

## Estudo computacional do potencial anticancerígeno de cafeatos monoterpênicos

### Computational study of the anticancer potential of monoterpene caffeates

#### RESUMO

**Mayara Fernanda Strada**  
[mayarastrada@gmail.com](mailto:mayarastrada@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Bruno Pereira Gabriel**  
[bgabriel@alunos.utfpr.edu.br](mailto:bgabriel@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Adriano Lopes Romero**  
[alromero\\_dqi@hotmail.com](mailto:alromero_dqi@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Rafaele Bonzanini Romero**  
[rafaelle.quimica@gmail.com](mailto:rafaelle.quimica@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Tendo em vista as propriedades bioativas do ácido cafeico e também, o potencial terapêutico dos álcoois monoterpênicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de ferramentas computacionais (estudos *in silico*) as propriedades farmacológicas de dez cafeatos monoterpênicos idealizados. As ferramentas computacionais utilizadas foram: *ChemSketch*, *Molinspiration*, *admetSar*, *Swiss Target Prediction*, *iGEMDOCK* e UCSF Chimera. A partir dos dados de ancoragem molecular observou-se que os compostos **14** (híbrido do ácido cafeico com o mirtenol) e **19** (híbrido do ácido cafeico com o citrônolol) ancoraram-se no sítio ativo da enzima 17-beta-desidrogenase 2, ademais ambos cafeatos apresentaram propriedades farmacocinéticas adequadas para candidatos à fármacos. Os resultados ora apresentados indicam a necessidade de novos estudos que visam contribuir para o desenvolvimento de fármacos inibidores da enzima 17-beta-desidrogenase 2, associada ao crescimento de tumores na mama.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estudos *in silico*. Híbridos do ácido cafeico. Câncer de mama.

#### ABSTRACT

In view of the bioactive properties of caffeic acid and also the therapeutic potential of monoterpene alcohols, the objective of this work was to evaluate, using computational tools (*in silico* studies), the pharmacological properties of ten idealized monoterpene caffeates. The computational tools used were: *ChemSketch*, *Molinspiration*, *admetSar*, *Swiss Target Prediction*, *iGEMDOCK* and UCSF Chimera. From the molecular docking, it was observed that compounds **14** (caffeic acid - mirtenol hybrid) and **19** (caffeic acid - citrônolol hybrid) anchored in the active site of the 17-beta-dehydrogenase 2 enzyme, in addition both caffeates showed adequate pharmacokinetic properties for drug candidates. The results presented here indicate the need for further studies that aim to contribute to the development of drugs that inhibit the enzyme 17-beta-dehydrogenase 2, associated with the growth of tumors in the breast.

**KEYWORDS:** *In silico* studies. Hybrids of caffeic acid. Breast cancer.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres de todo o mundo (BRAY et al., 2018). Apenas no Brasil, em 2017, ocorreram 16.724 mortes por câncer de mama feminino (INCA, 2020). O INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, a partir da integração de informações de 321 registros hospitalares de câncer e uma série histórica de 38 anos de informações sobre mortalidade, realizou, em 2019, uma estimativa acerca da incidência de câncer no Brasil para os anos de 2020 a 2022, desse modo, estima-se que haverá 66.280 novos casos de câncer de mama no Brasil (INCA, 2020). Essa estimativa foi realizada com o intuito de estimular profissionais da área da saúde e áreas afins a refletirem sobre esses resultados estimados, a fim de enfrentar os desafios do câncer de mama para que haja o desenvolvimento de ações eficazes para solucionar esse problema de saúde pública.

