

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Maria Fernanda Alves do Nascimento

**AVALIAÇÃO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NAFTOQUINONAS NATURAIS E  
SINTÉTICAS VISANDO A SELEÇÃO DE CANDIDATOS A DESENVOLVIMENTO  
DE ANTIMALÁRICOS**

Belo Horizonte

2020

MARIA FERNANDA ALVES DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NAFTOQUINONAS NATURAIS E  
SINTÉTICAS VISANDO A SELEÇÃO DE CANDIDATOS A DESENVOLVIMENTO  
DE ANTIMALÁRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup> Alaíde Braga de Oliveira

Coorientador: Professor Dr. Carlos Alberto Tagliati

Colaboradora: Dra. Tatiane Freitas Borgati

Belo Horizonte

2020

N244a Nascimento, Maria Fernanda Alves do.  
Avaliação *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de naftoquinonas naturais e sintéticas visando a seleção de candidatos a desenvolvimento de antimaláricos [recurso eletrônico] / Maria Fernanda Alves do Nascimento. – 2020.  
1 recurso eletrônico (177 f. : il.) : pdf  
Orientadora: Alaíde Braga de Oliveira.  
Coorientador: Carlos Alberto Tagliati.  
Colaboradora: Tatiane Freitas Borgati.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.  
Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.  
1. Malária – Teses. 2. Naftoquinonas – Teses. 3. Antimaláricos – Teses. 4. Citotoxicidade – Teses. 4. Técnicas In Vitro – Teses. I. Oliveira, Alaíde Braga de. II. Tagliati, Carlos Alberto. III. Borgati, Tatiane Freitas. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.  
CDD: 616.9362



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MARIA FERNANDA ALVES DO NASCIMENTO

Realizou-se, no dia 28 de fevereiro de 2020, às 14:00 horas na sala 3062 B3 da Faculdade Farmácia/UFMG, a 135ª defesa de tese, intitulada *AVALIAÇÃO IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO DE NAFTOQUINONAS NATURAIS E SINTÉTICAS VISANDO A SELEÇÃO DE CANDIDATOS A DESENVOLVIMENTO DE ANTIMALÁRICOS*, apresentada por MARIA FERNANDA ALVES DO NASCIMENTO, número de registro 2015746255, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Alaíde Braga de Oliveira - Orientadora (UFMG), Prof. Carlos Alberto Tagliati - Coorientador (UFMG), Prof. Fernão Castro Braga (UFMG), Dra. Luzia Helena Carvalho (FIOCRUZ/RENE RACHOU), Profa. Adriana Oliveira Costa (UFMG), Prof. Geraldo Célio Brandão (UFOP).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.

Profa. Alaíde Braga de Oliveira (Doutora)

Prof. Carlos Alberto Tagliati (Doutor)

Prof. Fernão Castro Braga (Doutor)

Dra. Luzia Helena Carvalho (Doutora)

Profa. Adriana Oliveira Costa (Doutora)

Prof. Geraldo Célio Brandão (Doutor)

**Aos meus pais, por sempre me  
incentivarem a SONHAR.**

**E aos meus queridos meninos: Elias e  
Bernardo.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Professora Alaíde, minha orientadora, exemplo de profissional correto e competente, que me incentivou a dar este grande passo. Gratidão pelo constante apoio e por compartilhar comigo um pouco da sua Grande Sabedoria. Tenho muito orgulho de ser sua aluna!

Ao Professor Carlos, meu coorientador, pela grande ajuda na realização deste trabalho. Sou muita grata por todo apoio!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, FAFAR, UFMG.

Ao Secretário da Pós-Graduação, Marton, pelo carinho e atenção dedicado aos alunos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte Financeiro.

Ao Professor Fernão Castro Braga, chefe do Laboratório de Fitoquímica.

Aos meus colegas de Laboratório, pela doce convivência, tornando os dias de pesquisas mais agradáveis.

Ao Douglas, grande profissional, pelo suporte com a parte química e revisão do meu artigo.

À Renata, que me ensinou a trabalhar com o cultivo celular. Gratidão pela sua paciência e por ter me incentivado a fazer o doutorado

À Larissa, do Labtox, por toda ajuda e suporte com os testes *in vivo*.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que nós, seus filhos, estudássemos. Gratidão por me incentivarem a sonhar e a sempre buscar aprender coisas novas. O grande amor que sempre recebi me ajudou a chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Ana Cristina e Nathalia por serem minhas grandes amigas. Gratidão pelo amor e aconchego de todos os momentos. Ao Willian e a Viviane, meus cunhados, gratidão por fazerem parte da nossa família.

Aos meus sobrinhos, Heitor e Emmanuel, por sempre trazerem alegria para a minha vida.

Ao Elias, meu grande AMOR, companheiro de todos os momentos, gratidão pelo carinho, alegria e compreensão. Gratidão por sua doce presença em minha vida!

Ao Bernardo, meu filho, pela magia que trouxe para a minha vida.

A todos os meus familiares e amigos!!!

## RESUMO

A malária é uma doença infecto-parasitária humana com alto impacto na saúde pública em áreas tropicais e sub-tropicais, contribuindo, consideravelmente, para a mortalidade nestas regiões. *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* são os principais agentes etiológicos da malária humana e são transmitidos por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Apesar dos progressos consideráveis nas intervenções de controle da malária nos últimos 15 anos os números relativos a casos e mortalidade ainda são inadmissíveis para uma doença tratável, o que se deve a vários fatores como uma crescente resistência aos fármacos antimaláricos existentes e uma eficácia limitada do candidato a vacina mais avançada atualmente. São muitos os relatos na literatura sobre substâncias antimaláricas, incluindo naftoquinonas naturais e sintéticas, sendo a maioria destes constituídos por resultados preliminares, mas são escassas as publicações sobre estudos pré-clínicos para avaliação de diferentes classes de substâncias químicas com comprovada atividade *in vitro* e/ou *in vivo* o que motivou o presente trabalho. Foram avaliadas 42 naftoquinonas das quais 39 são sintéticas e 3 são produtos naturais, as quais representam diferentes características estruturais como as 2-hidroxi-naftoquinonas (HNQs) (**1a-1h**), *orto*-furanonaftoquinonas (FNQs) (**2a-2h**), *para*-FNQs (**3a-3h**), aminopropoxinaftoquinonas (AMQs) (**4a-4d**), e sais da mefloquina combinados com HNQs ou lapachol (**5a-5i**). As seguintes etapas foram desenvolvidas: 1- Avaliação *in silico* de propriedades absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e toxicológicas pelo programa PreADMET 2- Avaliação da atividade antiplasmódica e citotoxicidade *in vitro* em cinco tipos celulares, células HepG2 (Hepatoma humano), LLC-PK1 (células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano). 3- Avaliação da citotoxicidade, em células *Balb/c* 3T3, através do documento de orientação OECD 129, para predição da toxicidade oral aguda. 4- Teste de toxicidade oral aguda utilizando o documento de orientação OECD 423. 5 – Teste de esquizonticidades sanguíneos em camundongos. Os resultados das metodologia *in silico* apresentaram as classes das HNQs e AMQs como as que possuíam a maioria das propriedades ADMET (Administração, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) favoráveis no total das substâncias consideradas. Em

relação ao índice de seletividade (IS) de todas as substâncias, os sais de mefloquina combinados com HNQs e lapachol foram os que apresentaram os maiores valores de IS (0,43-32,73.) No entanto, os sais foram muito citotóxicos para as células renais, com valores de  $CC_{50}$  entre 5,59-21,87 $\mu$ M. Foram selecionadas, no teste de citotoxicidade *in vitro*, as substâncias que apresentaram os maiores valores de  $CC_{50}$  na maioria das células testadas. Os resultados permitiram selecionar 3 das 42 naftoquinonas (**1a**, **1g**, e **lapachol**) para os testes através da OECD 129 *in vitro*, toxicidade oral aguda *in vivo* (OECD 423) através da extrapolação do resultado obtido pela OECD 129, e teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos. Uma das 3 naftoquinonas avaliadas foi o lapachol, substância ativa de espécies do gênero *Handroanthus* (sinon. *Tabebuia*), da família das Bigoniáceas. A dose inicial predita, pela OECD 129, para o teste de toxicidade oral aguda foi de 300mg/kg que foi inicialmente avaliada, seguindo-se a dose de 2000mg/kg. As substâncias não apresentaram sinais graves de toxicidade em nenhuma das doses testadas (300 e 2000mg/kg). No entanto, no teste de esquizonticidas sanguíneos nenhum dos camundongos apresentou redução de parasitemia em relação aos controles não tratados. Com base nestes resultados considera-se ainda uma possibilidade a ser explorada para estas três naftoquinonas: o desenvolvimento de formulações farmacêuticas que, pelas suas propriedades, possam compensar a baixa biodisponibilidade característica das mesmas.

Palavras-chave: malária; naftoquinonas; antimaláricos; citotoxicidade; técnicas *in vitro*.

## ABSTRACT

Malaria is a human parasitic disease with high impact on public health in tropical and sub-tropical areas, contributing considerably to mortality in these regions. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* are the main ethiological agents of human malaria and are transmitted by infected females of *Anopheles* mosquitoes. Despite considerable progress in malaria control interventions over the past 15 years, case and mortality figures are still unaffordable for a treatable disease, what is related to several factors such as increasing resistance to existing antimalarial drugs and limited effectiveness of the most advanced vaccine in development. There are many reports on antimalarial substances, including natural and synthetic naphthoquinones, most of which are still preliminary results, and there are few publications on preclinical studies for the evaluation of different classes of chemical substances with proven *in vitro* and / or *in vivo* activity what have motivated the present work. A total of 42 naphthoquinones were evaluated, 39 are synthetic and 3 are natural products. The assayed naphthoquinones disclose different structural characteristics such as 2-hydroxynapthoquinones / HNQs (**1a-1h**), *ortho*-FNQs (**2a-2h**), *para*-FNQs (**3a-3h**), AMQs (**4a-4d**), and mefloquine salts combined with HNQs or lapachol (**5a-5i**). The following steps were carried out: 1- *In silico* evaluation of ADME and toxicological properties by the PreADMET program; 2- Evaluation of *in vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity in different cell types, HepG2 cells (human Hepatoma), LLC-PK1 (epithelial cells of the proximal tubule pig kidney), A549 (human lung adenocarcinoma), Neuro-2A (mouse neuroblastoma) and MRC-5 (human fetal lung fibroblast); 3- OECD 129; 4- Acute oral toxicity - OECD 423 and 5 - Blood schizonticidal test in mice. The results of the *in silico* methodologies pointed to HNQs and AMQs as those with the most favorable properties among all the 42 substances. Regarding the IS of all substances, the mefloquine salts combined with HNQs and lapachol were the ones with the highest values (0.43 to 32.73). However, the salts were very cytotoxic to renal cells, with CC<sub>50</sub> values between 5.59-21.87µM. The *in vitro* cytotoxicity test, substances with highest CC<sub>50</sub> values were selected for the final tests. These results allowed the selection of 3 out of the 42 naphthoquinones (**1a**, **1g**, and **lapachol**) for the OECD 129 tests, acute oral toxicity *in vivo* (OECD 423) by extrapolating the results in the OECD 129, and in the blood schizonticidal test in mice. Lapachol, one of the 3 naphthoquinones evaluated was lapachol, an

active substance occurring in several species of the genus *Handroanthus* (synon. *Tabebuia*), of the Bignoniaceae family that was used in malaria therapeutics in former times. The initial dose predicted, by the OECD 129, for the oral toxicity test was 300mg/kg and it was firstly assayed and afterwards a dosis of 2000mg/kg was administered. The three substances (**1a**, **1g**, and **lapachol**) did not show any serious signs of toxicity in any of the tested doses (300 and 2000mg/ kg). However, in the *in vivo* blood schizonticidal test, no reduction of parasitemia was observed in the mices, in comparison with the untreated controls. On the basis of the present results, a possibility to be still considered for these three naphthoquinones would be the development of special pharmaceutical formulations which, by their particular properties, could compensate the low bioavalialibility of these compounds that could be a cause of their inactivity in the antmalarial *in vivo* assay.

Keywords: malaria; naphthoquinones; antimalarials; cytotoxicity; *in vitro* techniques.

## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1 - Países com casos nativos de malária em 2000 e seu status em 2018  | 25  |
| Figura 2 – Proporção de casos estimados de malária na Região das Américas, 2018  | 26  |
| Figura 3 - Mapa de risco de infecção de malária por município, Brasil, 2018  | 27  |
| Figura 4 – Ciclo biológico de <i>Plasmodium sp</i>   | 29  |
| Figura 5 – Estruturas químicas da quinina e quinolinas sintéticas  | 33  |
| Figura 6 – Estruturas químicas da artemisinina e derivados, naftoquina lapachol e atovaquona   | 34  |
| Figura 7 – História (experimental e <i>in silico</i> ) dos marcos e estratégias associadas com a investigação farmacêutica em função da época para cada paradigma. As setas vermelhas denotam anos aproximados das descobertas e desenvolvimentos metodológicos (MUCSI & CSIZMADIA, 2009 com modificações) | 38  |
| Figura 8 – Estruturas químicas da salicina, do ácido salicílico, e do ácido acetil salicílico (aspirina)   | 38  |
| Figura 9 – Diagrama de fluxo de PD&I de fármacos antes das metodologias computacionais   | 40  |
| Figura 10 – Novos fármacos aprovados pelo FDA no período de 1981-2014  | 43  |
| Figura 11 – Novos fármacos anticâncer aprovados pelo FDA no período de 1981-2014   | 44  |
| Figura 12 – Diagrama de PD&I incluindo métodos computacionais  | 45  |
| Figura 13 – Estrutura química de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas  | 61  |
| Figura 14 – Estruturas químicas das HNQs, <i>orto</i> -FNQs, <i>para</i> -FNQs e AMQs  | 66  |
| Figura 15 – Estruturas químicas dos sais formados pela combinação de mefloquina com HNQs e com o lapachol  | 67  |
| Figura 16 – Fluxograma de classificação de substâncias a partir do estudo toxicológico agudo iniciando-se a partir da dose de 300 mg/kg (OECD, 423)  | 79  |
| Figura 17 - Abordagem racional para a descoberta de antimaláricos (FIDOCK et al., 2004 com modificações)   | 132 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Propriedades de ADME preditas pelo programa PreADMET e critérios de classificação  | 69 |
| Tabela 2 – Propriedades preditas pelo programa PreADMET –Toxicologia  | 70 |
| Tabela 3 – Distribuição das amostras na placa para o teste de atividade antiplasmódica pelo $pLDH$  | 73 |
| Tabela 4 – Distribuição das amostras na placa teste – Método MTT  | 76 |
| Tabela 5 – Concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) em cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> (W2) ( $pLDH$ ); concentração citotóxica inibitória de 50% do crescimento ( $CC_{50}$ ) de células HepG2 (MTT); e Índice de Seletividade (IS) das NQs sintetizadas, e dos controles: lapachol, atovaquona e mefloquina (BORGATI, 2017) | 83 |
| Tabela 6 - Resumo da predição das propriedades ADME das HNQs, de acordo com o programa PreAMET  | 85 |
| Tabela 7 - Resumo da predição das propriedades ADME das <i>orto</i> -FNQs, de acordo com o programa PreAMET   | 86 |
| Tabela 8 - Resumo da predição das propriedades ADME das <i>para</i> -FNQs, de acordo com o programa PreAMET   | 87 |
| Tabela 9 - Resumo da predição das propriedades ADME das AMQs e naftoquinonas naturais e atovaquona, de acordo com o programa PreAMET  | 88 |
| Tabela 10 - Resumo da predição das propriedades toxicológicas das HNQs, pelo programa PreAMET   | 94 |
| Tabela 11 - Resumo da predição das propriedades toxicológicas das <i>orto</i> -FNQs, pelo programa PreAMET  | 94 |
| Tabela 12 - Resumo da predição das propriedades toxicológicas das <i>para</i> -FNQs, pelo programa PreAMET  | 95 |
| Tabela 13 - Resumo da predição das propriedades toxicológicas das AMQs e naftoquinonas naturais e atovaquona, pelo programa PreAMET   | 95 |
| Tabela 14 – Concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) para $\alpha$ -lapachona e $\beta$ -lapachona contra o <i>Plasmodium falciparum</i> (W2)   | 98 |
| Tabela 15 – Concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) para $\alpha$ -lapachona e $\beta$ -lapachona contra células HepG2  | 98 |
| Tabela 16 – Valores de $CC_{50}$ , $CI_{50}$ determinados e de IS calculados para $\alpha$ -lapachona e $\beta$ -lapachona  | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 17 – Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC <sub>50</sub> ) de células renais de porco- LLC-PK1 - testadas contra as substâncias avaliadas pelo Teste do MTT  | 101 |
| Tabela 18 – Resultados do teste de Tukey's realizado pelo programa Prism 5, comparando as médias dos valores das CC <sub>50</sub> nos diferentes grupos de substâncias   | 102 |
| Tabela 19 - Substâncias selecionadas para os testes de citotoxicidade em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), neuroblastoma de camundongo (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5); com base no IS (CC <sub>50</sub> HepG2/Cl <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> ), e nos valores de CC <sub>50</sub> em células renais de porco (LLC-PK1)  | 103 |
| Tabela 20 – Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC <sub>50</sub> ) de células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), de neuroblastoma de camundongos (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) testadas contra as substâncias avaliadas, através do Teste do MTT   | 104 |
| Tabela 21 - Resumo dos resultados <i>in vitro</i> com os valores de IS e CC <sub>50</sub> de testes em células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco (LLC-PK1), células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), células de neuroblastoma de camundongos (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) avaliadas contra as substâncias selecionadas  | 105 |
| Tabela 22 - Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC <sub>50</sub> ) de células Balb 3T3 testadas contra as substâncias avaliadas através da OECD 129  | 106 |
| Tabela 23 – Valores de LD50 <i>in vitro</i> (OECD 129) que foram utilizados para a extrapolação de dose <i>in vivo</i> no teste de toxicidade oral aguda (OECD 423)  | 106 |
| Tabela 24 – Percentual de parasitemia em camundongos inoculados com <i>P. berghei</i> ANKA (1X10 <sup>5</sup> parasitos - via intra peritoneal) tratados com três doses consecutivas das substância <b>1a</b> , <b>1g</b> e <b>lapachol</b> na dose de 200mg/kg ou difosfato de cloroquina (30mg/kg/dia). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados no 5 <sup>o</sup> e 9 <sup>o</sup> dia após a inoculação. N=5 animais/grupo | 109 |
| Tabela 25 – Registro dos dias de eutanásia dos camundongos do experimento <i>in vivo</i> com o <i>Plasmodium berghei</i>   | 110 |
| Tabela 26 – Dados da literatura para atividade <i>in vitro</i> de α-lapachona, β-lapachona e lapachol contra diferentes cepas de <i>Plasmodium falciparum</i>  | 121 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela A1 – Resultados para predição das propriedades das HNQs (2-hidróxi-3-(1'-alquenil)-1,4-naftoquinonas) (série 1) de acordo com o programa PreADMET – Predição de ADME   | 162 |
| Tabela A2 – Resultados para predição das propriedades das <i>orto</i> -FNQs ( <i>orto</i> -furanonaftoquinonas) (série 2) de acordo com o programa PreADMET – Predição de ADME  | 163 |
| Tabela A3 – Resultados para predição das propriedades das <i>para</i> -FNQs ( <i>para</i> -furanonaftoquinonas) (série 3) de acordo com o programa PreADMET – Predição de ADME  | 164 |
| Tabela A4 – Resultados para predição das propriedades dos AMQs (aminopropoxinaftoquinonas) (série 4), $\alpha$ -lapachona, $\beta$ -lapachona, lapachol e atovacona de acordo com o programa PreADMET – Predição de ADME              | 165 |
| Tabela A5 – Resultados para predição das propriedades das HNQs (2-hidróxi-3-(1'-alquenil)-1,4-naftoquinonas) (Série 1) de acordo com o programa PreADMET – Predição de Toxicologia  | 166 |
| Tabela A6 – Resultados para predição das propriedades das <i>orto</i> -FNQs ( <i>orto</i> -furanonaftoquinonas) (série 2) de acordo com o programa PreADMET – Predição de Toxicologia   | 167 |
| Tabela A7 – Resultados para predição das propriedades das <i>para</i> -FNQs ( <i>para</i> -furanonaftoquinonas) (série 3) de acordo com o programa PreADMET – Predição de Toxicologia   | 168 |
| Tabela A8 – Resultados para predição das propriedades dos AMQs (aminopropoxinaftoquinonas) (série 4), $\alpha$ -lapachona, $\beta$ -lapachona, lapachol e atovacona de acordo com o programa PreADMET – Predição de Toxicologia       | 169 |
| Tabela A9- Peso dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância <b>1a</b>   | 170 |
| Tabela A10 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância <b>1a</b>   | 171 |
| Tabela A11- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda da substância <b>1a</b> | 171 |
| Tabela A12- Peso dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância <b>1g</b>  | 172 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela A13 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância <b>1g</b>   | 173 |
| Tabela A14- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda da substância <b>1g</b> | 174 |
| Tabela A15- Peso dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda do <b>lapachol</b>   | 175 |
| Tabela A16 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda do <b>lapachol</b>  | 176 |
| Tabela A17- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda do <b>lapachol</b>      | 177 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, de acordo com o programa PreADMET. Propriedades: BHE (barreira hematoencefálica) *in vivo*; permeabilidade cutânea *in vitro*; solubilidade das substâncias em água e solução tamponada; permeabilidade em células Caco2 *in vitro*, permeabilidade em células MDCK *in vitro* 90
- Gráfico 2 – Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, realizadas pelo programa PreADMET. Propriedades: absorção intestinal humana e ligações a proteínas plasmáticas 91
- Gráfico 3 – Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, de acordo com o programa PreADMET. Propriedades: logD cutâneo, logP cutâneo, logS cutâneo em pH 7, 4; logS cutâneo em água pura 92
- Gráfico 4 - Curvas de absorção para substâncias padrão, no tempo de 90 min, em espectrofotômetro (Infinite M200Pro – TECAN), para o ensaio de citotoxicidade com células HepG2 97
- Gráfico 5 – Comparação entre as médias dos valores de CC<sub>50</sub>, em células LLC-PK1, dos diferentes grupos de substâncias 102
- Gráfico 6 – Resumo dos dados dos experimentos de toxicidade oral aguda (OECD 423). (A) - Porcentagem média de ganho de peso dos camundongos, por grupo, durante o experimento. (B) - Porcentagem média do peso dos rins dos camundongos por grupo, no dia da eutanásia. (C) - Porcentagem média do peso do fígado dos camundongos por grupo, no dia da eutanásia, no experimento de Toxicidade Oral Aguda (OECD 423) 108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACT – *Artemisinin-based Combination Therapy* (Terapia combinada à base de artemisinina)
- AIH – Absorção intestinal humana
- AMQs – Aminopropoxinaftoquinonas
- ADME – Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção
- ADMET – Administração, Distribuição, Metabolismo e Toxicidade
- ADME-TOX – Administração, Distribuição, Metabolismo e Toxicidade
- APAD – 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo
- A549 – Células de adenocarcinoma de pulmão humano
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CACO2 – Células de adenocarcinoma de cólon humano
- CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% dos parasitos
- CC<sub>50</sub> – Concentração citotóxica de 50% das células
- CQ – Difosfato de cloroquina
- DMEM – *Dulbecco's modified eagle's medium*
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- CYPs P450 – citocromo P450
- ERMO – Espécies reativas do metabolismo do oxigênio
- ERNS – Espécies reativas de nitrogênio
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- EURL ECVAM - *European Union Reference Laboratory - Committee on the Validation of Alternative Methods*
- FAFAR – Faculdade de Farmácia
- FDA – *Food and Drug Administration - United State*
- FNQs – Furanonaftoquinonas
- GpP – Glicoproteína P
- HepG2 – Células de hepatoma humano
- hERG – *the human Ether-à-go-go-Related Gene*
- HN – Hemácia normal
- HNQs – Hidroxinaftoquinonas
- HTS – *High Throughput Screening*
- HP – Hemácia parasitada

