi S, Ramalho TC, Kuca K, Medina-Franco JL e Valko M (2020) Editorial: Métodos in silico para design e descoberta de medicamentos. Frente. Química. 8:612. doi: 10.3389/fchem.2020.00612.
- 10. Addie M. et al. Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. J Med Chem. 2013 Mar 14;56(5):2059-73. Doi: 10.1021/jm301762v. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23394218.
- 11. Sorokina, M., et al. (2021). COCONUT online: coleção de banco de dados aberto de produtos naturais. Journal of Cheminformatics, 13 (1), 1-13.
- 12. HEMAXON. Marvin Sketch version 12.6.6: ChemAxon, 2013.
- 13. Lipinski, Christopher A. et al. 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.
- 14. Veber, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. Journal of medicinal chemistry, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

- 15. Wichard, J. D. (2017). In silico prediction of genotoxicity. Food and Chemical Toxicology, 106, 595–599.
- 16. Merlitz, H. B.; Burghardt, B.; Wenzel, W.; Nanotechnology 2003, 1, 44.
- 17. Pires, D. E., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. Journal of medicinal chemistry, 58(9), 4066-4072.
- 18. Protein Data Bank (1971) Nature New Biology 233:223.
- 19. Batista V. S. et al. Construção, Otimização e Ancoragem Molecular De Substâncias Bioativas Em Biomacromoléculas: Um Tutorial Prático. Quím Nov. 2021 Jan 1; DOI: 10.21577/0100-4042.20170821.
- 20. SigmaPlot Trial Version 15.0 (2023) Systat Software, Inc., San Jose, California.
- 21. Hopkins AL, Groom CR, Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. Drug Disc. Today. 2004 May 1 [cited 2023 Dec 15];9(10):430–1. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03069-7.
- 22. Adasme et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. NAR 2021.
- 23. The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.PLoS One. 2011;6(8):e21931. doi: 10.1371/journal.pone.0021931. Epub 2011 Aug 16.
- 24. Patrick, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford University Press Inc., New York, 4th ed., 2009.
- 25. Da Silva Acácio, Regina, et al. "Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de Melochia tomentosa Linaeus (1735)." Diversitas Journal 3.2 (2018):412-428.
- 26. Deshpande, Rajendra Prabhakar. Part I. Approaches to the total synthesys of Melosatin B. Part II. Approaches to the total synthesis of a benzene analogue of Sesbanine (1987): 0205-0205.
- 27. Cragg, G. M. et. al, Journal of Natural Products, 1997, 60, 52; Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader, K. M.; Journal of Natural Products, 2003, 66, 1022.
- 28. Maciel, M. A. M. et al. Química Nova, 2002, 25, 429.
- 29. El-Sayed, M., Verpoorte, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochem Rev 6, 277–305 (2007).

Material Suplementar-S1: Banco de moléculas randômicas