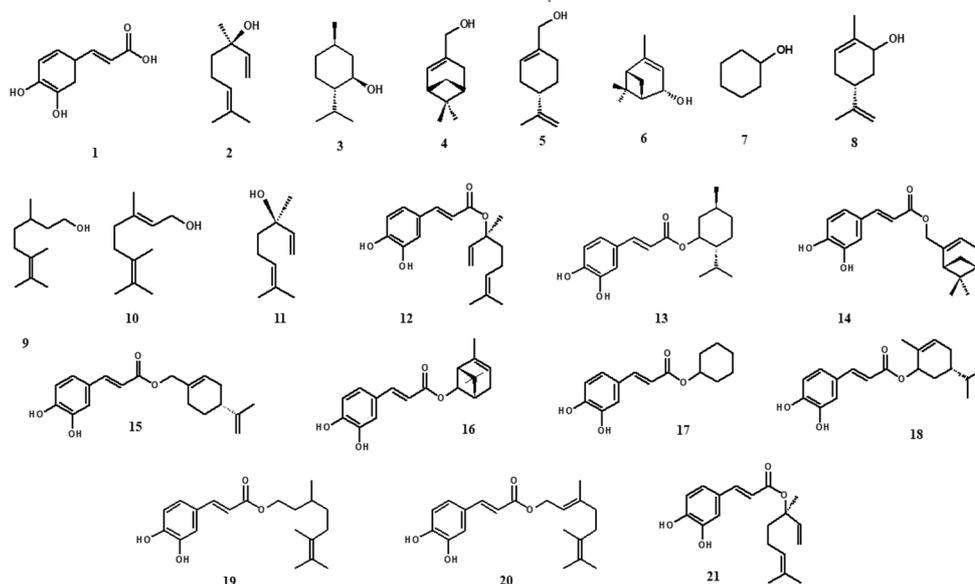
O câncer de mama é causado pela multiplicação anormal de células da mama, e é por meio dessa multiplicação anormal de células que os tumores são formados. Alguns fatores aumentam o risco de câncer de mama e eles podem ser divididos em fatores ambientais e comportamentais, como obesidade e sobrepeso após a menopausa, sedentarismo e inatividade física, consumo de bebidas alcoólicas, e exposição frequente a radiações ionizantes como Raios-X; fatores acerca da história reprodutiva e hormonal, como primeira menstruação antes de 12 anos, não ter tido filhos, primeira gravidez após os 30 anos, menopausa após os 55 anos, uso de contraceptivos hormonais, ter feito reposição hormonal pós-menopausa principalmente por mais de cinco anos; e fatores genéticos e hereditários, como histórico familiar de câncer de ovário, casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos, histórico familiar de câncer de mama em homens e alteração genética (INCA, 2020).

A quimioterapia e a radioterapia são utilizadas para o tratamento do câncer de mama, entretanto a utilização de ambos é agressiva visto que os medicamentos e a radiação utilizados não são seletivos, isto é, eliminam também células não cancerígenas. Nesse contexto, buscando contribuir para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos que sejam mais seletivos e que possuam menores reações adversas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar por meio do uso de ferramentas computacionais (estudos *in silico*) o potencial farmacológico de dez cafeatos monoterpênicos idealizados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os cafeatos monoterpênicos **12-21** estudados no presente trabalho foram idealizados a partir da reação de esterificação entre o ácido cafeico (**1**) e dez álcoois monoterpênicos: (+) linalol (**2**), mentol (**3**), mirtenol (**4**), álcool perílico (**5**), verbenol (**6**), cicloexanol (**7**), carveol (**8**), citronelol (**9**), geraniol (**10**) e (-) linalol (**11**) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura molecular do ácido cafeico, dos álcoois monoterpênicos e dos cafeatos monoterpênicos.



Fonte: Autoria própria.

No presente trabalho utilizou-se seis ferramentas computacionais:

(I) *ChemSketch*: utilizada para desenho estrutural, gerar códigos *smiles*, e determinar a estrutura tridimensional dos compostos.

(II) *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) utilizada para avaliar propriedades moleculares associadas à biodisponibilidade oral, cuja probabilidade de ocorrência é indicada pela regra dos cinco de Lipinski a partir da avaliação de cinco parâmetros: a) Coeficiente de partição octanol-água (LogP) que deve ser menor ou igual a 5; b) MM (massa molar) que deve ser menor ou igual a 500 g/mol; c) TPSA (área de superfície topológica polar) menor ou igual a 140 Å<sup>2</sup>; d) nALH (número de grupos receptores de ligação de hidrogênio) menor ou igual a 10; e) nDLH (número de grupos doadores de ligação de hidrogênio) menor ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001). Além disso, avaliou-se a potencialidade das substâncias 1-21 atuarem como ligante GPCR, modulador de canal iônico, inibidor de quinase, ligante de receptor nuclear, inibidor de protease e inibidor de enzima. O método utilizado para calcular a potencialidade de uma substância possuir umas das bioatividades mencionadas usa estatísticas Bayesianas sofisticadas para comparar estruturas de ligantes ativos no alvo em particular com estruturas de moléculas inativas e identificar características da subestrutura (que por sua vez determinam propriedades físico-químicas) típicas de moléculas ativas (MOLINSPIRATION, 2019).

(III) *admetSAR 2.0* (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>): foi usada para prever parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (YANG *et al.*, 2018).