H9C2 – Células de cardiomiócitos embrionários de ratos

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

LHIF – Lesão hepática induzida por fármacos

LLC-PK1 – Células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco

MDCK – Célula epitelial do túbulo distal de rim de cão

MEM – *Minimum essential medium eagle*

MTT – 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio

NBT – *NitroBlue Tetrazolium Salt*

Neuro-2A – Células de neuroblastoma de camundongos

NQs – Naftoquinonas

OECD – (*Organization for Economic Co-operation and Development*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffer solution* (Solução tampão fosfato)

PD&I de fármacos – Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Fármacos

PreADMET – programa de predições de propriedades ADME

PES – Etosulfato de fenazina

QSAR – *Quantitative structure – activity relationship* (Estrutura quantitativa – relação atividade)

SFB – Soro fetal bovino

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>2.1 MALÁRIA</b> .....  | <b>24</b> |
| 2.1.1 Ciclo biológico .....   | 27        |
| 2.1.2 Sintomatologia .....  | 30        |
| 2.1.3 Quimioterapia antimalárica .....  | 31        |
| <b>2.2 O PROCESSO DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO (PD&amp;I) DE FÁRMACOS E<br/>MEDICAMENTOS</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>2.3 TOXICOLOGIA</b> .....  | <b>46</b> |
| 2.3.1 Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade <i>in silico</i> .....   | 46        |
| <b>2.3.1.1 PreADMET</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>2.3.1.1.1 Predição de ADME</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>2.3.1.1.2 Predição de propriedades toxicológicas</b> .....   | <b>52</b> |
| 2.3.2 Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....  | 55        |
| <b>2.3.2.1 Hepatotoxicidade</b> .....   | <b>55</b> |
| <b>2.3.2.2 Nefrotoxicidade</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>2.3.2.3 Toxicidade pulmonar</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>2.3.2.4 Neurotoxicidade</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>2.3.2.5 OECD 129 (documento guia de uso, de testes de citotoxicidade, para<br/>estimar a dose inicial dos testes de toxicidade oral aguda sistêmica)</b> ..... | <b>59</b> |
| 2.3.3 Toxicologia oral aguda – OECD 423 .....   | 59        |
| <b>2.4 ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE QUINONAS</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>4 OBJETIVOS</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>4.1 OBJETIVO GERAL</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>66</b> |
| <b>5.1 . NAFTOQUINONAS NATURAIS E SINTÉTICAS AVALIADAS</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>5.2 ADMET <i>IN SILICO</i></b> .....   | <b>68</b> |
| 5.2.1 Predição <i>in silico</i> de ADME pelo programa PreADMET .....  | 68        |
| 5.2.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET .....   | 69        |
| <b>5.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i></b> .....  | <b>70</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.3.1 Atividade antiplasmódica.....   | 70        |
| <b>5.3.1.1 Cultivo in vitro das fases intraeritocitárias de Plasmodium falciparum (W2).....</b>   | <b>70</b> |
| <b>5.3.1.2 Determinação da parasitemia.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>5.3.1.3 Atividade antiplasmódica in vitro contra Plasmodium falciparum (W2) pela quantificação da lactato desidrogenase (pLDH) (MAKLER &amp; HINRICH, 1993).....</b> | <b>71</b> |
| 5.3.2 Cultivo de células HepG2 (Hepatoma humano) .....  | 73        |
| 5.3.3 Outras células .....  | 74        |
| 5.3.4 Validação do método de determinação de citotoxicidade pelo teste do MTT – {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difenil tetrazólio]} .....                 | 75        |
| 5.3.5 Ensaios de citotoxicidade .....   | 75        |
| 5.3.6 OECD 129 (documento guia de uso, de testes de citotoxicidade, para estimar a dose inicial dos testes de toxicidade oral aguda sistêmica) .....                    | 77        |
| <b>5.4. TOXICIDADE ORAL AGUDA – OECD 423 .....</b>  | <b>78</b> |
| 5.4.1 Animais.....  | 79        |
| 5.4.2 Tratamento .....  | 79        |
| <b>5.5 TESTE DE ESQUIZONTICIDAS SANGUÍNEOS EM CAMUNDONGOS.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>6 RESULTADOS.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>6.1 RESULTADOS ANTERIORES .....</b>  | <b>82</b> |
| <b>6.2 ADMET <i>IN SILICO</i>.....</b>  | <b>84</b> |
| 6.2.1 Predição de ADME pelo programa PreADMET .....   | 84        |
| 6.2.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET .....   | 93        |
| <b>6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE PELO TESTE DO MTT – {BROMETO DE [3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-ILA)-2,5-DIFENIL TETRAZÓLIO]}.....</b>             | <b>96</b> |
| <b>6.4 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA EM <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> (W2) (pLDH) E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HEPG2 (MTT).....</b>  | <b>98</b> |
| <b>6.5 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>.....</b>  | <b>99</b> |
| 6.5.1 Citotoxicidade em células LLC-PK1 (células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco) .....   | 99        |
| 6.5.2 Citotoxicidade em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), Neuro-2A (Neuroblastoma de camundongos) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano) .....    | 103       |
| 6.5.3 OECD 129 – ( <i>guidance document on using cytotoxicity tests to estimate</i>   |           |

|  |            |
|--|------------|
| <i>starting doses for acute oral systemic toxicity tests</i> ).....  | 106        |
| <b>6.6 TOXICIDADE ORAL AGUDA - OECD 423</b> .....  | <b>107</b> |
| <b>6.7 TESTE DE ESQUIZONTICIDAS SANGUÍNEOS EM CAMUNDONGOS</b> .....  | <b>109</b> |
| <b>7 DISCUSSÃO</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>7.1 ADMET <i>IN SILICO</i></b> .....  | <b>112</b> |
| 7.1.1 Predição de ADME pelo programa PreADMET .....  | 112        |
| 7.1.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET .....  | 116        |
| <b>7.2 ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA EM <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> (W2) (PLDH)</b> .....  | <b>119</b> |
| <b>7.3 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i></b> .....  | <b>122</b> |
| <b>7.4 OECD 129 – (<i>GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS</i>)</b> ..... | <b>124</b> |
| <b>7.5 TOXICIDADE ORAL AGUDA – OECD 423</b> .....  | <b>125</b> |
| <b>7.6 TESTE DE ESQUIZONTICIDAS SANGUÍNEOS EM CAMUNDONGOS</b> .....  | <b>127</b> |
| <b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | <b>129</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>133</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....  | <b>161</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Mesmo após se ter alcançado sucesso na redução da mortalidade e morbidade relacionadas à malária, esta endemia continua sendo um problema de saúde global, especialmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que no ano de 2018, cerca de 228 milhões de pessoas foram infectadas por *Plasmodium falciparum* e/ou *P. vivax*, os principais agentes causadores da doença, e foram relatadas 405 mil mortes (WHO, 2019). É consenso na comunidade científica que a eliminação da malária não será possível sem o desenvolvimento de intervenções seguras e eficazes de bloqueio da transmissão. Há uma necessidade urgente de desenvolver novas intervenções terapêuticas que possam atingir os parasitos da malária e bloquear efetivamente a transmissão (WADI et al., 2019).

Cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* são mais frequentes por causar a doença humana, sendo quatro dessas exclusivamente humanas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*. Uma espécie, antes exclusiva de macacos, *P. knowlesi* (SINGH et al., 2004), tem sido relatada em casos de malária humana. *P. knowlesi* é a causa mais frequente de malária na Malásia, sendo responsável por 70% de todos os casos atuais nessa região, e vários casos tem sido descritos em quase todos os países do Sudeste da Ásia (BARBER et al., 2017; DAVIDSON et al., 2019).

Entre as diferentes espécies causadoras da malária humana, *P. falciparum* é responsável por causar a forma mais letal de malária, frequentemente associada a complicações com risco de vida, como malária cerebral, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência hepática e renal e anemia grave (IDRO et al., 2010; THANACHARTWET et al., 2013; VIRIYAVEJAKUL et al., 2014; LEONI et al., 2015). *P. vivax* é a espécie mais difundida, sendo responsável por cerca de 3% dos casos globais estimados. No entanto, fora do continente africano, essa proporção é superior a 29%, sendo este parasito predominante em todo o continente americano, representando aproximadamente 75% de todos os casos de malária. No Brasil, *P. vivax* representa cerca de 90% dos 194.000 casos de malária registrados em 2017 (WHO, 2019). Embora a infecção por *P. vivax* seja considerada clinicamente mais benigna que a infecção por *P. falciparum*, casos de malária grave e morte por infecção por *P. vivax* foram registrados em muitas áreas endêmicas, incluindo o Brasil (ALEXANDRE et al., 2010).

Os fármacos antimaláricos têm sido o principal instrumento de controle e profilaxia da malária desde o uso da quinina isolada de espécies de *Cinchona* spp (Família Rubiaceae) da América do Sul. Entre os fármacos antimaláricos desenvolvidos no século 20, destacam-se a cloroquina, uma quinolina sintética, e a artemisinina, substância ativa da *Artemisia annua* L. da Medicina Tradicional Chinesa. No entanto, a capacidade de *P. falciparum*, em particular, para desenvolver resistência a estes fármacos, fez diminuir o uso da cloroquina na terapêutica antimalárica, e da artemisina como fármaco, o que motivou o desenvolvimento de combinações com outros antimaláricos, bem como as pesquisas na área com base em novas abordagens de desenvolvimento de novos fármacos e novos alvos. Em resposta à propagação da resistência do parasito à cloroquina e a outros antimaláricos, como a pirimetamina e a sulfadoxina, as terapias combinadas baseadas em artemisinina (ACTs) são agora recomendadas para o tratamento da malária não complicada e seu uso tem sido uma parte importante da diminuição notável da malária, globalmente. No entanto, há relatos, no Camboja, da sensibilidade decrescente de *P. falciparum* aos derivados de artemisinina, onde os pacientes tiveram tempos de uso significativamente mais longos (DONDORP et al., 2009).

As hidroxinaftoquinonas têm sido amplamente estudadas ao longo dos últimos 50 anos por sua atividade antimalárica (DAVIES et al., 1989; SRIVASTAVA et al., 1997, SCHUCK et al., 2013; PEREIRA et al., 2018). O lapachol foi a primeira hidroxinaftoquinona descrita com atividade antimalárica (HOOKER, 1936). Na década de 1970, com o surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, em todas as regiões endêmicas para malária, foram revistos trabalhos sobre a atividade antimalárica de hidroxinaftoquinonas, levando à descoberta da atovaquona, um fármaco comercialmente disponível para a quimioprofilaxia da malária (SHAPIRO et al., 1999) e usado para tratar infecções por *P. falciparum* em áreas de resistência à cloroquina (AGUIAR et al., 2012).