(IV) *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>): utilizada para prever os possíveis alvos farmacológicos dos compostos avaliados, com base em uma combinação de similaridade 2D e 3D com ligantes conhecidos. As previsões podem ser realizadas em cinco organismos diferentes (*Homo sapiens*,

*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, e *Equus caballus*), totalizando mais de 12 mil alvos possíveis, cerca de 2,5 mil provenientes da espécie *Homo sapiens* (GFELLER *et al.*, 2014).

(V) *iGEMDOCK*: utilizada para realizar o estudo de ancoragem molecular frente a enzima 17-beta-desidrogenase 2 (PDB: 1A27), alvo apontado pela ferramenta *Swiss Target Prediction*, disponível no banco de dados *Protein Data Bank*. Trata-se de uma ferramenta que permite estudar as interações farmacológicas, que são úteis para entender os mecanismos de ligação de ligantes à um alvo terapêutico. Segundo estudos realizados pelos desenvolvedores da ferramenta, a taxa de sucesso do *iGEMDOCK* é de 78% considerando uma amostra de 305 complexos de proteínas e seus respectivos ligantes cristalográficos retirados do banco de dados *Protein Data Bank* (YANG; CHEN, 2004; YANG *et al.*, 2018).

(VI) *UCSF Chimera 1.10.1*: utilizada para avaliar visualmente as interações enzima-ligantes resultantes de estudos de ancoragem molecular (PETTERSEN *et al.*, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades moleculares dos cafeatos monoterpênicos foram calculadas na ferramenta *Molinspiration* (Tabela 1). A análise dessas propriedades permite inferir acerca da biodisponibilidade oral de candidatos à fármacos, uma vez que esses parâmetros estão associados à permeabilidade dos compostos na membrana celular (LIPINSKI *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Propriedades moleculares dos compostos **12-21** determinadas na ferramenta *Molinspiration*.

Composto	miLogP	TPSA	MW	nON	nOHNH	Nviolations
12	4,13	66,76	318,41	4	2	0
13	4,25	66,76	320,43	4	2	0
14	2,34	66,76	300,35	4	2	0
15	3,29	66,76	316,40	4	2	0
16	2,22	66,76	284,31	4	2	0
17	2,50	66,76	264,32	4	2	0
18	3,62	66,76	316,40	4	2	0
19	4,38	66,76	334,46	4	2	0
20	4,43	66,76	332,44	4	2	0
21	4,13	66,76	318,41	4	2	0

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise dos dados disponíveis na Tabela 1 observa-se que não houve nenhuma violação à regra dos cinco de Lipinski. Desse modo, espera-se que os compostos avaliados apresentem boa biodisponibilidade oral, uma vez que possuem propriedades moleculares condizentes para fármacos de administração oral.

Os dados de bioatividade calculados na ferramenta *Molinspiration* apresentaram resultados promissores para os cafeatos monoterpênicos. Vale destacar que os receptores nucleares são expressos em numerosos tipos de células estromais e parenquimatosas, cujos papéis fisiológicos sugerem potencial terapêutico no contexto do microambiente reativo do tumor (RIGGINS *et al.*, 2010). Segundo Sherman, Downes e Evans (2012) há evidências de que a inflamação, angiogênese e fibrose associadas ao tumor podem ser moduladas no nível transcricional pelos receptores nucleares e seus ligantes. Como esses processos têm sido amplamente implicados na iniciação, progressão e resistência ao câncer, os ligantes de receptores nucleares direcionados ao microambiente do tumor podem ser agentes antitumorais potentes em combinação com quimioterapia (SHERMAN; DOWNES; EVANS, 2012).

Ademais, os resultados obtidos na ferramenta *Swiss Target Prediction*, indica que a maioria dos cafeatos idealizados apontaram significativamente para a inibição da enzima 17-beta-desidrogenase 2, principalmente os híbridos **12**, **13**, **14**, **17** e **21**. A enzima 17-beta-desidrogenase 2, atua na conversão da estrona em estradiol, hormônio mais importante para o metabolismo feminino, que é responsável pelo crescimento de diversos tecidos, inclusive, pelo crescimento de tumores na mama (FARIA, 2014). Os resultados obtidos nas ferramentas *Molinspiration* e *Swiss Target Prediction* indicam que alguns dos cafeatos monoterpênicos possuem potencial para atuarem como fármacos para o tratamento do câncer de mama.