Devido à comprovada atividade antimalárica de naftoquinonas (FONSECA, et al., 2003; HUSSAIN et al., 2007; SODERO et al., 2017), e a experiência do grupo da Profa Alaíde Braga de Oliveira com a fitoquímica de plantas produtoras de naftoquinonas, bem como na síntese parcial e total de substâncias desta classe, à crescente necessidade de desenvolvimento de metodologias para a triagem rápida de substâncias (com o menor número de animais) ativas para avaliar potenciais

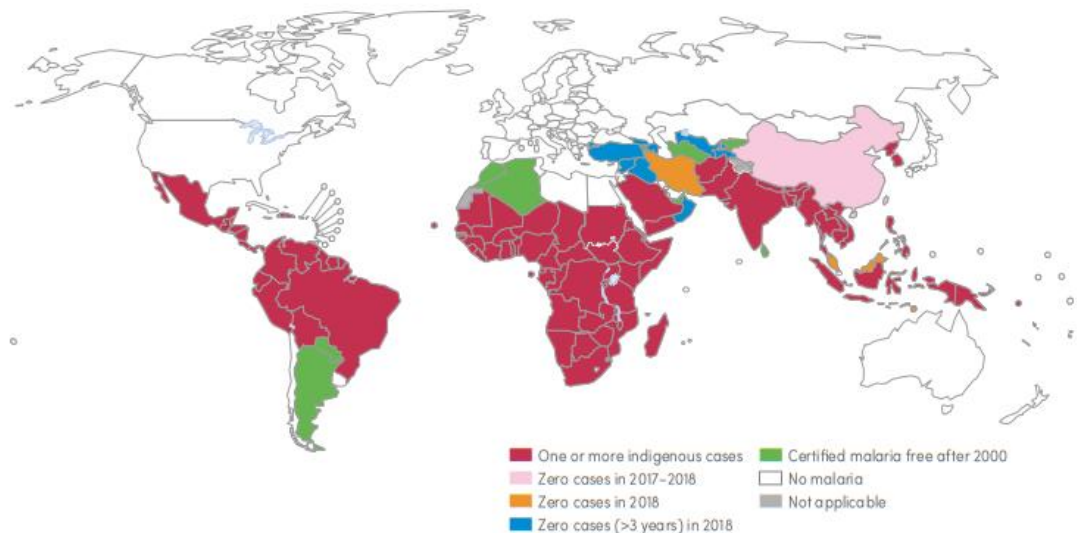
candidatos a fármacos, o presente trabalho teve como objetivo a realização de estudos pré-clínicos para avaliação de substâncias disponíveis como potenciais antimaláricos, com ênfase em estudos de toxicologia *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Foram avaliadas 40 naftoquinonas, entre sintéticas e naturais, que se mostraram ativas em ensaios *in vitro* contra *P. falciparum*. Neste contexto, os trabalhos desenvolvidos pelo grupo da Profa. Alaíde Braga de Oliveira compreendendo o isolamento e síntese de naftoquinonas (RASLAN, 1988; ZANI, 1991; CARVALHO et al., 1990; STARLING, 1996; GUALBERTO, 2001; DEL CORRAL et al., 2002; FERREIRA et al., 2002; DEL CORRAL et al., 2006; FERREIRA et al., 2006; QUEIROZ et al., 2008; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; BRANDÃO et al., 2018), e a tese defendida de Tatiane Freitas Borgati (BORGATI, 2017; BORGATI et al., 2017), geraram uma série de naftoquinonas que constituem a base para o desenvolvimento do presente trabalho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Malária

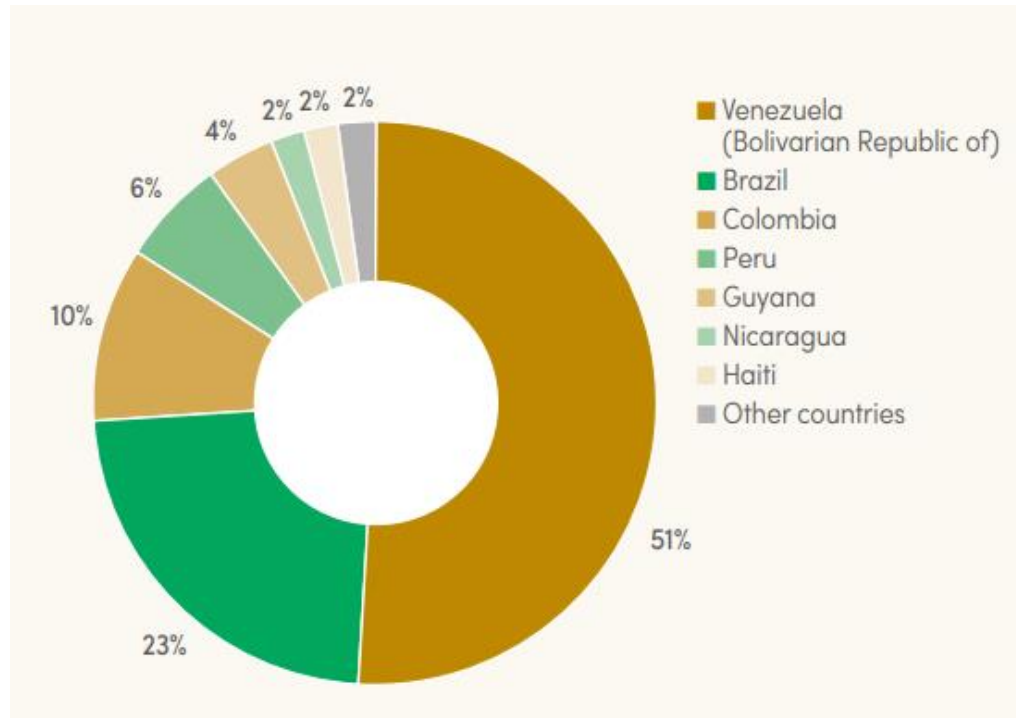
A malária é uma doença infecto-parasitária humana com alto impacto na saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. No início de 2016, a malária foi considerada endêmica em 91 países e territórios, em 2000, eram 108. Esta mudança pode ser atribuída, em grande parte, à implantação, em larga escala, de intervenções de controle nos países endêmicos. Apesar deste notável progresso, a malária continua a ter um impacto devastador sobre a saúde e os meios de subsistência das pessoas (WHO, 2016). Estima-se que no ano de 2018 (Figura 1), cerca de 228 milhões de pessoas foram infectadas por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*, os principais agentes causadores da doença, comparados com 251 milhões de casos em 2010 e 231 milhões de casos em 2017. Em 2018 foram estimadas 405 mil mortes globalmente, sendo a maioria dessas na África (93%). As crianças menores de cinco anos de idade são o grupo mais vulnerável (WHO, 2019).

**Figura 1- Países com casos nativos de malária em 2000 e seu status em 2018. Países com zero de casos nativos nos últimos 3 anos consecutivos são considerados livres da doença. Em 2018, China e El Salvador relataram zero casos nativos por dois anos consecutivos, e Iran, Malásia e Timor Leste relataram zero casos nativos pela primeira vez. Fonte: WHO, 2019**



Foi estimado que a incidência média da doença no continente americano entre 2010-2018 aumentou 14%, especialmente na Venezuela. Nas Américas, quatro países são responsáveis por 90% dos casos relatados em 2018: Venezuela (51%), Brasil (23%), Colômbia (10%) e Peru (6%) (Figura 2) (WHO, 2019). No Brasil, a maioria dos casos de transmissão da malária acontece na região Amazônica. Esta região é uma área complexa para a implementação de intervenções de controle bem-sucedidas. Em particular, estudos recentes destacaram o impacto do desmatamento, alta prevalência de casos assintomáticos, dificuldades na vigilância, o tratamento médico e a migração humana na manutenção da malária nesta região (CHU et al., 2019).

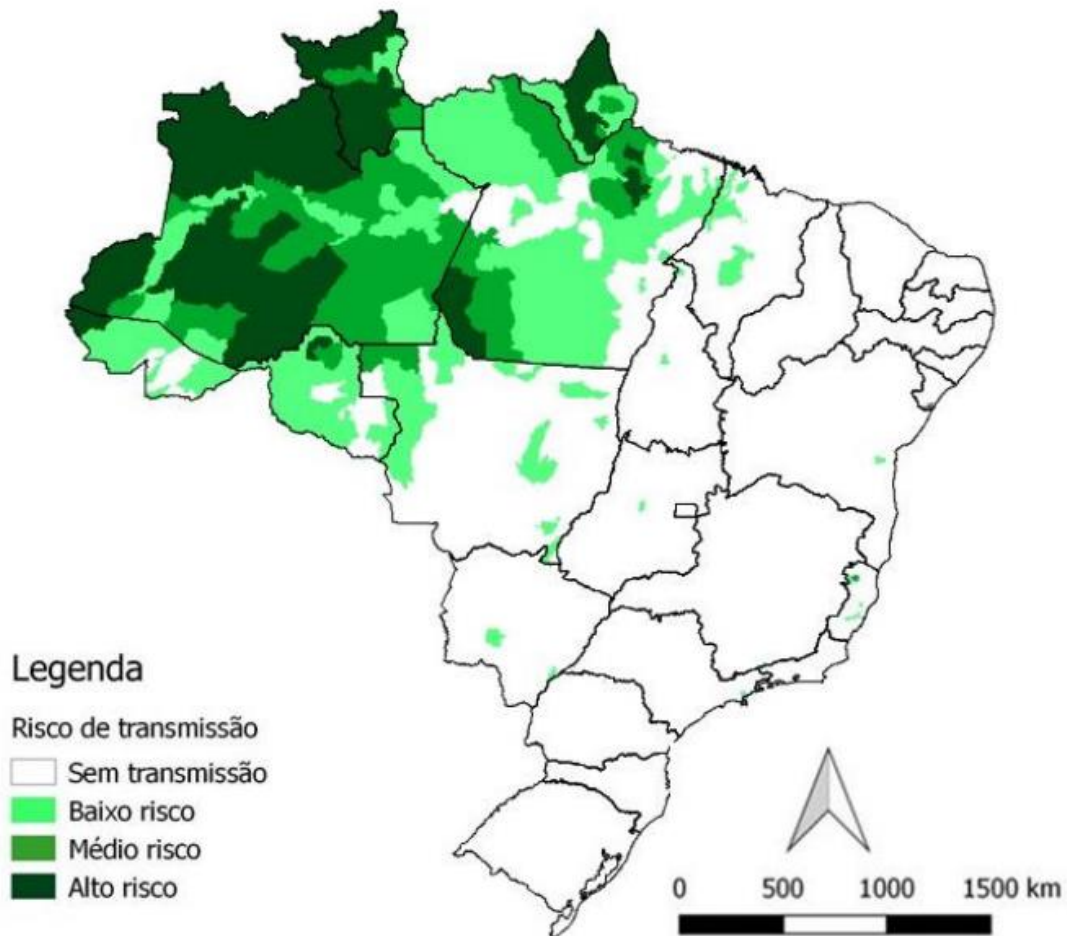
**Figura 2– Proporção de casos estimados de malária na Região das Américas, 2018**



Fonte: WHO, 2019

No Brasil, a malária é endêmica na região Amazônica, com 99,8% de todos os casos relatados, e altas taxas em estados como Amazonas, Acre, Roraima, Pará e Amapá (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) (Figura 3). Um declínio de 42% na mortalidade foi registrado entre 2010 e 2018; 44 mortes relacionadas à malária foram relatadas no Brasil em 2018 (WHO, 2019). Curiosamente, no Brasil, apenas 19% de todos os casos de malária nas regiões extra-amazônicas são diagnosticados e tratados dentro de 48 h após o início dos sintomas, em contraste com 60% dos casos de malária na região amazônica. Isso pode explicar a alta proporção de casos graves de malária em áreas não endêmicas. Conseqüentemente, a taxa de mortalidade da malária nas regiões extra-amazônicas é maior do que na região amazônica. Além disso, a falta de especialização entre os profissionais de saúde de áreas não endêmicas no diagnóstico e manejo da malária (PINA-COSTA et al., 2014) e o mau conhecimento geral do público servem como fatores agravantes no tratamento e controle da doença (LIMONGI et al., 2008).

**Figura 3– Mapa de risco de infecção de malária por município, Brasil, 2018**



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração.

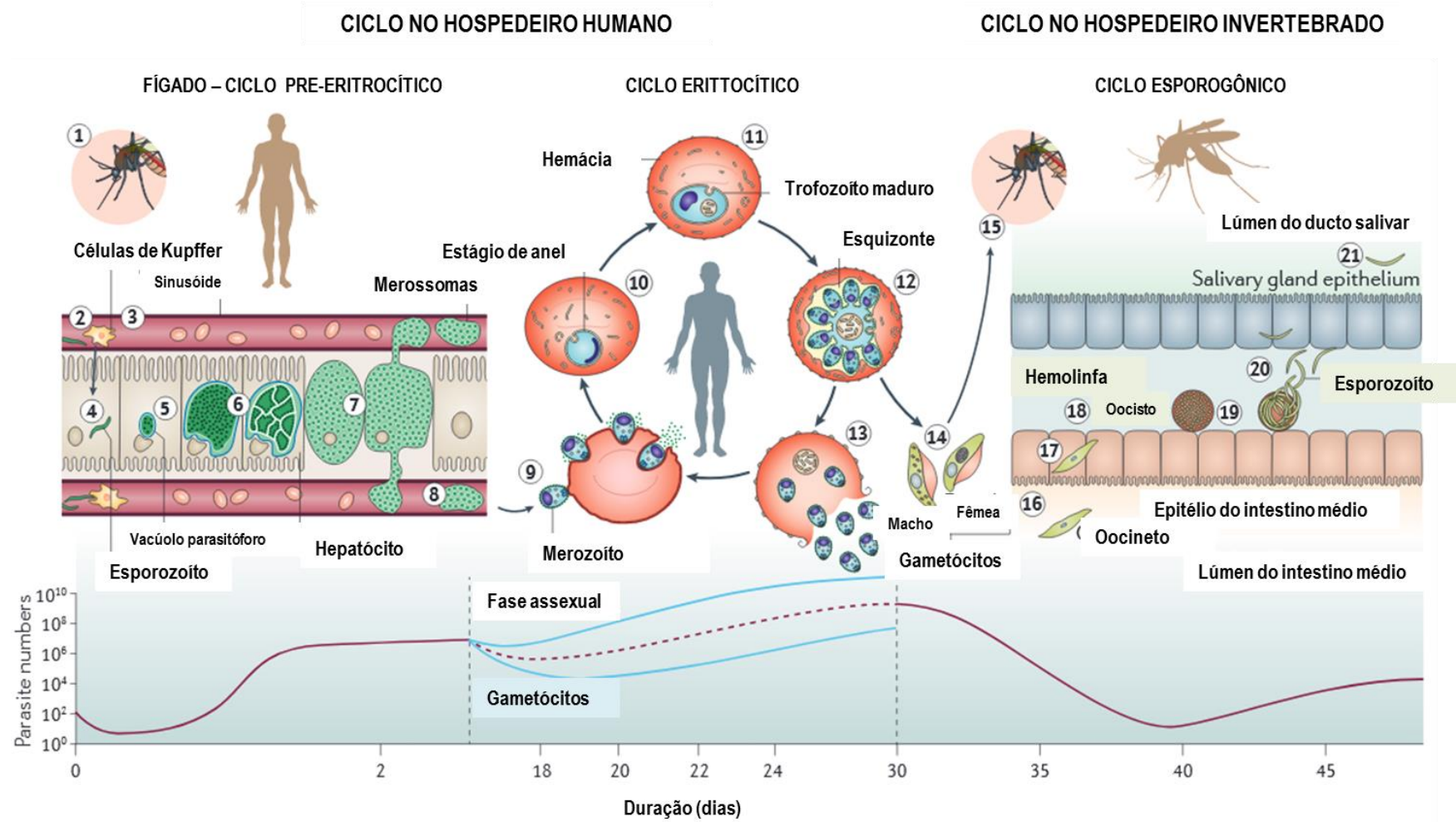
### 2.1.1 Ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Plasmodium* têm um ciclo de vida complexo envolvendo vários estágios de desenvolvimento. A transmissão para hospedeiros humanos ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, que injeta um pequeno número de esporozoítos de *Plasmodium* sp na pele e nos capilares (Figura 4 – passo 1). Uma vez inoculados, estes alcançam o fígado invadindo os hepatócitos, com o início da fase hepática do ciclo (MOTA et al., 2001; GREENWOOD et al., 2008). Após a entrada na vasculatura do fígado, os esporozoítas deslizam ao longo dos sinusóides (Figura 4 - passo 2) e migram através das células de Kupffer ou entre as células do epitélio fenestrado para atingir os hepatócitos (Figura 4 - passo 3) (TAVARES et al., 2013). Os esporozoítos migram

através de vários hepatócitos antes de invadir um destes (Figura 4 - passo 4) (MOTA et al., 2001). No hepatócito invadido, eles residem em um vacúolo parasitóforo (VP; Figura 4 - passo 5). Dentro de poucos dias, tem lugar a multiplicação assexuada (esquizogonia), sendo que um único esporozoíto libera milhares de merozoítos na corrente sanguínea (Figura 4 – passos 6 a 7). Os parasitos em estágio hepático induzem a morte da célula e o desprendimento de seus hepatócitos hospedeiros (STURM et al., 2006; HEUSSLER et al., 2010). Estes merozoítos exoeritrocíticos deixam o fígado envolvidos por uma vesícula denominada merossoma (Figura 4 – passo 8) e são capazes de invadir os glóbulos vermelhos dando início à fase sanguínea da infecção humana (GRAEWE et al., 2011). Em infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* alguns parasitos permanecem adormecidos no fígado (hipnozoítos) retomando a replicação e infecção depois de várias meses ou anos, causando recaídas (WELLS et al, 2010).

Cada merozoito é capaz de invadir um glóbulo vermelho, marcando o início dos estágios eritrocitários da infecção (Figura 4 - passo 9). A pré-patência (o período até que os parasitos apareçam no sangue) varia de 3 a 30 dias, dependendo da espécie do parasito, assim como vários outros fatores, como estado imunológico prévio do hospedeiro, exposição prévia do hospedeiro ao parasito e o número de esporozoítos inoculados (NIZ et al., 2017). Após a invasão dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem para trofozoítos jovens e maduros e se dividem, novamente por esquizogonia, em novos merozoítos (Figura 4 – passos 9 ao 13) (GRÜRING et al., 2011). Posteriormente, os glóbulos vermelhos infectados se rompem liberando novos merozoítos que são capazes de infectar outros eritrócitos. O ciclo sanguíneo é responsável por todos os sintomas clínicos, como febre e calafrios. Alguns parasitos deixam o ciclo assexuado e evoluem para as formas sexuais, os gametócitos, que circulam livremente no sangue (Figura 4 – passo 14) (SCHMIDT et al., 2015). No caso do *P. falciparum* pode haver o sequestro dos eritócitos parasitados na rede capilar.

Figura 4– Ciclo biológico de *Plasmodium* sp



Fonte: NIZ et al., 2017 com modificações

Quando um mosquito se alimenta com sangue de um humano infectado são ingeridos gametócitos que alcançam o intestino médio do inseto (Figura 4 – passos 15 e 16) (AINGARAN et al., 2012; JOICE et al., 2014). Dentro desse hospedeiro invertebrado ocorre o ciclo sexual do protozoário, onde gametócitos se transformam em gametas masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos) (SINDEN, 1999). Após a fertilização, é produzido um zigoto diplóide. O zigoto se desenvolve em uma forma móvel do parasito, conhecida como oocineto, através de um processo que pode levar de 16-24 horas, dependendo das espécies de *Plasmodium* (Figura 4 – passo 17 e 18) (GHOSH et al., 2000; DINGLASAN et al., 2009). O oocineto penetra na matriz peritrófica e passa através do epitélio intestinal transformando-se em um oocisto (Figura 4 – passo 19) (SMITH et al., 2014). Finalmente, os oocistos rompem e os esporozoítos libertados são transportados através da hemolinfa (Figura 4 - passo 20), alcançando e invadindo as glândulas salivares do mosquito (Figura 4 - passo 21). O ciclo biológico se fecha quando os esporozoítos liberados migram para a glândula salivar do mosquito, e são injetados em um novo hospedeiro humano através da picada do inseto (Figura 4 - passo 1) (HILLYER et al., 2007; PIMENTA et al., 2015). O ciclo completo leva várias semanas (veja na Figura 4, painel inferior; o eixo x mostra o tempo de cada evento, começando com a picada de um mosquito infectado no dia 0, e a duração de cada estágio, enquanto o eixo y mostra o número aproximado de parasitos em cada fase).

### 2.1.2 Sintomatologia

As manifestações clínicas da malária dependem da espécie e da cepa de *Plasmodium*. Além disso, deve-se levar em consideração a idade da pessoa infectada, constituição genética, estado imunitário, a imunidade específica à malária, entre outros fatores, como o estado nutricional, o modo de transmissão da infecção, se o indivíduo estava em profilaxia ou se tinha exposição prévia à fármacos antimaláricos (BOSTROM et al., 2012).

A malária humana, especificamente pelo *P. falciparum*, pode resultar em três diferentes manifestações: malária submicroscópica, malária complicada e malária não complicada. A malária submicroscópica é definida pela presença de parasitos na circulação periférica e ausência de qualquer sintoma e tratamento. Isso, provavelmente, se deve ao resultado de uma imunidade parcial, que pode controlar,

mas não eliminar a infecção (CHEN et al., 2016). Na malária não complicada, a infecção é acompanhada por febre, calafrios e sintomas agudos leves, podendo a parasitemia ser observada em esfregaços de sangue periférico. Já na malária complicada os sintomas agudos associados às infecções por malária aumentam de gravidade e afetam o funcionamento de vários órgãos, incluindo o cérebro (malária cerebral) (BARTOLONI & ZAMMARCHI, 2012).

A malária grave geralmente manifesta-se com um ou mais dos seguintes sintomas: coma (malária cerebral), acidose metabólica, anemia grave, hipoglicemia, insuficiência renal aguda ou edema pulmonar agudo. Se deixada sem tratamento, pode ser fatal na maioria dos casos (MILLER et al., 2002). *P. falciparum* é responsável pela maioria das casos de malária grave ou fatal. No entanto, na última década tem se observado um notável aumento de relatos de casos e estudos que descrevem a malária grave por *P. vivax* (GALINSKI & BARNWELL, 2008; GETHING et al., 2012).

Há várias formas de febre na malária. Em crianças e indivíduos não-imunes, ela pode ser acima de 40 °C (AGRAWAL & TEACH, 2006; SCHUMACHER & SPINELLI, 2012). A forma clássica da doença consiste de febres com calafrios ocorrendo em intervalos periódicos (a cada 48 h para *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 h para *P. malariae*) acompanhada de dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreias, dor nas costas, mialgia, palidez e icterícia. Esses sintomas correspondem à liberação dos merozoítos após a lise das hemácias. A periodicidade é menos aparente em *P. falciparum*. Apesar das variadas apresentações da malária, não existe nenhum conjunto específico de sinais e sintomas que diferenciem de forma confiável a malária de outras infecções, muitas vezes dificultando o diagnóstico (GHIAEE et al., 2014; BASU & SAHI, 2017).

### **2.1.3 Quimioterapia antimalárica**

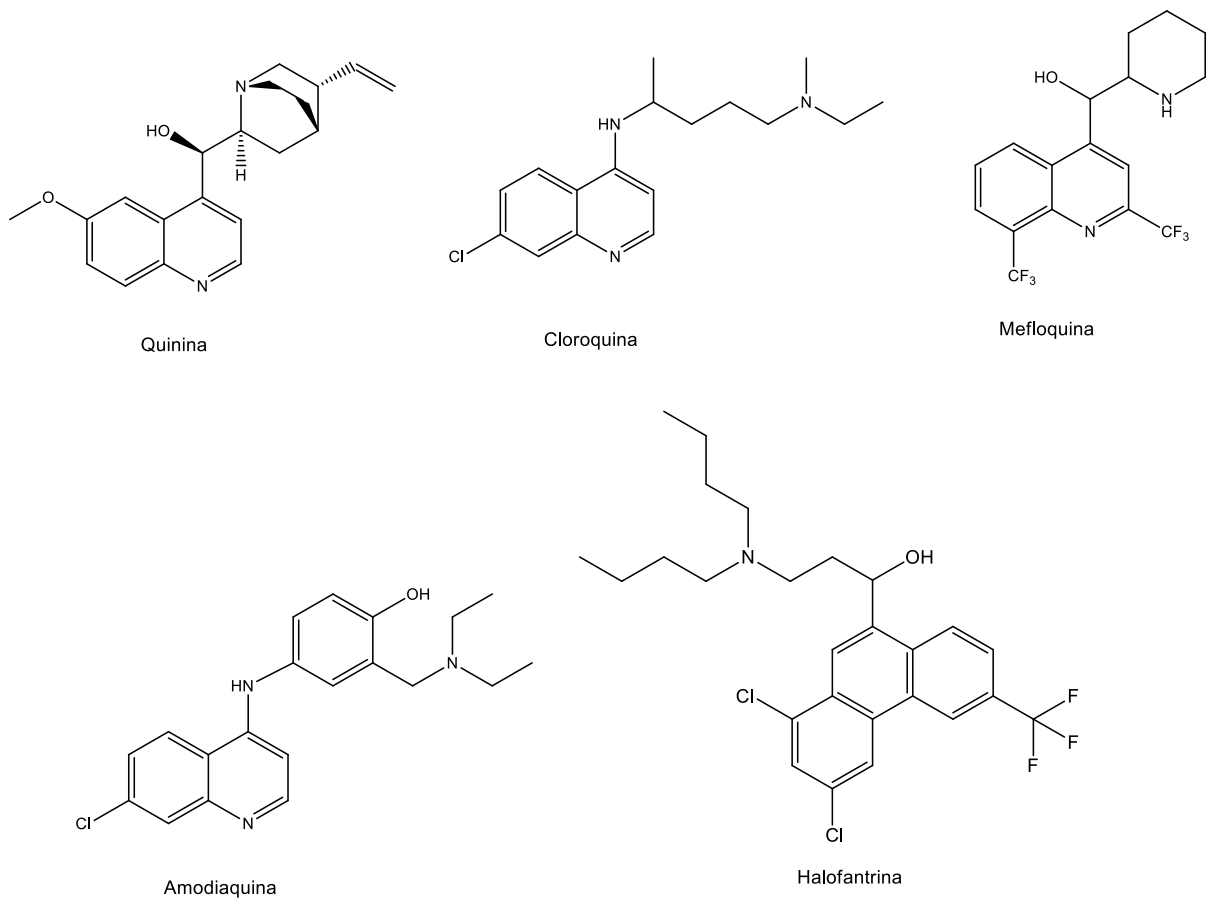
O primeiro fármaco empregado na quimioterapia da malária foi a quinina (Figura 5), um alcalóide quinolínico presente na casca de árvores do gênero *Cinchona* spp, (MESHNICK & DOBSON, 2001), que eram empregadas pelos índios peruanos. Em 1639, missionários jesuítas levaram cascas dessa planta para a Europa, onde elas se tornaram o tratamento principal para febres, tendo sido incluída na Farmacopéia Britânica. Ainda, foi apenas em 1820 que os químicos

franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou isolaram e identificaram o alcalóide quinina (Figura 5) como a substância ativa da casca de *Cinchona*. (RUSSELL et al., 1955; FRANÇA et al., 2008). Uma vez estabelecida sua estrutura (RABE et al., 1907), vários analógos deste alcalóide foram sintetizados, o que levou, inicialmente, à cloroquina (CQ), na década de 1940. A CQ, um antimalárico totalmente sintético, teve ampla aceitação pela sua eficiência e baixo custo, sendo usada no tratamento e na prevenção (GREGSON & PLOWE, 2005; KLEIN, 2013). A partir do fim da década de 1950 observou-se a emergência de resistência a CQ no Sudeste Asiático e na América do Sul, ocasionada pelo uso indiscriminado e em doses subterapêuticas. O uso em larga escala do sal cloroquinado criou um ambiente ideal para a seleção, sobrevivência e persistência de parasitos resistentes a CQ (PAYNE, 1988; VERDRAGER, 1995).

Devido à falta de medicamentos potentes e acessíveis para o tratamento da malária, a disseminação do parasito resistente a CQ se espalhou pela África por volta dos anos de 1980, levando ao aumento de duas a três vezes o número de mortes. (PETERSEN et al., 2011). Posteriormente, a CQ foi substituída pela combinação sulfadoxina/pirimetamina (SP), como primeira linha de tratamento da malária. No entanto, o parasito também se tornou resistente ao SP e se espalhou amplamente (NAIR et al., 2003; ROPER et al., 2003; BARNES et al., 2008).

Outras quinolinas foram sintetizadas a fim de substituir a cloroquina, como mefloquina, amodiaquina, e halofantrina (Figura 5), esquizonticidas sanguíneos com mecanismo de ação semelhante ao da cloroquina (KROGSTAD et al., 1992). A mefloquina requer menos que um décimo da dose de quinina (Figura 5) para o tratamento da malária (PALMER et al., 1993). No entanto, por ser tóxica, dispendiosa e selecionar rapidamente parasitos resistentes, atualmente o seu uso tem sido restrito (NEVIN et al., 2008).

**Figura 5- Estruturas da quinina e quinolinas sintéticas**

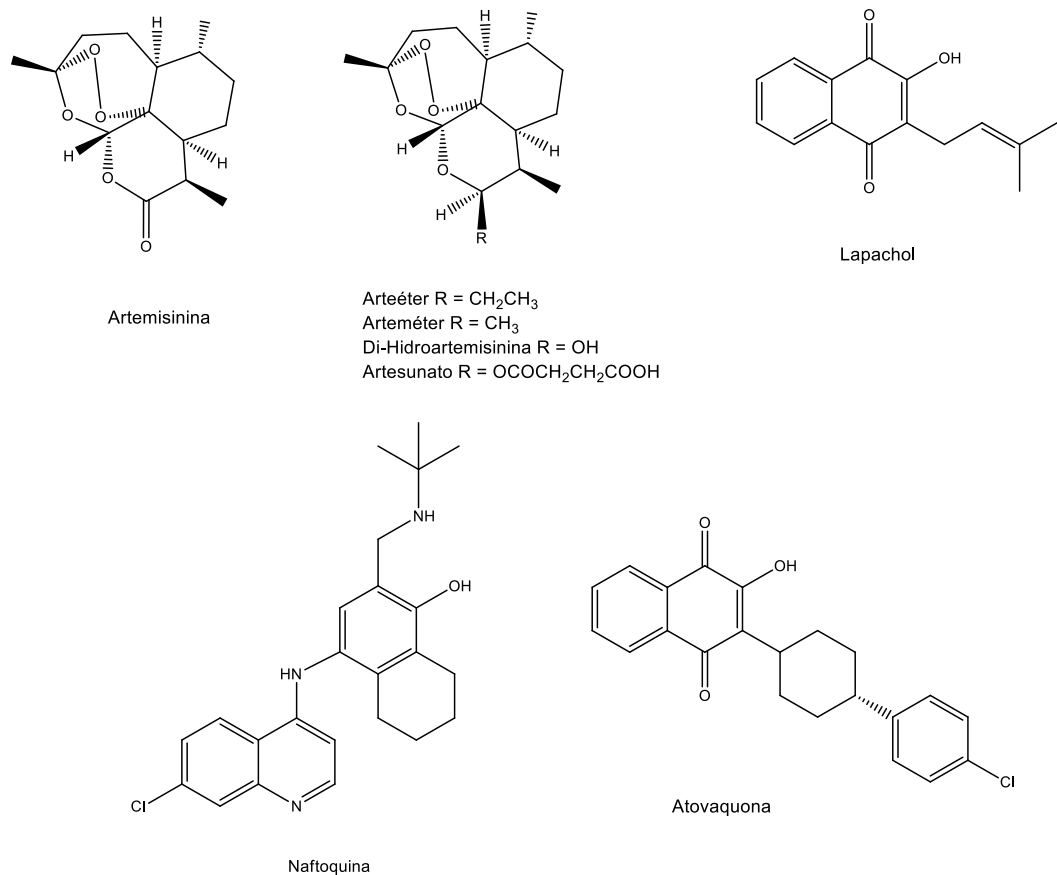


A artemisinina (Figura 6), uma lactona sesquiterpênica apresentando um grupo endoperóxido, substância ativa de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), foi isolada pela primeira vez, na década de 70, pelos chineses que relataram suas propriedades antimaláricas (BRUCECHWATT & QINGHAOSU, 1982). A partir da artemisinina, foram sintetizados análogos com variadas atividades farmacocinéticas, como o artesunato, a diidroartemisinina, o artéter e o arteméter (Figura 6), todos atualmente em uso clínico (WRIGHT, 2005; WHITE et al., 2014; ASHLEY & PHYO, 2018). A artemisinina foi introduzida na terapêutica antimalárica no final do século passado e a Pesquisadora chinesa Youyou Tu, coordenadora do projeto que levou ao seu desenvolvimento, foi laureada com o Prêmio Nobel de Medicina em 2015 (TU, 2016).

Desde 2001, a OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda a combinação da artemisinina e seus derivados semi-sintéticos com outros fármacos antimaláricos, como primeira linha de tratamento da malária aguda (WHO, 2001).

Estas formulações são chamadas de ACT (*Artemisinin-based Combination Therapy*). O objetivo destas formulações é reduzir a incidência de complicações, prevenindo o desenvolvimento de parasitos resistentes a múltiplos fármacos e reduzir a carga socioeconômica da infecção por malária (INTERNATIONAL ARTEMISININ STUDY GROUP et al., 2004; BOSMAN & MENDIS, 2007). O grande desafio das ACTs, no entanto, se deve ao fato da rápida resposta e resolução dos sintomas, o que leva os pacientes a encerrar o tratamento prematuramente (YEBOAH-ANTWI et al., 2001).

**Figura 6- Estruturas químicas da artemisinina e derivados, naftoquina, lapachol e atovaquona**



A artemisinina associada à naftoquina (Figura 6) constitui uma nova ACT que foi desenvolvida na China (WANG et al., 2004). Ao contrário da recomendação da OMS, de três dias de tratamento com ACTs, esta combinação deve ser administrada em dose única ou dividida em duas doses ao longo de 24 horas, tendo como objetivo melhorar a adesão do paciente ao tratamento (HOMBHANJE & HUANG, 2010). Recentemente, a resistência à artemisinina foi relatada no Sudeste

Asiático aumentando o alarme global para o tratamento e controle da malária (ASHLEY et al., 2014; TAKALA-HARRISON et al., 2015).

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol, que foi isolado por Paternó em 1882 (PATERNÓ, 1882) e ocorre em várias plantas das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae. Entretanto, sua frequência é maior na família Bignoniaceae, particularmente no gênero *Handroanthus* (sinon. *Tabebuia*), juntamente com outras quinonas heterocíclicas (HUSSAIN et al., 2007). O lapachol foi usado no tratamento de malária e febre no século XIX. Estudos iniciais com o lapachol demonstraram um baixo efeito curativo, em patos infectados com *P. lophurae* quando testado em 1943 (HOOKER & RICHARDSON 1948).

O uso de quinonas como antimaláricos foi explorado com o início da Segunda Guerra Mundial, quando houve uma escassez substancial no fornecimento de quinina (FIESER & RICHARDSON, 1948). Intensos esforços nos EUA levaram a milhares de substâncias estruturalmente diversas que foram investigadas, e algumas destas eram hidroxinaftoquinonas. A atividade antimalárica moderada quando administrada a patos infectados com *P. lophurae* resultou em um programa robusto de otimização que gerou mais de 300 quinonas, algumas das quais demonstraram maior atividade do que a quinina nos ensaios em patos. No entanto, quando administrados a pacientes com malária, essas substâncias mostraram-se desprovidas de qualquer atividade devido à fraca absorção e ao metabolismo rápido (FIESER et al., 1948a, 1948b). As tentativas de resolver esses problemas e produzir uma quinona ativa foram mal sucedidas. No entanto, pesquisas subsequentes levaram ao desenvolvimento da lapinona, que foi administrada por via intravenosa e mostrou atividade contra *P. vivax* (FAWAZ & HADDAD, 1951).

O uso de quinonas como agentes antimaláricos foi reinvestigado na década de 1980. O advento de sistemas de teste usando o parasito humano, *P. falciparum*, *in vitro* ou em macacos *Aotus*, proporcionou oportunidades para a realização de estudos mais significativos sobre a relação entre estrutura e atividade clínica. Um grupo dos Laboratórios de Pesquisa Wellcome se propôs a projetar uma quinona que tivesse tanto atividade potente em relação a *P. falciparum* quanto boa estabilidade metabólica em humanos. Várias 2-ciclo-hexil-3-hidroxi-1,4-naftoquinonas (HUDSON et al., 1985; HUDSON et al., 1986) foram sintetizadas e muitas destas demonstraram atividade contra *P. falciparum in vitro*. No entanto, apenas a atovaquona (LOOAREESUWAN et al., 1999; NAKATO et al., 2007) era

inerte a microsomas de fígado humano (HUDSON et al., 1991). A síntese química da atovaquona foi originalmente descrita em 1991 na patente de invenção norte-americana com o número 4981874 (PATENT USA - 4981874).

A atovaquona possui uma excelente atividade antimalárica, mas se liga extensivamente a proteínas plasmáticas e sua solubilidade em meio aquoso é praticamente nula (DRESSMAN & REPPAS, 2000). Para melhorar a biodisponibilidade do fármaco, foram preparados vários análogos da atovaquona e realizadas várias alterações, principalmente na cadeia lateral da naftoquinona, pois é conhecido que a modificação desta cadeia pode alterar a atividade do fármaco (FIESER & BERLINERE, 1948) e prevenir a resistência a este (EL HAGE et al., 2009). Embora ainda não exista um substituto para a atovaquona, quinonas antimaláricas estruturalmente relacionadas à mesma têm sido amplamente exploradas (HUDSON et al., 1985; DANOUN et al., 1999; BARAMEE et al., 2006; EL HAGE et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

Na literatura recente, vários novos compostos antimaláricos, em diferentes estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico foram descritos (ANTHONY et al., 2012; NQORO et al., 2017; ALVEN & ADERIBIGBE et al., 2019). Recentemente a tafenoquina (8-aminoquinolina), análogo da primaquina, foi aprovada pela FDA para o tratamento de malária por *P. vivax*, agindo nos hipnozoítos (formas adormecidas no fígado) e para a profilaxia da malária (FRAMPTON, 2018; CHEN & DAILY, 2019). No entanto, até o momento a atovaquona é única naftoquinona antimalárica em uso clínico (WELLS et al., 2015; MARELLA et al., 2019; NARULA et al., 2019; WAMAE et al., 2019).