As propriedades farmacocinéticas dos cafeatos **12-21** foram avaliadas utilizando a ferramenta *admetSAR* 2.0. Observou-se que todos os compostos avaliados apresentaram resultados negativos para o parâmetro de inibição e substrato da glicoproteína-P, proteína presente na membrana celular, responsável por expulsar substâncias tóxicas e xenobióticas para o exterior da célula. A glicoproteína P (P-gp) é uma das principais proteínas transportadoras e está envolvida em muitos processos essenciais, como transporte de lipídios e esteroides através das membranas celulares, mas também na captação de medicamentos como inibidores da HIV protease e da transcriptase reversa (WANG *et al.*, 2011). Dessa forma, caso algum composto apresentasse resultado positivo para ser substrato da glicoproteína-P, ele seria expulso pela mesma, o que poderia prejudicar a ação da substância.

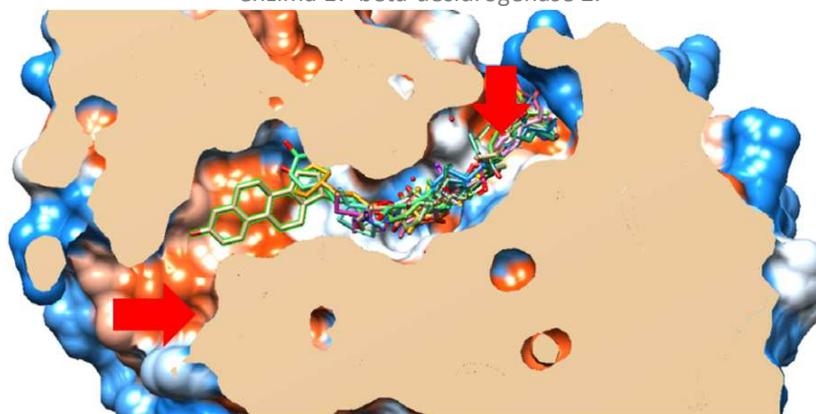
Em relação ao parâmetro de toxicidade oral aguda, calculado a partir do algoritmo desenvolvido por Zu *et al.* (2009), observou-se que os compostos avaliados apresentaram resultados entre os graus III (500 mg/kg < LD<sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg) e IV (LD<sub>50</sub> > 5000 mg/kg), ou seja, apresentaram baixa toxicidade. Observou-se que a maioria dos compostos avaliados, não inibem as isoformas do citocromo CYP 450, que no contexto do presente estudo é vantajoso visto que elas atuam na metabolização de substâncias xenobióticas. Muitos dos efeitos colaterais adversos das interações medicamentosas ocorrem devido à inibição do citocromo CYP 450, o que torna esse parâmetro um importante modelo a ser avaliado durante a fase de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A ferramenta *admetSAR* realiza cálculos para as cinco principais isoformas do CYP, a saber 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4 (CHENG *et al.*, 2011).

Em relação à mutagenicidade e carcinogenicidade, observou-se que os compostos avaliados apresentaram resultados negativos para os modelos

avaliados. Conclui-se, desta forma, considerando todos os modelos de toxicidade avaliados, que os cafeatos monoterpênicos possuem baixa ou nula toxicidade.

O estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando a ferramenta *iGEMDOCK* e os resultados obtidos para a interação enzima-ligante foram analisados na ferramenta *UCSF Chimera*. A partir da análise das interações enzima-ligantes, por meio da ferramenta *Chimera*, pode-se observar que a enzima possui duas fendas (de tamanhos diferentes), que permitem a entrada de compostos para o interior da enzima, formando um canal dentro da mesma (Figura 2).

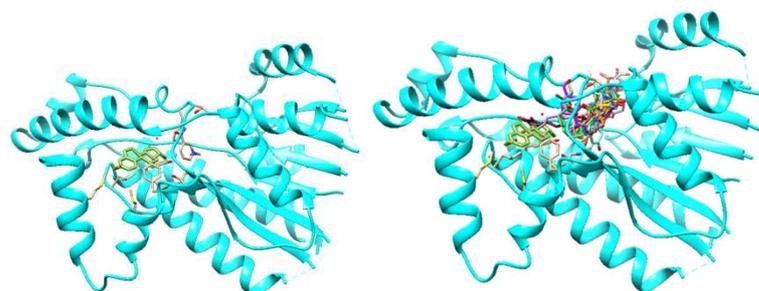
Figura 2 - Representação das fendas de entrada (indicadas por setas vermelhas) da enzima 17-beta-desidrogenase 2.



Fonte: Autoria Própria.