## **2.2 O processo de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) de fármacos e medicamentos**

Até o final do século XVIII, os recursos terapêuticos eram obtidos principalmente a partir da natureza: vegetais, animais e minerais. Há registros do uso de muitas plantas medicinais há milhares de anos antes de Cristo. Neste período foram isoladas substâncias naturais que, ainda hoje, fazem parte do arsenal terapêutico, como morfina, digitálicos, quinina, cocaína, cafeína, e outras. Este paradigma, produtos naturais como base da indústria farmacêutica, se estendeu ainda até as primeiras décadas do século XIX quando o desenvolvimento de

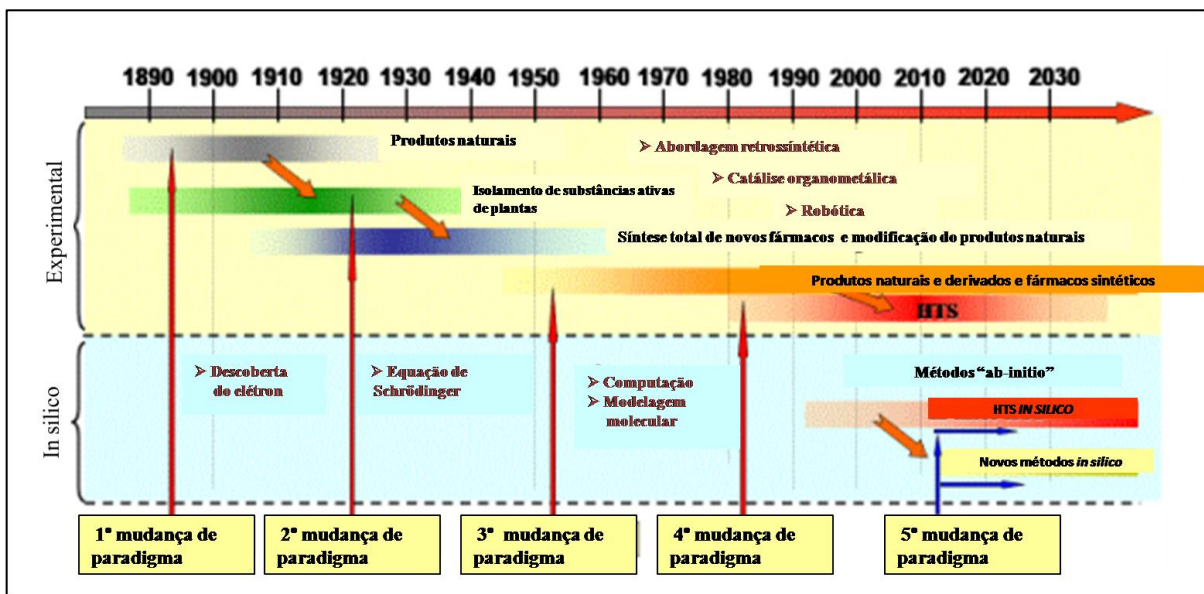
fármacos, como um esforço multidisciplinar e uma base industrial, começou quando a química atingiu um grau de maturidade e seus princípios e métodos começaram a ser aplicados em outras áreas, e a farmacologia se tornou uma disciplina científica bem estabelecida (NWAKA & RIDLEY, 2003).

Tradicionalmente os fármacos foram desenvolvidos, na primeira metade do século XX, testando compostos sintetizados em processos que consumiam muito tempo, e cujo processo incluía várias etapas. As substâncias promissoras eram então estudadas avaliando-se suas propriedades farmacocinéticas, metabolismo e potencial de toxicidade. A observação de efeitos adversos acontecia nesta fase, com a interrupção ou a reiniciação do processo. Esse era, e ainda é, um problema para os custos da pesquisa e desenvolvimento de qualquer empresa farmacêutica (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003).

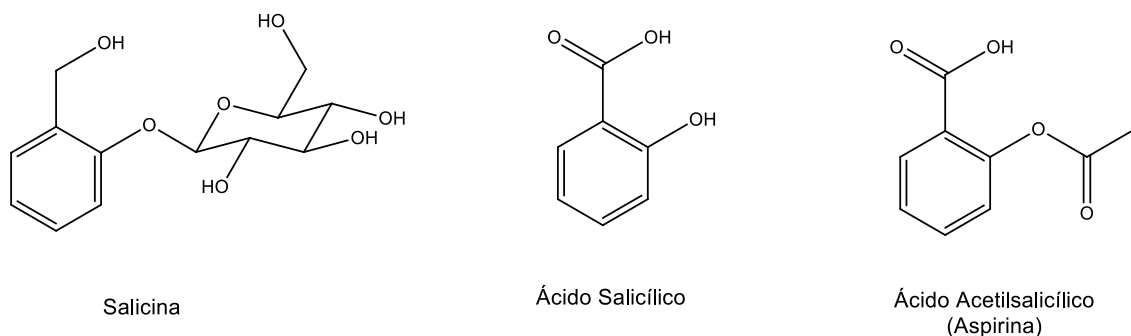
A indústria farmacêutica, ao longo do seu processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (PD&I), passou por várias inovações. A **primeira inovação**, ou **primeira mudança de paradigma** (Figura 7) foi a descoberta e produção do primeiro fármaco sintético (MUCSI & CSIZMADIA, 2009), a aspirina. A história do seu desenvolvimento está relacionada com o uso do salgueiro (*Salix alba*) como analgésico e antipirético sendo que seu uso na medicina tradicional data de mais de 3500 anos. Na Grécia, no século V a. C., Hipócrates, em uma de suas obras, relata seu uso para dores e febres. Em 1763, o reverendo inglês Edward Stone descreveu de forma científica os efeitos benéficos da casca do salgueiro contra febre, em 50 pacientes com malária (STONE, 1763). Em 1828, o alemão Johann Buchner, isolou a substância ativa da casca do salgueiro, de aspecto cristalino amarelado e sabor amargo, e a chamou de salicílna ou salicina (Figura 8) (VANE & BOTTING, 1992). No ano seguinte, o francês Henri Leroux, aperfeiçoou a técnica de extração e obteve 30g da salicina a partir de 1,5 kg de casca do salgueiro (RAINSFORD, 1984). Dois anos depois, Raffaele Piria (italiano) isolou o ácido salicílico, a partir da salicina, após hidrólise oxidativa (PIRIA, 1838). A síntese do ácido salicílico (Figura 8) foi realizada em 1859, pelo químico alemão Hermann Kolbe (KOLBE & LAUTEMANN, 1860) e sua produção em larga escala iniciou-se em 1894, na Alemanha, para o tratamento de dores em artrite crônica e febres reumáticas agudas. Apesar de bastante eficaz, o ácido salicílico apresentava irritações estomacais, além do gosto amargo. Em 1897, Felix Hoffman, químico (Laboratório Bayer, Alemanha), sintetizou o ácido acetil salicílico (Figura 8) com o

intuito de minimizar os efeitos adversos do ácido salicílico, bem percebidos em seu pai que sofria de reumatismo crônico (SNEADER, 2000). Em 1899, a aspirina (Figura 8) foi patenteada pela Bayer e tornou-se o analgésico mais comercializado no mundo. A descoberta de seu mecanismo de ação ocorreu em 1970, pelo farmacologista britânico John Vane, laureado com o prêmio Nobel de medicina. Demonstrou-se que o AAS inibia a liberação das prostaglandinas (VANE, 1971) e assim interferia no processo inflamatório e na dor. Atualmente, sabe-se que o AAS inibe a produção da enzima ciclooxygenase (COX) (FLOWER, 2003).

**Figura 7-** História (experimental e *in silico*) dos marcos e estratégias associados com a investigação farmacêutica em função da época para cada paradigma. As setas vermelhas denotam anos aproximados das descobertas e desenvolvimentos metodológicos (MUCSI & CSIZMADIA, 2009 com modificações)



**Figura 8-** Estruturas químicas da salicina, do ácido salicílico, e do ácido acetil salicílico (aspirina)



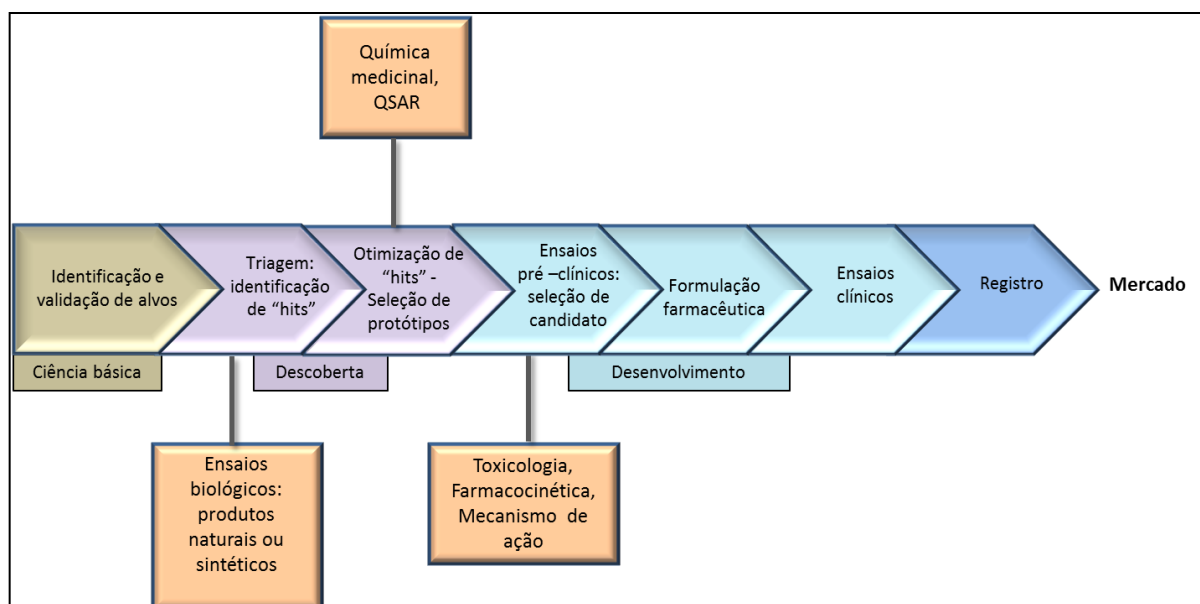
Durante a primeira metade do século XX, a pesquisa de fármacos foi marcada pelas inovações tecnológicas com o desenvolvimento de novas metodologias químicas, o que permitiu o estudo e modificações de substâncias ativas isoladas. A penicilina foi descoberta em 1929, por Alexander Fleming (FLEMING, 1929), e em 1938 E. Chain, Howard Florey e seus colaboradores (CHAIN et al., 1940) isolaram o metabólito produzido pelo fungo *Penicillium notatum* capaz de lisar bactérias do gênero *Staphylococcus*. Com a descoberta de Alexander Fleming, abriam-se as portas de um novo mundo, com o surgimento de uma grande indústria que passou a se dedicar à produção de penicilina e outros antibióticos, como as sulfonamidas (DOMAGK, 1935), empregados no tratamento de tuberculose, pneumonia, meningite, sífilis, entre outras infecções. A descoberta da penicilina e das sulfonamidas marcam a **segunda mudança de paradigma** da indústria farmacêutica (MUCSI & CSIZMADIA, 2009).

Durante uma guerra, o inimigo não é apenas o país adversário. Muitas doenças acabam provocando mortes de soldados. E, por esse motivo, é importante que os países envolvidos nesses conflitos invistam no desenvolvimento de novos fármacos. O que, inicialmente, visava apenas reduzir o número de soldados mortos durante a guerra, aos poucos foi se tornando um avanço extremamente importante para a medicina. Na primeira metade do século XX, com o final da Segunda Guerra Mundial, foi efetuada a síntese de um grande número de substâncias com efeitos farmacológicos. A quinina foi amplamente utilizada durante a Segunda Guerra em que muitos soldados contraíam a malária e várias outras doenças. A quinina era usada para tratar malária, dispepsia, neuralgia, fibrilação cardíaca. Sua estrutura constituiu um protótipo para a síntese de outras quinolinas como a cloroquina, um eficiente antimalárico (COATNEY, 1963). Foi, também, após a guerra, que foram descobertos inibidores da enzima conversora da angiotensina, levando a produção de anti-hipertensivos como o captopril, enalapril e lisinopril. Neste período, logo após a Segunda Guerra Mundial, a revolução no pensamento científico, associado em particular com o desenvolvimento da química trazendo transformações para a pesquisa farmacêutica marca a **3ª mudança de paradigma** (MUCSI & CSIZMADIA, 2009), que levou a produção de fármacos sintéticos em larga escala associada à comprovação de efeitos farmacológicos.

Até o final de 1950, os efeitos biológico-farmacológicos dos fármacos produzidos resultaram de descobertas acidentais e experimentos conduzidos

aleatoriamente sem nenhum estudo bioquímico prévio. Posteriormente, os progressos na química, na farmacologia, na microbiologia e na bioquímica tornaram possível moldar o curso da descoberta de fármacos e chegar a um nível em que os novos medicamentos não são mais gerados unicamente pela imaginação dos químicos, mas passaram a ser de caráter interdisciplinar, compreendendo conhecimentos químicos e biológicos. Este diálogo, centrado em mecanismos bioquímicos de ação, decorre da compreensão da estrutura e função biológica dos fármacos e deu origem à criação de novas estruturas químicas, o que marca a **4ª mudança de paradigma** (MUCSI & CSIZMADIA, 2009). Neste período, a biologia molecular exerceu uma profunda influência na descoberta de fármacos, permitindo que o conceito de informação genética fosse tratado em termos bioquímicos e químicos. E com o surgimento das técnicas de triagem biológica automatizada em larga escala (HTS -*High Throughput Screening*) foi possível testar elevado número (milhares) de substâncias em um número expressivo de alvos biológicos (proteínas alvo) o que passou a ter papel de destaque entre as estratégias modernas na identificação (descoberta) de novas substâncias bioativas (Figura 9) (DREWS, 2000).

**Figura 9- Diagrama de fluxo de PD&I de fármacos antes das metodologias computacionais**



A automação dos ensaios biológicos em larga escala, nas grandes indústrias farmacêuticas, começa com a identificação e validação dos alvos relacionados à

indicação pretendida para os fármacos de interesse. Segue-se a triagem (*screening*) de alto desempenho (HTS) de milhares de substâncias químicas identificando-se substâncias bioativas (*hits*) que, submetidas a novos ensaios biológicos, poderão ser definidas como protótipos ou candidatos ao desenvolvimento. Um novo conceito surge neste período, a dos protótipos (*lead molecules*) que terão suas estruturas otimizadas quimicamente e as substâncias resultantes serão ensaiadas até a definição dos possíveis candidatos a desenvolvimento os quais serão submetidos a estudos pré-clínicos. No estágio de desenvolvimento, são também desenvolvidas formulações farmacêuticas e realizados os ensaios clínicos Fases I, II e III. O registro é solicitado e, quando aprovado, tem início a Fase IV dos ensaios clínicos e a comercialização (NWAKA & RIDLEY, 2003; BARREIRO, 2009).

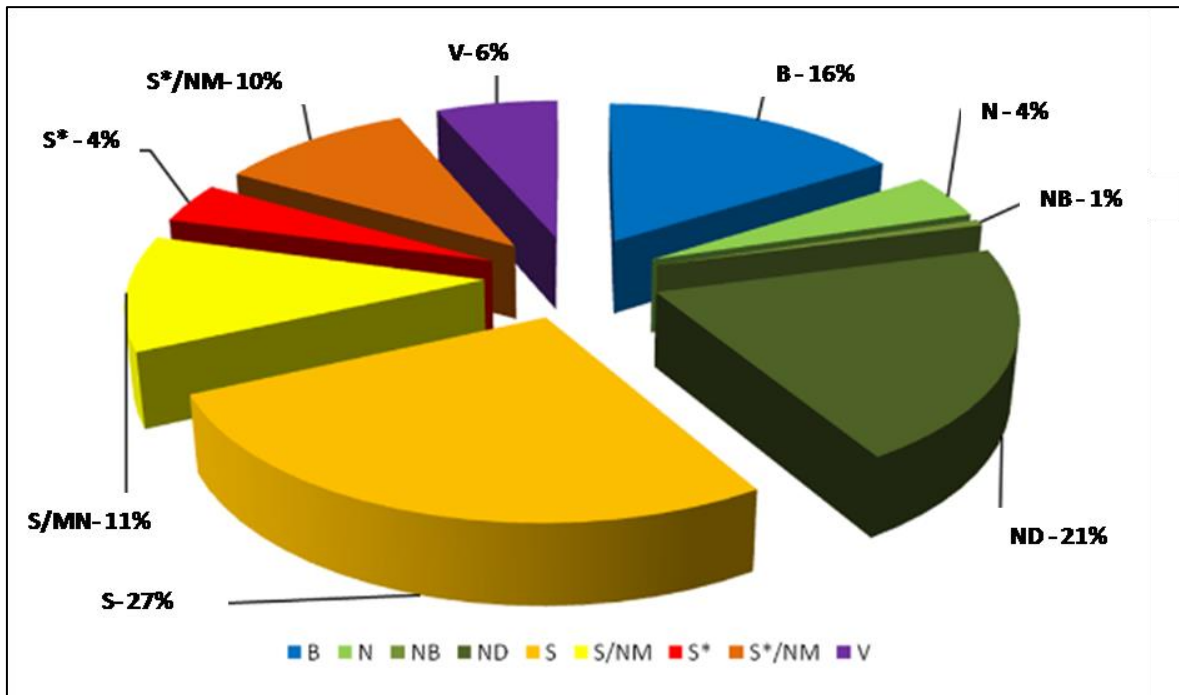
As tecnologias de HTS (*High throughput screening*), a síntese combinatorial e o conhecimento sobre alvos moleculares resultaram no crescimento marcante do número de substâncias ativas identificadas (*hits*) e no número de publicações na área. No entanto, o número de protótipos (*leads*) ou candidatos a desenvolvimento caiu significativamente, o que tem sido atribuído à ampla exploração do paradigma um receptor - um fármaco (VERKMAN, 2004).

Nas últimas décadas do século XX, com os problemas de iatrogenia relacionados a fármacos sintéticos, especialmente a partir de 1980, houve um progresso significativo em relação às pesquisas de produtos naturais. As plantas passaram novamente a ocupar um papel de destaque por um grande contingente da população de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Segundo a OMS, em todo o mundo, a medicina tradicional é o principal pilar da prestação de serviços de saúde ou serve como complemento. Em seu recente documento denominado “Políticas de Estratégias da OMS 2014-2023” (QI, 2013), a OMS ressalta a importância de oferecer a população uma medicina tradicional de qualidade, com segurança e eficácia comprovadas, contribuindo assim para o objetivo de garantir que todas as pessoas tenham acesso aos cuidados. A Fitoterapia tem sido uma fonte de medicamentos, e ao longo dos anos têm sido cada vez mais utilizada para tratar diversas desordens: doenças parasitárias (amebíase, giardíase, malária, leishmaniose, tripanossomíase e acantamebíase) (DERDA & HADAS, 2015); asma (SHERGIS et al., 2016), diabetes (GOVERNA et al., 2018) doenças periodontais (MORO et al., 2018), pancreatite aguda (TARASIUK & FICHNA et al., 2019), hipertensão (BALOGUN & ASHAFI, 2019).

Muitas substâncias orgânicas conhecidas provêm da natureza. O Reino Vegetal tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. As plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

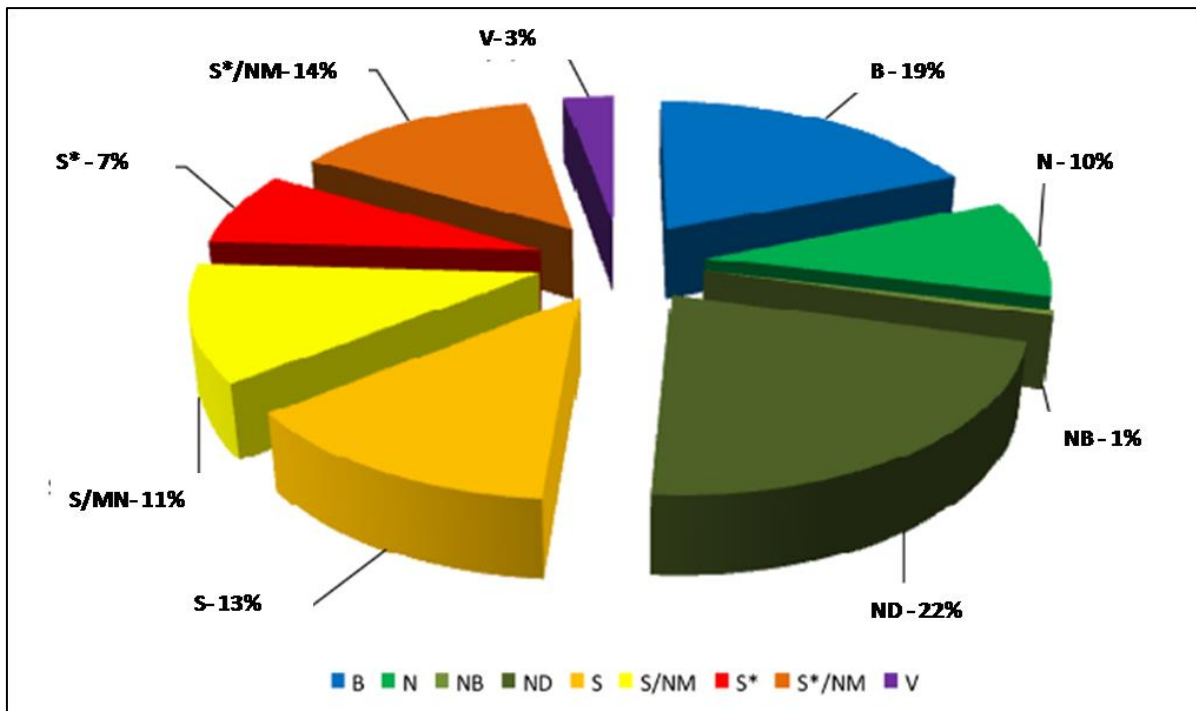
Em uma recente revisão sobre fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) entre os anos de 1981 e 2014, Newman e Cragg (NEWMAN & CRAGG, 2016) mostram que produtos naturais e produtos direta ou indiretamente relacionados a estes desempenham papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (Figura 10). Estes autores mostraram que, naquele período, 67% de todos os novos fármacos aprovados provinham de produtos naturais e seus derivados, ou mímicos sintéticos de produtos naturais, sendo que esse grupo representou 60% dos novos fármacos antiparasitários. Os dados apresentados pelos mesmos autores mostram ainda que, considerando novos fármacos aprovados pelo FDA e por entidades reguladoras de outros países, no caso dos antitumorais, foram aprovados 174 novos fármacos, dos quais 84% eram relacionados direta ou indiretamente com produtos naturais (Figura 11).

**Figura 10- Novos fármacos aprovados pelo FDA no período de 1981-2014**



**Legenda:** B (macromoléculas biológicas) N (produtos naturais inalterados), NB (fármacos botânicos – mistura), ND (derivados de produtos naturais), S (fármacos sintéticos), S\* (fármacos sintéticos com farmacóforo de produtos naturais), /NM (mímicos de produtos naturais) V (vacinas) Fonte: Adaptado de NEWMAN & CRAGG, 2016

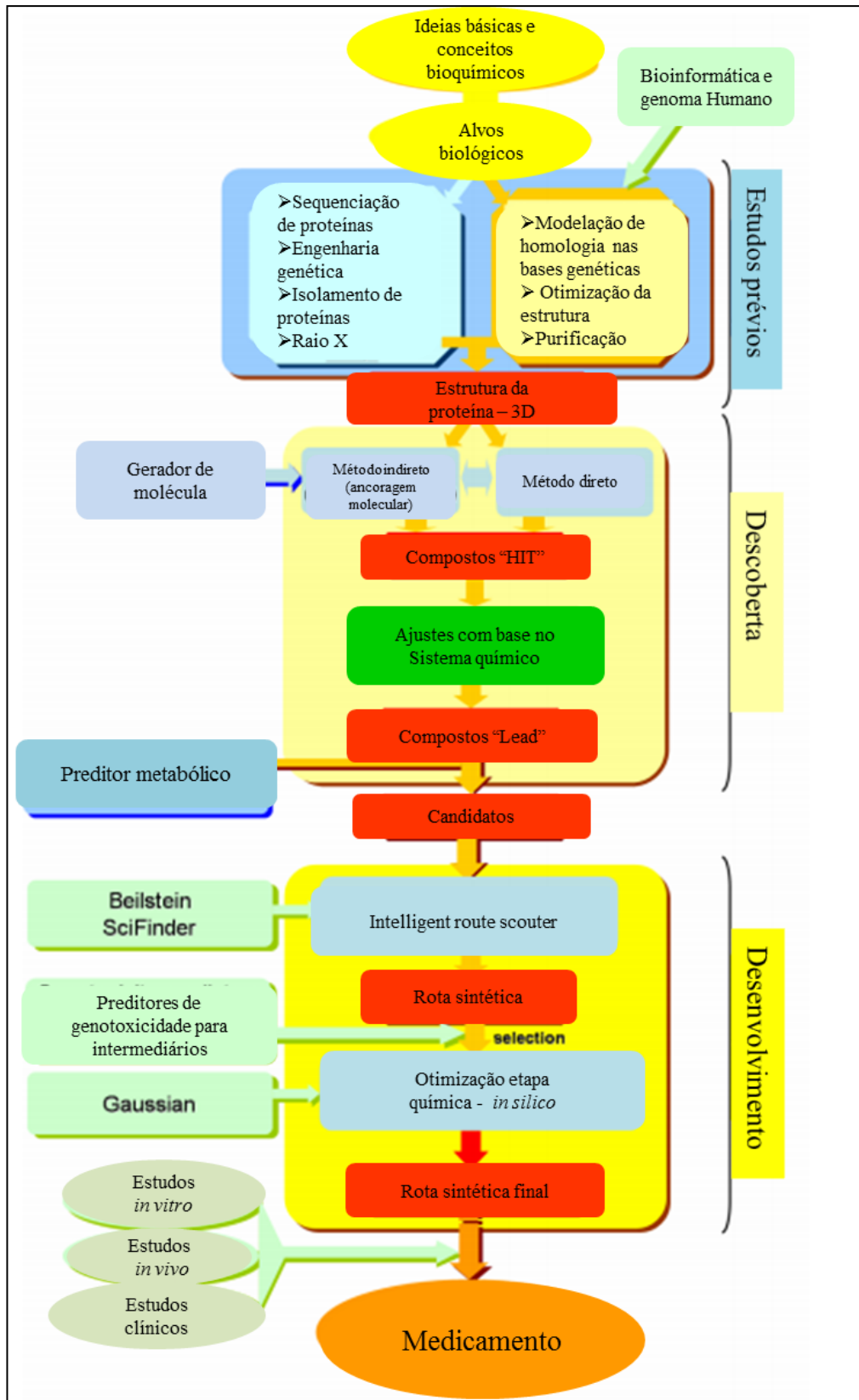
**Figura 11- Novos fármacos anticâncer aprovados pelo FDA no período de 1981-2014**



**Legenda:** B (macromoléculas biológicas) N (produtos naturais inalterados), NB (fármacos botânicos – mistura), ND (derivados de produtos naturais), S (fármacos sintéticos), S\* (fármacos sintéticos com farmacóforo de produtos naturais), /NM (mímicos de produtos naturais) V (vacinas) Fonte: Adaptado de NEWMAN & CRAGG, 2016

Estes primeiros anos do século XXI, registram-se progressos crescentes na biologia molecular bem como da química teórica e computacional (Figura 12) sendo este período caracterizado como a mudança para o **5º paradigma** (MUCSI & CSIZMADIA, 2009). As ciências moleculares geram conhecimentos que possibilitam definir mais precisamente as doenças, começando pela definição genética e a análise funcional de alvos de modo a viabilizar fármacos mais seletivos para tratamentos mais específicos para atender, inclusive, variações genéticas encontradas em diferentes populações humanas (Farmacogenética). A bioinformática de alto desempenho tem um papel relevante em modelagem molecular, *screening* virtual, ADME/Tox *in silico*, simulações de como os fármacos agem em organismos, em determinados órgãos e no nível sub-celular, bem como contribuir para o planejamento de ensaios subsequentes com maior precisão (RONCAGLIONI et al., 2013).

Figura 12- Diagrama de PD&I, incluindo métodos computacionais (MUCSI & CSIZMADIA, 2009 com modificações)



## 2.3 Toxicologia

A Toxicologia é uma ciência multidisciplinar que abrange uma vasta gama de conhecimentos científicos, relacionando-se estritamente com diversas áreas (biologia molecular, farmacologia, bioquímica, bioinformática, e química medicinal) uma vez que, sem os conhecimentos inter-relacionados, dificilmente se poderia atingir seus objetivos: prevenir, diagnosticar e tratar o homem que eventualmente se envolveu com substâncias químicas genericamente denominadas como toxinas, tóxicos ou xenobióticos; e também as diversas doenças, infecções e inflamações. No contexto da pesquisa de novos fármacos, a toxicologia busca estudar os efeitos nocivos das substâncias candidatas, e das interações medicamentosas entre os fármacos decorrentes do uso inadequado ou da suscetibilidade individual (PASSAGLI, 2009).

### 2.3.1 Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade *in silico*

Um dos grandes desafios da ciência moderna é o desenvolvimento de métodos para PD&I de novos fármacos, com o emprego do menor número possível de animais (DASTON et al., 2015; GOCHT et al., 2015). À medida que a capacidade de triagem biológica e síntese química aumentam drasticamente, surge também a necessidade de informações sobre os candidatos a fármacos, tais como: absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e dados de toxicidade (em conjunto, dados de ADMET ou ADME-TOX) (BERGSTRÖM et al., 2016).

Há, cada vez mais, uma necessidade crescente de boas ferramentas para prever essas diversas propriedades, buscando atender principalmente a dois objetivos principais: primeiro, no estágio de *design* e construção de bibliotecas de substâncias, reduzindo o risco de descoberta de falhas tardiamente; e segundo, otimizar as triagens e os testes, levando em consideração as substâncias mais promissoras (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003).

Dentro desta nova perspectiva, a utilização de metodologias *in silico* representam um avanço na predição de diversas propriedades, e consiste na aplicação de tecnologias computacionais a partir das características físico-químicas (propriedades lipofílicas, solubilidade, pka, ligações de hidrogênio, e permeabilidade) e estruturais das substâncias químicas (SANTOS, 2015).

A indústria farmacêutica utiliza a metodologia *in silico* há várias décadas na pesquisa de novos fármacos (RONCAGLIONI et al., 2013). Há muitos tipos de modelos *in silico*, que utilizam alvos em diferentes níveis, podendo abordar: o corpo como um todo; órgãos específicos; ou determinados processos biológicos ou químicos, tais como a ligação a determinado receptor. Um grande número de metodologias *in silico* são usadas na toxicologia. Os principais métodos computacionais incluem modelos de relações estrutura-atividade (SAR *Structure–Activity Relationships*) e QSAR (*Quantitative Structure–Activity Relationships*), e modelagem molecular (RONCAGLIONI & BENFENATI, 2008).

Durante a etapa de otimização de um possível protótipo pretende-se através de modificações planejadas e com o auxílio de técnicas definidas, identificar diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado. Na etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva-se o melhoramento de suas propriedades ADMET e características físico-químicas (LIMA, 2007).

### **2.3.1.1 PreADMET**

PreADMET é um programa da Web desenvolvido em resposta à necessidade de uma predição rápida de dados de potenciais fármacos e as suas propriedades ADME/Tox (SUNG et al., 2006).

#### **2.3.1.1.1 Predição de ADME**

Durante o processo PD&I (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Fármacos) em muitos casos, uma nova substância ou protótipo age com alta afinidade e especificidade em um alvo desejado de um fármaco. No entanto, a aplicação médica deste protótipo será grandemente influenciada pela sua absorção, distribuição, metabolismo, excreção e parâmetros de toxicidade (ADME-Tox). O destino do novo protótipo no organismo humano também deve ser determinado. Por isso, estudos preditivos devem ser realizados o mais cedo possível no processo de PD&I, a fim de economizar tempo, esforço, e recursos financeiros (SZAKÁCS et al., 2008).

As ferramentas computacionais baseadas em cálculos da estrutura da molécula estão disponíveis para facilitar o desenvolvimento racional de *hits*, *leads* e candidatos a fármacos com perfis físico-químicos favoráveis para absorção oral. Essas ferramentas auxiliam no planejamento de moléculas com propriedades aceitáveis de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) (MORPHY, 2006).

A administração oral é a via mais desejável de administração de um fármaco, no caso da malária. Portanto, é importante desenvolver fármacos que possam ser absorvidos efetivamente através do epitélio intestinal (mucosa). Existem vários mecanismos conhecidos de absorção de fármacos intestinais que constitui o principal mecanismo de absorção por difusão passiva via gradiente de concentração. A difusão passiva pode ocorrer entre junções celulares (transporte paracelular) ou através do citoplasma (transporte transcelular). As substâncias lipofílicas podem atravessar facilmente a membrana plasmática e, portanto, são principalmente transportados de forma transcelular. As substâncias hidrofílicas são relativamente impermeáveis em toda a membrana celular e, portanto, serão transportados predominantemente através da via paracelular (LI et al., 2001).

O programa computacional PreADMET pode prever a porcentagem de absorção intestinal humana (%AIH). Os dados de absorção intestinal humana são a soma da biodisponibilidade e absorção avaliada a partir da proporção de excreção ou excreção cumulativa na urina, bile e fezes. A absorção intestinal humana de fármacos é muito importante para identificar potenciais candidatos a fármacos (YEE, 1997; ZHAO et al., 2001).

Além da difusão passiva, algumas substâncias, como os aminoácidos e a glicose, são transportadas ativamente por transportadores específicos, um processo que requer gasto de energia. As proteínas de transporte são encontradas na maioria dos órgãos envolvidos com a absorção e eliminação de substâncias endógenas e xenobióticos, incluindo os medicamentos (AYRTON & MORGAN, 2001). Um dos transportadores mais bem estudados é o transportador na membrana plasmática chamada P-glicoproteína (gpP), um membro da família de transportadores de ATP (ABC – *ATP Binding Cassette*). Foi identificado primeiro como o transportador responsável pela resistência a múltiplos fármacos (MDR – *Multiple Drug Resistance*) observado em agentes antitumorais. Uma melhor compreensão das relações entre a

estrutura dos aglutinantes gpP (substrato ou inibidor) foi obtida usando QSAR, bem como a partir de modelos de farmacóforos e proteínas (WIESE & PAJEVA, 2001).

Uma característica importante do epitélio intestinal é que algumas substâncias que entram no citoplasma das células mucosas podem ser transportadas de volta ao lúmen intestinal (efluxo). Este processo de efluxo é principalmente uma função do transportador gpP. Os substratos de gpP entram nas células da mucosa intestinal por meio da difusão passiva, e uma porção do substrato é transportada para fora da célula e dentro do lúmen intestinal por gpP. A inibição de gpP com um inibidor aumentaria, portanto, a absorção intestinal de substratos de gpP (HIDALGO et al., 1989).

O PreADMET é capaz de prever se uma determinada substância inibe ou não a glicoproteína P (gpP), que é expressa na superfície celular, e tem um papel fundamental na absorção e excreção de substâncias químicas; e que, no caso de fármacos, está relacionada com a resistência a múltiplas drogas (LUND et al., 2017).

A permeabilidade das substâncias está diretamente relacionada à lipofilia e negativamente relacionada à capacidade de ligação de hidrogênio e ao tamanho molecular (CAMENISH et al., 1998; PALM et al., 1998). Por isso, moléculas altamente polares e maiores geralmente apresentam absorção e permeabilidade limitadas (MATSSON et al., 2016). Para os fármacos lipofílicos, embora a permeabilidade intrínseca à membrana seja frequentemente elevada, outros mecanismos celulares desempenham um papel na taxa de transporte e na facilidade das substâncias altamente lipofílicas atravessarem as células. A ligação a estruturas da membrana, a ligação não específica às proteínas intracelulares, bem como a ligação específica às proteínas de transporte ligadas à membrana responsáveis pelo efluxo, podem se tornar determinantes significativos da taxa e extensão do transporte celular (MATEUS et al., 2013). O programa PreADMET é capaz de prever se as substâncias tem ligações fortes ou fracas a proteínas plasmáticas.

O sistema nervoso central (SNC) é uma zona privilegiada que, normalmente, é protegida por três elementos estruturais: a barreira hematoencefálica (BHE) com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (BSLCR), formada pelo plexo coróide e a membrana aracnóide com os vasos sanguíneos e o líquido cefalorraquidiano; e a barreira e sangue –

aracnóide (BSA), que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnóide subjacente a dura-máter das meninges (CORREALE & VILLA, 2009)

Outra predição possível pelo PreADMET é a se a substância penetra ou não a Barreira HematoEncefálica (BHE). A BHE é uma estrutura que impede e/ou dificulta a passagem de substâncias do sangue para o sistema nervoso central, tais como anticorpos, complemento e fatores de coagulação. A BHE é formada por células endoteliais que ficam alinhadas com os capilares, impedindo ou dificultando a passagem de substâncias do sangue para o tecido nervoso (AJAY et al., 1999; MA et al., 2005).