O sítio ativo da enzima 17-beta-desidrogenase 2 (PDB: 1A27) localiza-se próximo a fenda menor e é envolto pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Tyr155, Ser142, Val225, Val143, Leu149 (BRETON *et al.*, 1996). Na Figura 3(a) é representado o ligante natural ancorado no sítio ativo da enzima, e a Figura 3(b) mostra todos os compostos avaliados ancorados na enzima.

Figura 3 - Enzima 17-beta-desidrogenase 2 com seu ligante natural (esquerda) e com os compostos 1-21 ancorados (direita).



Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que todos os compostos avaliados encontram-se ancorados no canal que está localizado o sítio ativo, mas a maioria está próxima à fenda maior, que está mais distante do sítio ativo, logo tais interações podem não resultar em inibição enzimática. No entanto, observa-se que esses compostos formam um bloqueio no canal de acesso ao sítio ativo por essa fenda. Caso o estradiol entre por esta fenda, esses compostos podem então ter

potencial para inibir a ação da enzima. Entretanto, são necessários estudos adicionais acerca do mecanismo de ação dessa enzima, pois não há registros na literatura da entrada do ligante natural por uma fenda alternativa.

A partir dessa visualização observou-se que os compostos **14** e **19** ancoraram-se no sítio ativo da enzima, interagindo com o resíduo de aminoácido Tyr 155. A partir da análise do dendograma que representa, em ordem hierárquica, as interações dos compostos com os resíduos de aminoácidos da enzima em estudo, pode-se verificar que os compostos **14** e **19** interagem com resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. Como já apontado anteriormente, os demais compostos apresentam interações que ocorrem afastadas do sítio ativo da enzima.

Os cafeatos monoterpênicos apresentaram energia de interação enzima-ligante maior que a dos álcoois monoterpênicos e que do ácido cafeico. Assim como esperado, a hibridação molecular resultou em um aumento da interação enzima-ligante, uma vez que há um aumento no número de interações intermoleculares. Os compostos que se ancoraram no sítio ativo (**14** e **19**) apresentaram energia de interação de  $-98,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e  $-100,91 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , respectivamente. Desta forma, conclui-se que apenas dois (**14** e **19**) entre os dez cafeatos estudados possuem potencial de inibição da enzima 17-beta-desidrogenase 2, que está associada ao desenvolvimento de câncer de mama.

## CONCLUSÕES

Os híbridos formados por ácido cafeico e os álcoois monoterpênicos mirtenol e citranelol (compostos **14** e **19**) apresentaram propriedades moleculares, farmacocinéticas e farmacológicas condizentes para candidatos a fármacos. Tais resultados indicam a potencialidade de investir em testes *in vitro* e/ou *in vivo* para continuação da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Os cafeatos monoterpênicos **14** e **19** apontaram potencialidade para a inibição da enzima 17-beta-desidrogenase 2, enzima responsável pelo crescimento de tumores na mama, e de acordo com os estudos *in silico* realizados esses compostos interagem com uma energia de interação efetiva com o resíduo de aminoácido Tyr 155 presente no sítio ativo da enzima. Dessa forma, esses dois híbridos possuem potencial atividade para inibir a enzima 17-beta-desidrogenase 2 e atuar no tratamento do câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRETON, R. et al. The structure of a complex of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP<sup>+</sup> identifies two principal targets for the design of inhibitors. **Structure**, v. 4, n. 8, p. 905-915, 1996.

CHENG, F. et al. Classification of cytochrome P450 inhibitors and noninhibitors using combined classifiers. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 51, n. 5, p. 996-1011, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

FARIA, D. A. G. **Inibidores da 17 $\beta$ -Hidroxiesteróide Desidrogenase e Terapia do Cancro de Mama**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 42, W32-W38, 2014.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

MOLINSPIRATION. Molinspiration Cheminformatics. Disponível em: <https://www.molinspiration.com/>. Acesso em: 01 nov. 2019.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

RIGGINS, R. B. et al. Orphan nuclear receptors in breast cancer pathogenesis and therapeutic response. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, p. R213-R231, 2010.

SHERMAN, M. H.; DOWNES, M., EVANS, R. M. Nuclear receptors as modulators of the tumor microenvironment. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2012.

WANG, Z. et al. P-glycoprotein substrate models using support vector machines based on a comprehensive data set. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 51, n. 6, p. 1447-1456, 2011.

YANG, H. et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2018.

YANG, J.-M.; CHEN, C.-C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 55, n. 2, p. 288-304, 2004.

ZU, H. et al. Quantitative structure-activity relationship modeling of rat acute toxicity by oral exposure. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 1913-1921, 2009.