Nas áreas farmacêutica, de cosméticos e na agroquímica, é importante prever a taxa de permeabilidade cutânea (SINGH & SINGH, 1993) como um parâmetro crucial para a entrega transdérmica de medicamentos e também para a avaliação de risco de todos os produtos químicos que entram em contato com a pele acidentalmente ou não. A permeabilidade cutânea é outra propriedade que pode ser prevista pelo programa PreADMET.

Numerosos métodos de ensaios *in vitro* são utilizados para a seleção de fármacos visando avaliar a absorção intestinal de candidatos a fármacos. Entre eles, o modelo de células Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano) e o modelo de células MDCK (célula epitelial do túbulo distal de rim de cão) são recomendados como um modelo *in vitro* confiável para a predição da absorção oral de substâncias químicas. Embora as células Caco-2 tenham origem cancerígena, elas adquirem muitas características das células intestinais absorventes durante a cultura, como a estrutura dos microvilos, as enzimas de hidrólise e os sistemas de transporte mediados por portadores de açúcares, aminoácidos e várias drogas (BLAIS et al., 1987; HIDALGO et al., 1989). Para a predição da permeabilidade por células Caco-2, em PreADMET, são consideradas as estruturas químicas a pH 7,4, uma vez que a permeabilidade das células Caco-2 e a permeabilidade das células MDCK são medidas a cerca de pH 7,4 (YAZDANIAN, 1998; YAMASHITA et al., 2000).

Os citocromos P450 (CYPs) constituem uma grande família de hemoproteínas envolvidas em muitas reações de redução e oxidação em moléculas endógenas e xenobióticos de vários tamanhos (BRUNO & NJAR, 2007). Esta família de enzimas é composta principalmente de monooxigenases que estão presentes em vários animais, plantas, fungos, bactérias, protistas, e também em alguns vírus (LAMB et al., 2009). Mais de 21.000 CYP foram identificados até o momento,

subdivididos em 18 famílias incluindo mais de 50 enzimas que são encontradas em humanos (CHUN & KIM, 2003). PreADMET é capaz de prever se as substâncias pesquisadas são substratos ou não para algumas das enzimas do citocromo P450, que atuam no metabolismo de substâncias químicas e que são responsáveis por interações medicamentosas.

A solubilidade é outro parâmetro físico-químico importante no processo de PD&I. Para passar por membranas biológicas, uma substância química deve ser solúvel em água. Se a solubilidade for muito baixa, uma substância administrada pela via oral será excretada sem a possibilidade de passagem pelo trato gastrointestinal e o sistema cardiovascular (CALDEIRA et al., 2017). A solubilidade de uma substância é geralmente representada como  $\log S$ , onde  $S$  é a concentração da substância em mol/L. Na prática, cerca de 85% dos fármacos têm valores de  $\log S$  entre - 1 e - 5 e praticamente nenhum tem valores abaixo de - 6. Valores acima de - 1 não são problemáticos, embora sejam frequentemente associados a moléculas altamente polares, como açúcares e peptídeos pequenos que podem ter baixa permeabilidade à membrana na ausência de transporte ativo. Empiricamente, é evidente que a faixa do  $\log S$  de - 1 a - 5 para a maioria dos fármacos representa a polaridade necessária para uma solubilidade aquosa aceitável e a hidrofobia necessária para passagem pelas membranas (HUUSKONEN et al., 1998; JORGENSEN & DUFFY, 2000).

A lipofilia relaciona-se com a capacidade das substâncias se dissolverem em soluções lipofílicas (não aquosas). A lipofilia é necessária para que as substâncias penetrem através das membranas biológicas e, na prática, a lipofilia é tipicamente medida como a distribuição das substâncias entre uma fase não aquosa (*n*-octanol) e aquosa (água). O resultado é expresso como um logaritmo de base 10 das proporções de concentração entre essas fases (coeficiente de partição),  $\log P$ . Um valor  $\log P$  desejado (coeficiente de partição octanol-água) não deve ser superior a 5 (também parte da chamada regra-de-cinco de Lipinski;  $\log P 5 = 1$ : 100.000 diferença de concentração entre as fases de água e octanol) (LIPISKI et al., 1997; OPREA, 2002).

Outro parâmetro para lipofilia é o coeficiente de distribuição,  $\log D$  que leva em consideração as moléculas na sua forma ionizada e não ionizada e, portanto, a medição é feita a diferentes valores de pH. Para substâncias não ionizáveis,  $\log P = \log D$  a qualquer pH e, por outro lado,  $\log P$  é a partição octanol-água para a forma

neutra (não ionizada) da substância. Entre os diferentes valores de pH, tipicamente o mais interessante é pH 7,4, o valor do pH fisiológico.

Com o advento da química combinatória do HTS surgiu uma demanda crescente de métodos rápidos para a avaliação precisa do logP e outras propriedades moleculares relevantes. Isso se tornou necessário para alcançar a máxima diversidade de bibliotecas combinatórias com um número mínimo de substâncias. Os esforços de químicos teóricos e computacionais levaram a vários métodos computacionais úteis para estimar os valores de log P de substâncias orgânicas (GHOSE & CRIPPEN, 1987; BODOR & BUCHWALD, 1997). Entre estes, os métodos CLOGP7 e ALOGP são os mais utilizados, mas são fundamentalmente diferentes. O método CLOGP7 foi simplesmente o primeiro a ser implementado em software comercialmente disponível. O método ALOGP (GHOSE & CRIPPEN, 1987; VISWANADHAN et al., 1989) é um desenvolvimento posterior, mas é mais fácil de aplicação computacional. Não só produz estimativas mais precisas dos valores de log P, como também são aplicáveis em várias áreas relacionadas de química computacional e medicinal, incluindo aplicações 3D-QSAR, capazes de prever superfícies moleculares lipofílicas e avaliar interações hidrofóbicas em complexos proteína-ligante (VISWANADHAN et al., 1996)

#### **2.3.1.1.2 Predição de propriedades toxicológicas**

A genômica, a proteômica e a bioinformática representaram um grande avanço para o processo PD&I, possibilitando identificar e validar proteínas alvo. Na indústria farmacêutica, quando o alvo é identificado, a pesquisa segue para a identificação do farmacóforo - um fragmento estrutural que se liga ao alvo e exerce um determinado efeito, com uma potência terapêutica adequada. Definida essa estrutura, a otimização do protótipo (*lead*) é iniciada. A química computacional e a triagem por HTS permitem, então programar (ou desenhar) novas moléculas e a otimização de estruturas objetivando o aumento da potência de um candidato a desenvolvimento. A otimização de *leads* é realizada em diversas fases e, no final, as estruturas geradas, podem ser estruturalmente diversas da estrutura de partida. A biblioteca química obtida pode conter vários milhares de novas estruturas. A biblioteca de substâncias desenhadas é examinada experimentalmente *in silico*, pela sua viabilidade de desenvolvimento, através do uso de técnicas experimentais

rápidas que medem fatores como estabilidade, solubilidade, permeabilidade e toxicidade. Após essas determinações, as melhores moléculas são selecionadas da biblioteca para desenvolvimento posterior (NORINDER & BERGSTRÖM, 2006).

O aumento do número de novas estruturas geradas a cada ano não resultou no aumento proporcional de novos medicamentos comercializados (MULLARD, 2015). Isso foi atribuído, entre outros fatores, a propriedades farmacocinéticas precárias dos candidatos a fármacos. Por isso, são altamente desejáveis filtros de triagem seguros e eficientes para fatores como absorção, distribuição, metabolismo, eliminação / excreção e toxicidade (ADMET) (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003)

A toxicidade dos fármacos é uma propriedade de importância crucial. Um medicamento desejável deve apresentar índice terapêutico elevado, isto é, o nível plasmático necessário para exercer um efeito tóxico sendo significativamente maior do que o necessário para a eficácia terapêutica. O potencial de toxicidade continua a ser a propriedade mais imprevisível de um fármaco. A toxicidade humana continua a ocorrer em ensaios clínicos de candidatos a fármacos que, aparentemente, foram seguros nos ensaios pré-clínicos, levando a uso restrito e, em alguns casos, a retirada do mercado (LI, 2001).

A toxicidade é, sem dúvida, a propriedade de fármacos mais difícil de detectar adequadamente, pois pode ser específica de um determinado órgão, de cada espécie e pode envolver vários fatores genéticos individuais do hospedeiro e a dosagem, todos os quais não podem ser modelados de forma adequada experimentalmente. No entanto, como a hepatotoxicidade é uma manifestação importante da toxicidade do fármaco, e sabe-se que a toxicidade pode ser influenciada pelo metabolismo do fármaco, a triagem da toxicidade usando hepatócitos intactos é uma abordagem adotada em muitos laboratórios de descoberta e desenvolvimento de fármacos (LI, 1997).

Existem modelos *in silico* para uma grande diversidade de fenômenos de toxicidade (KAR & ROY, 2010). Entre esses, a genotoxicidade e a carcinogenicidade, embora muito complexas, estão entre as mais investigadas. No entanto, a disponibilidade de um modelo é diferente da confiabilidade da previsão do mesmo. Além disso, a possibilidade de aplicar satisfatoriamente um modelo a um produto farmacêutico de interesse pode depender da disponibilidade de dados toxicológicos para moléculas quimicamente relacionadas a essa entidade. Os

modelos *in silico* para efeitos específicos em determinados órgãos são, geralmente, focados em produtos farmacêuticos existentes, uma vez que a disponibilidade de dados é mais abundante para moléculas semelhantes a fármacos. Entre eles, a hepatotoxicidade tem sido frequentemente investigada (DIAZ et al., 2013) e, hoje em dia, aumenta o interesse na avaliação de cardiotoxicidade (FRID & MATTHEWS, 2010) e nefrotoxicidade (MYSHKIN et al., 2012). Modelos limitados estão disponíveis para neurotoxicidade ou outros efeitos, como a acumulação de fosfolípidos, denominada fosfolipidose (CHOI et al., 2013).

Um dos testes de predição de toxicidade realizado pelo PreADMET é o teste de Ames (AMES et al., 1972). Esse teste, desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames, constitui um método simples para avaliar a mutagenicidade de uma substância química. Neste teste, podem ser empregadas várias cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* que carregam mutações em genes envolvidos na síntese de histidina, de modo que requerem histidina para o crescimento. A variável a ser testada é a capacidade mutagênica de um candidato a fármaco, isto é, a capacidade de provocar uma reversão do crescimento da bactéria em um meio isento de histidina.

O teste de carcinogenicidade (toxicidade que causa câncer) requer um longo tempo (geralmente 2 anos) de estudo pois apenas métodos de teste *in vivo* são estabelecidos (JACOBS & HATFIELD, 2013). O mecanismo de carcinogenicidade dos produtos químicos pode ser devido à sua capacidade de danificar o genoma ou interromper processos metabólicos celulares. Normalmente, usam-se camundongos ou ratos, que são expostos a uma determinada substância e a variável a ser observada é a existência de células cancerígenas através de observações histopatológicas (presença de lesões proliferativas ou não). PreADMET prevê o resultado de seu modelo, que é construído a partir dos dados do NTP (*National Toxicology Program*) e FDA US, que são os resultados dos testes de carcinogenicidade *in vivo* de camundongos e ratos durante 2 anos.

No âmbito dos ensaios preliminares de segurança cardiovascular, uma atenção especial é dada à avaliação do efeito das substâncias teste sobre o sistema de condução cardíaco (formado pelo sistema nervoso que é responsável pela condução dos estímulos nervosos, importantes para o funcionamento cardíaco). Esse fenômeno está frequentemente associado ao bloqueio direto ou interrupção no processo de maturação e expressão dos canais de potássio hERG. É de fundamental importância, no início de um processo de otimização de protótipos, que

se faça um rastreamento quanto a possíveis efeitos em canais iônicos cardíacos relevantes, como hERG (HORNBERG et al., 2014).

### **2.3.2 Citotoxicidade *in vitro***

Na indústria farmacêutica, os testes de citotoxicidade *in vitro*, estão se tornando cada vez mais usados como possíveis alternativas à toxicidade oral aguda, por razões de bem-estar animal e também como uma maneira de reduzir ainda mais o tempo e os custos no desenvolvimento pré-clínico de um fármaco. No entanto, para obter aceitação regulatória, os métodos de citotoxicidade precisam ser extensivamente validados contra métodos *in vivo*. As técnicas de citotoxicidade devem garantir a segurança e contribuir para o principal objetivo de estudos não clínicos, isto é, limitar o risco para os pacientes (OLEJNICZAK et al., 2001).

#### **2.3.2.1 Hepatotoxicidade**

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos fármacos, e por esta razão, é um dos principais órgãos testados em avaliações de segurança de novos fármacos. Com frequência, os fármacos administrados por via oral são absorvidos em sua forma inalterada pelo trato gastrointestinal e transportados diretamente até o fígado através da circulação porta. Dessa maneira, o fígado tem a oportunidade de metabolizar os fármacos antes de alcançarem a circulação sistêmica e, portanto, antes de atingirem seus órgãos-alvo (TANIGUCHI & GUENGERICH, 2009).

A lesão hepática induzida por fármacos (LHIF) é responsável por <1% dos casos de lesão hepática aguda observada por gastroenterologistas, mas é a causa mais comum de insuficiência hepática aguda nos EUA e na Europa (LEE, 2013; FONTANA et al., 2014). De acordo com pesquisas realizadas na França e na Islândia, LHIF ocorre com uma incidência anual de cerca de 14-19 por 100 000 habitantes. (SGRO et al., 2002; BJÖRNSSON et al., 2013). A LHIF também é uma das principais causas de descarte de candidatos durante o desenvolvimento de fármacos (LEWIS, 2006; STEVES & BAKER, 2009), de 76 medicamentos retirados do mercado entre 1969 e 2002, 12 foram atribuídos à hepatotoxicidade (WYSOWSKI & SWARTZ, 2005). LHIF tem sido associada a mais de 1000 fármacos, e é uma das

razões mais citadas para a aprovação ou não de novos fármacos, retirada do mercado, abandono e ações regulatórias pós-comercialização (SENIOR, 2007).

LHIF é uma causa freqüente de lesão hepática, que apresenta um amplo espectro de manifestações, sendo mais grave a morte hepatocelular, que leva à insuficiência hepática aguda após a ingestão de fármacos (YUAN & KAPLOWITZ, 2013). LHIF pode se apresentar clinicamente através de múltiplas manifestações, tais como, hepatite aguda, icterícia, hiperplasia regenerativa nodular ou síndrome da obstrução sinusoidal, embora quase todas as patologias clínicas agudas ou crônicas de doença hepática possam ocorrer (KAPLOWITZ, 2005). LHIF também pode apresentar um quadro subclínico silencioso, detectado em exames de sangue de rotina. Sexo e idade são determinantes do padrão e gravidade da lesão. O gênero feminino é um fator de risco para desenvolver LHIF hepatocelular e insuficiência hepática aguda, enquanto a idade maior que 60 predispõe ao desenvolvimento de LHIF colestático com um curso mais silencioso (LUCENA et al., 2009).

As células HepG2 (hepatoma humano) são amplamente utilizadas em estudos toxicológicos de avaliações de risco químico e ambiental (VIDIC et al., 2009; BADERNA et al., 2011; 2013). A expressão de enzimas metabolizadoras antioxidantes e xenobióticas geralmente influenciadas por várias substâncias químicas são semelhantes nas células HepG2 e nos hepatócitos humanos primários (WILKENING et al., 2003).

### **2.3.2.2 Nefrotoxicidade**

O rim é o órgão mais importante para a excreção dos fármacos e seus metabólitos. Suas funções incluem a manutenção da homeostasia, regulação do ambiente extracelular, tais como detoxificação e excreção de metabólitos tóxicos e fármacos e seus metabólitos (SEAR, 2005; FERGUSON et al., 2008). É um órgão de frequente toxicidade podendo causar desde um quadro agudo até insuficiência renal (HOU et al., 1983; KLEINKNECHT, 1995; LIAÑO et al., 1998; PAUEKSAKON & FOGO, 2017).

A nefrotoxicidade induzida por fármacos é um problema comum na clínica medicinal, e a incidência de fármacos que causam algum dano aos rins pode variar de 8 a 60% (KAUFMAN et al., 1991; GANDHI et al., 2000; NASH et al., 2002; SCHETZ et al., 2005). Esse tipo particular de toxicidade é mais comum em bebês e

crianças que já possuam uma prévia disfunção renal ou alguma doença cardiovascular (SHAHRBAF & ASSADI, 2015).

Os fármacos causam prejuízos aos rins devido à sua capacidade de danificar as células nos seus diversos compartimentos. O efeito tóxico aos rins pode ser através de um ou mais dos seguintes mecanismos: hipoperfusão renal, toxicidade as células tubulares, inflamação e estresse oxidativo (SCHETZ et al., 2005). A nefrotoxicidade descrita mais comumente é a que produz perdas tubulares, intersticial ou mais frequente túbulo intersticial levando a insuficiência renal aguda (PAUEKSAKON & FOGO, 2017).

As células LLC-PK1 (células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco) são descritas como um modelo para triagem de nefrotoxicidade *in vitro* (HULL et al., 1976; STEINMASSL et al., 1995; SERVAIS et al., 2006; RAMSEYER & GARVIN, 2013). Essas células mantêm diferentes funções que são típicas do epitélio de um túbulo proximal renal.

### **2.3.2.3 Toxicidade pulmonar**

Os pulmões do ser humano são órgãos do sistema respiratório, responsáveis pelas trocas gasosas entre o ambiente e o sangue. Sua principal função é oxigenar o sangue e eliminar o dióxido de carbono do corpo. Os pulmões são alvo de uma variedade de possíveis substâncias tóxicas devido à sua grande superfície de contato. Danos pulmonares devido à terapia medicamentosa geralmente têm um quadro clínico não específico e a resposta a um determinado fármaco varia de pessoa para pessoa, tornando a situação do diagnóstico ainda mais desafiador. Os fármacos podem induzir reações respiratórias específicas ou os pulmões podem ser afetados como parte de uma resposta generalizada. (FLIEDER & TRAVIS, 2004).

A lesão pulmonar induzida por fármacos pode envolver as vias aéreas, parênquima pulmonar, mediastino, pleura, vasculatura pulmonar e / ou sistema neuromuscular. A forma mais comum de toxicidade pulmonar induzida por substâncias químicas é a doença pulmonar intersticial induzida por fármacos (SCHWAIBLMAIR et al., 2012). As vias oral e parentérica da administração de fármacos são mais frequentemente citadas como as causadoras de toxicidade pulmonar; no entanto, a administração nebulizada e intracecal também podem

ocasionar esse tipo de toxicidade. A toxicidade pulmonar por um fármaco pode resultar de um efeito de droga direta ou indireta. Os efeitos diretos podem ser idiossincráticos ou devido a uma reação tóxica do fármaco ou de um dos seus metabólitos (MATSUNO, 2012).

A toxicidade pulmonar induzida por fármacos é subdiagnosticada em todo mundo, o que torna vagos os dados sobre a incidência global exata da doença pulmonar intersticial, mas aproximadamente 2,5 a 3% dos casos são creditados a esta condição (COULTAS et al., 1994; THOMEER et al., 2001). O diagnóstico tem como base a história de exposição do fármaco, evidência histológica de dano pulmonar e exclusão de outras causas de lesão pulmonar.

A549 é uma célula de adenocarcinoma de pulmão humano amplamente utilizada como um modelo *in vitro* de pesquisa de toxicologia para o sistema respiratório (CRESPO et al., 2011; FAUVEL et al., 2012; KONYSHEVA et al., 2017).

#### **2.3.2.4 Neurotoxicidade**

O sistema nervoso monitora e coordena a atividade dos músculos, e a movimentação dos órgãos, constrói e finaliza estímulos dos sentidos e inicia ações. Distúrbios neurológicos induzidos por fármacos referem-se a efeitos indesejados no sistema nervoso causado ou associado ao uso de fármacos. Um fármaco pode afetar o sistema nervoso diretamente (neurotoxicidade primária) ou indiretamente (neurotoxicidade secundária). Pode ser causada por uso inadequado ou sobredosagem de um fármaco ou interações com outros fármacos (JAIN, 2001).

Neuropatias induzidas por fármacos são raras, mas com o número de novos medicamentos aumentando, os efeitos colaterais incomuns podem não se tornar evidentes mesmo depois do uso generalizado (DIEZI et al., 2013).

Há três tipos de neuropatia periférica induzida por fármacos (PELTIER & RUSSELL, 2002). A degeneração axonal é a mais freqüente e, comumente, isso ocorre semanas a meses após a exposição à medicação e pode continuar apesar da retirada do medicamento (WANG et al., 2000). O segundo tipo de dano neuronal é a morte celular, geralmente das células ganglionares da raiz dorsal (WILSON et al., 2002).

Um último tipo, a neuropatia desmielinizante é muito menos comum e ocorre com agentes específicos, tais como amiodarona, interferon- $\alpha$ , cloroquina entre

outros. Um início agudo de polineuropatia pode imitar a síndrome de Guillain-Barré - doença autoimune grave, que afeta o sistema nervoso - e pode não ser reconhecido como um efeito de medicação (PELTIER & RUSSELL, 2006).

No presente estudo foi utilizada a célula Neuro-2A (neuroblastoma de camundongos) como modelo de neurotoxicidade, como empregado por outros autores (HE et al., 2011; SWARNKAR et al., 2012; MASANGO et al., 2014).

### **2.3.2.5 OECD 129 (documento guia de uso, de testes de citotoxicidade, para estimar a dose inicial dos testes de toxicidade oral aguda sistêmica)**

A OECD 129 foi projetado para ser um teste de citotoxicidade que poderia ser usado para medir os efeitos tóxicos imediatos de concentrações relativamente altas de substâncias em testes nas membranas celulares, resultando no extravazamento do conteúdo intracelular. O teste se baseia no princípio de que, se as células em cultura forem pré-carregadas com corante vital (Vermelho Neutro) e depois expostas a uma substância tóxica, a quantidade de corante liberada pelas células revelará o grau de dano às membranas celulares. Ao empregar células que tem o crescimento inibido por contato, o método pretende fornecer informações diferentes daquelas obtidas nos testes de viabilidade celular e inibição de crescimento celular, com concentrações mais baixas dos itens de teste e tempos de exposição muito mais longos (BORENFREUND & PUERNER, 1985; ZUANG, 2001).

### **2.3.3 Toxicologia oral aguda – OECD 423**

Modelos animais são críticos para o avanço do conhecimento sobre patogênese de doenças infecciosas, diagnósticos, terapêuticas e estratégias de prevenção. O uso de modelos animais requer consideração cuidadosa pelo seu bem-estar, pois as infecções podem afetar significativamente a saúde geral de um animal. A aplicação dos modelos de substituição, refinamento e redução de 3Rs (*Replacement, Reduction, or Refinement, the Three Rs*) em animais usando agentes de risco biológico pode melhorar o mérito científico e o bem-estar animal. (CHOE & LEE, 2017; KENDALL et al., 2018). O conceito dos Três Rs (Substituição, Redução e Refinamento), inicialmente foi descrito por Russell e Burch (RUSSELL & BURCH, 1959), a partir desses estudos refinamentos nas diretrizes de teste de toxicidade oral

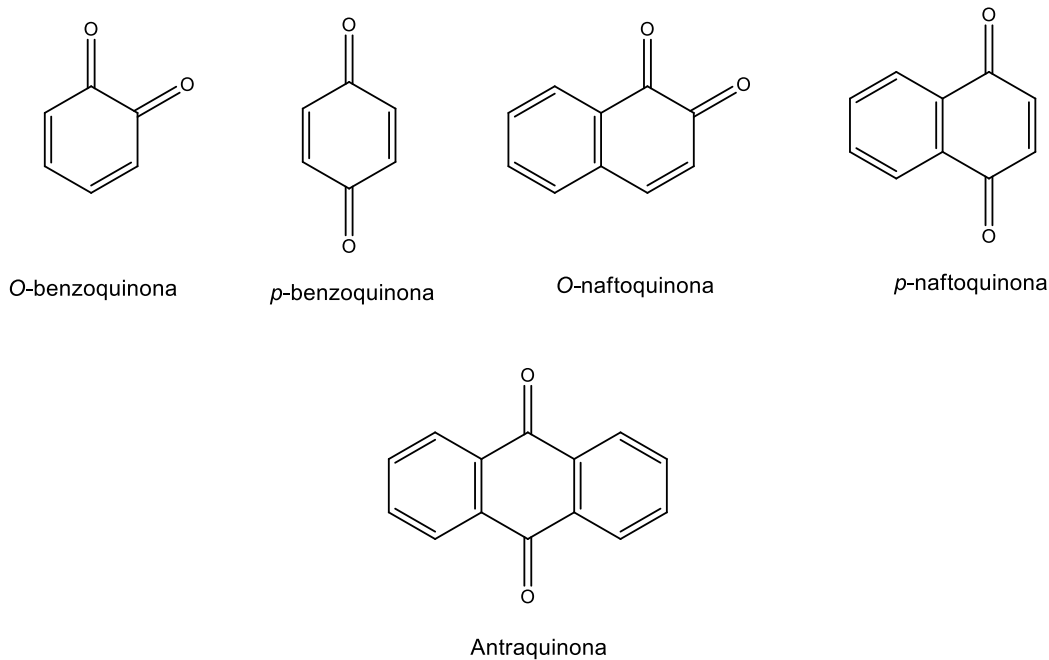
aguda foram sendo cada vez mais implementados, como por exemplo a substituição do documento guia OECD 401 pela OECD 423, nas últimas duas décadas levando a uma redução significativa no número de animais utilizados.

O teste de toxicidade sistêmica aguda *in vivo* fornece a base para a detecção dos danos e o gerenciamento de riscos que podem ser causados pelos produtos químicos no geral. Vários esforços internacionais foram direcionados para identificar métodos alternativos aos testes de toxicidade sistêmica aguda *in vivo*. Um *workshop* realizado em Maryland - USA em setembro de 2015 (*Acute toxicity Workshop, 2015*), “Abordagens alternativas para identificar a toxicidade sistêmica aguda - passando da pesquisa para o teste regulatório”, revisou o estado da ciência dos testes alternativos ao uso de animais e explorou maneiras de facilitar a implementação desses métodos. Os recursos identificados como necessários para um progresso significativo na implementação desses métodos alternativos incluem a compilação e disponibilização de dados de referência de alta qualidade, treinamento sobre uso e interpretação de abordagens *in vitro* e *in silico* e harmonização global dos requisitos do teste.

#### **2.4 Atividade antimalárica de quinonas**

As quinonas são compostos dicetônicos, derivados de compostos aromáticos, cujos grupos carbonila são conjugados com ligações duplas (BRUNMARK & CADENAS, 1989). Em função do ciclo no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas está inserido, têm-se os três grupos principais de quinonas: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas (Figura 13), derivadas, respectivamente, de um anel benzênico, um anel naftalênico e de um anel antracênico, este último podendo ser linear ou angular (SIMÕES et al., 2001).

**Figura 13- Estrutura química de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas**



As quinonas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo provavelmente encontradas em todas as células respiratórias de animais e plantas (SILVA et al., 2003). Suas estruturas moleculares têm um papel fundamental nas cadeias de transporte de elétrons na via metabólica, participando de múltiplos processos oxidativos biológicos (POWIS, 1987; O'BRIEN, 1991). As quinonas apresentam atividade anticancerígena (CASELLATO et al., 2010), antibacteriana (NAGATA et al., 1998), antimalárica (KAPADIA et al., 2001) e fungicida (LÓPEZ et al., 2011) (MARTÍNEZ & BENITO 2005).

Quinonas com atividade antimalárica, como o hidrolapachol (HOOKER 1936) e o lapachol, ambos isolados de plantas (FIESER & FIESER 1948), foram estudados em profundidade nas últimas décadas. O interesse nas propriedades antimaláricas das hidroxinaftoquinonas aumentou desde o desenvolvimento da atovaquona (FRY & PUDNEY 1992; SRIVASTAVA et al., 1997), um fármaco comercialmente disponível para a quimioprofilaxia da malária (*P. falciparum*) (MCKEAGE & SCOTT, 2003) em áreas de resistência à cloroquina (AGUIAR et al., 2012). As hidroxinaftoquinonas também possuem atividades antibacteriana e antitumoral devido aos seus efeitos sobre o estresse oxidativo (LOURENÇO et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2013).

As quinonas estão envolvidas no processo de respiração celular que ocorre no interior das mitocôndrias e consiste na redução do  $O_2$  a  $H_2O$ , devido à transferência de elétrons. Essa via de redução do  $O_2$  em mitocôndrias tem o potencial de produzir radicais livres, altamente reativos, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion-radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), conhecidas como espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), as quais podem danificar componentes celulares importantes. Essas espécies reativas são eliminadas, naturalmente, por um conjunto de defesa e reparo, o qual consiste nas enzimas superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase e glutatona-redutase. Porém, com a presença do lapachol, no interior celular, o processo de produção da ERMO é potencializado e o conjunto de defesa e reparo é saturado. Dessa forma, as células não podem eliminar as espécies reativas de oxigênio, dando início ao processo conhecido como estresse oxidativo, o qual provoca sérios danos celulares, podendo levar à apoptose (SILVA et al., 2003).

Um outro mecanismo de ação das quinonas, entre elas a atovaquona, está relacionado com a inibição do complexo citocromo *bc1* (ubiquinol-citocromo-c), o qual é o componente fundamental da cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência dessa inibição, ocorrerá um bloqueio do suplemento de energia para o parasito (IWATA et al., 1998). Estudos recentes mostraram que a principal função metabólica do complexo citocromo *bc1*, no parasito, é regenerar a ubiquinona, a qual é o substrato essencial para a enzima diidroorotato-desidrogenase (DHODH), relacionada com a síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina. Dessa forma, ao inibir a DHODH do parasito, este não será capaz de sintetizar nucleotídeos e conseqüentemente, as funções celulares vitais, como síntese do DNA, serão comprometidas (PAINTER et al., 2007; BARTON et al., 2010)

Na tentativa de diminuir a toxicidade das naftoquinonas, Pérez-Sacau e colaboradores (PÉREZ-SACAU et al., 2005) sintetizaram derivados do lapachol e da  $\beta$ -lapachona demonstrando que as naftoquinonas com um anel pirano ou furano apresentaram maior atividade antimalárica.

Na tentativa de melhorar a biodisponibilidade da atovaquona, El Hage e colaboradores (EL HAGE et al., 2009) sintetizaram vários derivados do lapachol para substituição do grupo hidroxila em C-3 por grupos éster e éter, mais lipofílicos. Todos os derivados obtidos possuíam uma potente atividade antimalárica, a maioria

exibindo  $CI_{50}$  *in vitro* inferiores a 5 nM. A atividade ótima foi conseguida com grupos éster de comprimento de cadeia de 1-8 grupos metilênicos ( $CH_2$ ) ou um grupo fenila ( $C_6H_5$ ). No entanto, essas modificações não levaram a uma melhoria na biodisponibilidade oral prevista e os resultados obtidos foram semelhantes àqueles da atovaquona.

### 3 JUSTIFICATIVA

O contínuo surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a múltiplos fármacos antimaláricos disponíveis constitui um grande desafio e está diretamente relacionada com a mortalidade da doença nas regiões endêmicas. Caso não sejam tomadas as devidas medidas, todo o sucesso do programa de controle de malária feito até o momento, pode ser revertido. A quimioterapia é a principal arma de combate à malária (WHO, 2018) e, como consequência, a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos é altamente relevante (SNOW et al., 2005; ANTONY & PARIJA, 2016).

A resistência dos protozoários do gênero *Plasmodium* a fármacos surge, principalmente, devido a mutações nos sítios ativos dos alvos ou modificações bioquímicas nos receptores (PENNA-COUTINHO et al., 2011). A elucidação da sequência completa do genoma do *P. falciparum* (GARDNER et al., 2002) abriu uma nova perspectiva para a descoberta de antimaláricos, usando como ferramentas de banco de dados e bioinformática para determinar receptores e potenciais alvos do patógeno (TAKENATA, 2001).

Compreender os princípios pelos quais pequenas moléculas ligantes reconhecem e interagem com macromoléculas é de grande importância em pesquisa e desenvolvimento farmacêutico (BLANEY, 2012). Uma das grandes vantagens da metodologia *in silico* é o fato de levar menos tempo e ser de baixo custo, em relação aos experimentos convencionais além de poder avaliar um grande número de estruturas (RONCAGLIONI et al., 2013). Desta forma, metodologias *in silico* serão utilizadas também para o estudo da atividade antimalárica e citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de naftoquinonas de uso potencial como antimaláricos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Realizar estudos pré-clínicos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial antimalárico e toxicologia de naftoquinonas sintéticas e naturais ativas *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* visando a definição de possíveis candidatos para desenvolvimento farmacêutico.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Realizar a predição *in silico* das propriedades ADME e de toxicologia de naftoquinonas antiplasmódicas pelo programa PreADMET

2. Avaliar a atividade antiplasmódica de uma série de naftoquinonas candidatas por testes *in vitro*, em culturas de *P. falciparum* resistente à cloroquina cepa W2.

3. Avaliar a citotoxicidade de naftoquinonas ativas contra os plasmódios por testes *in vitro* em culturas de células de diferentes órgãos pelo Teste do MTT.

4. Realizar o teste de citotoxicidade *in vitro* (OECD 129) em culturas de células Balb 3T3 (fibroblastos provenientes do embrião de camundongos), para estimar as doses iniciais no teste de toxicidade oral aguda.

5. Avaliar a segurança das naftoquinonas mais ativas e menos citotóxicas por estudos de toxicidade oral aguda (metodologia - OECD 423) através da extrapolação do resultado obtido pelos testes, conforme a metodologia da OECD 129.

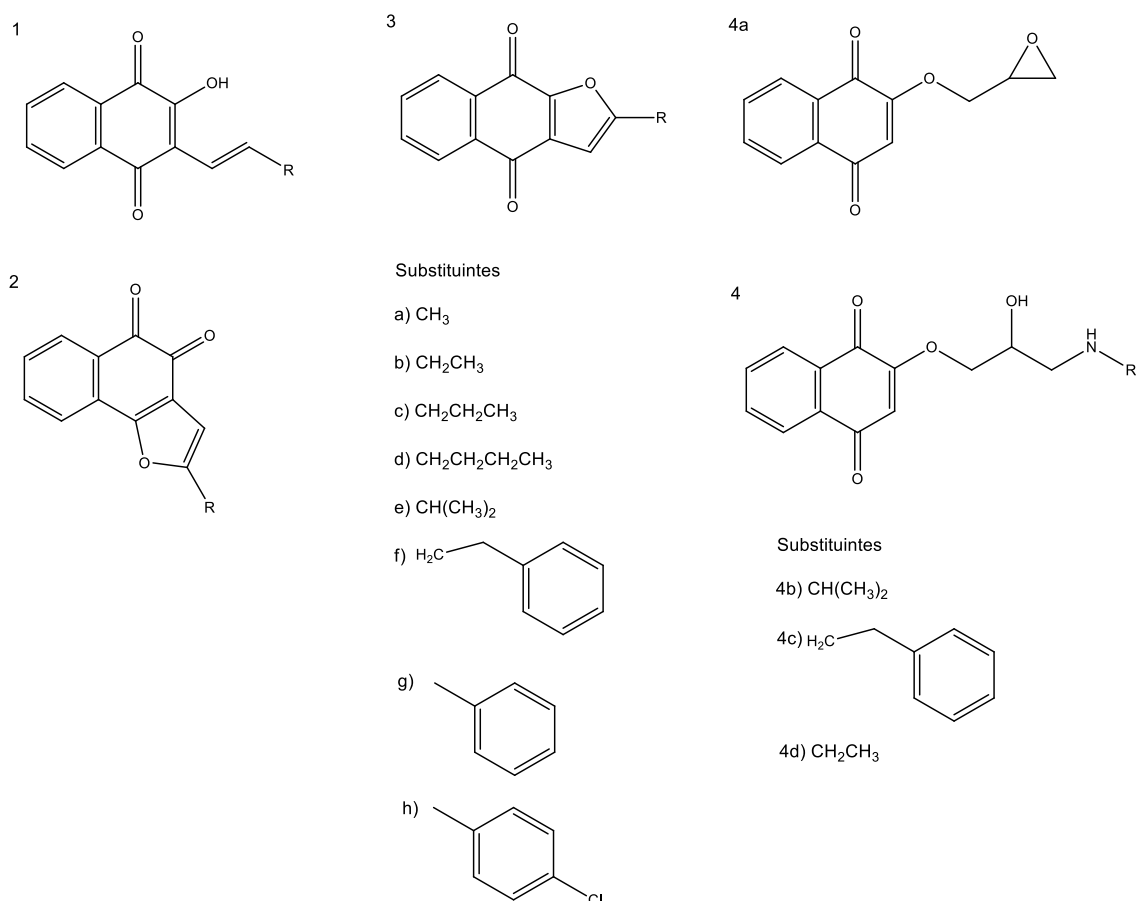
6. Realizar o teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos, das naftoquinonas que se mostrarem ativas e não tóxicas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 . Naftoquinonas naturais e sintéticas avaliadas

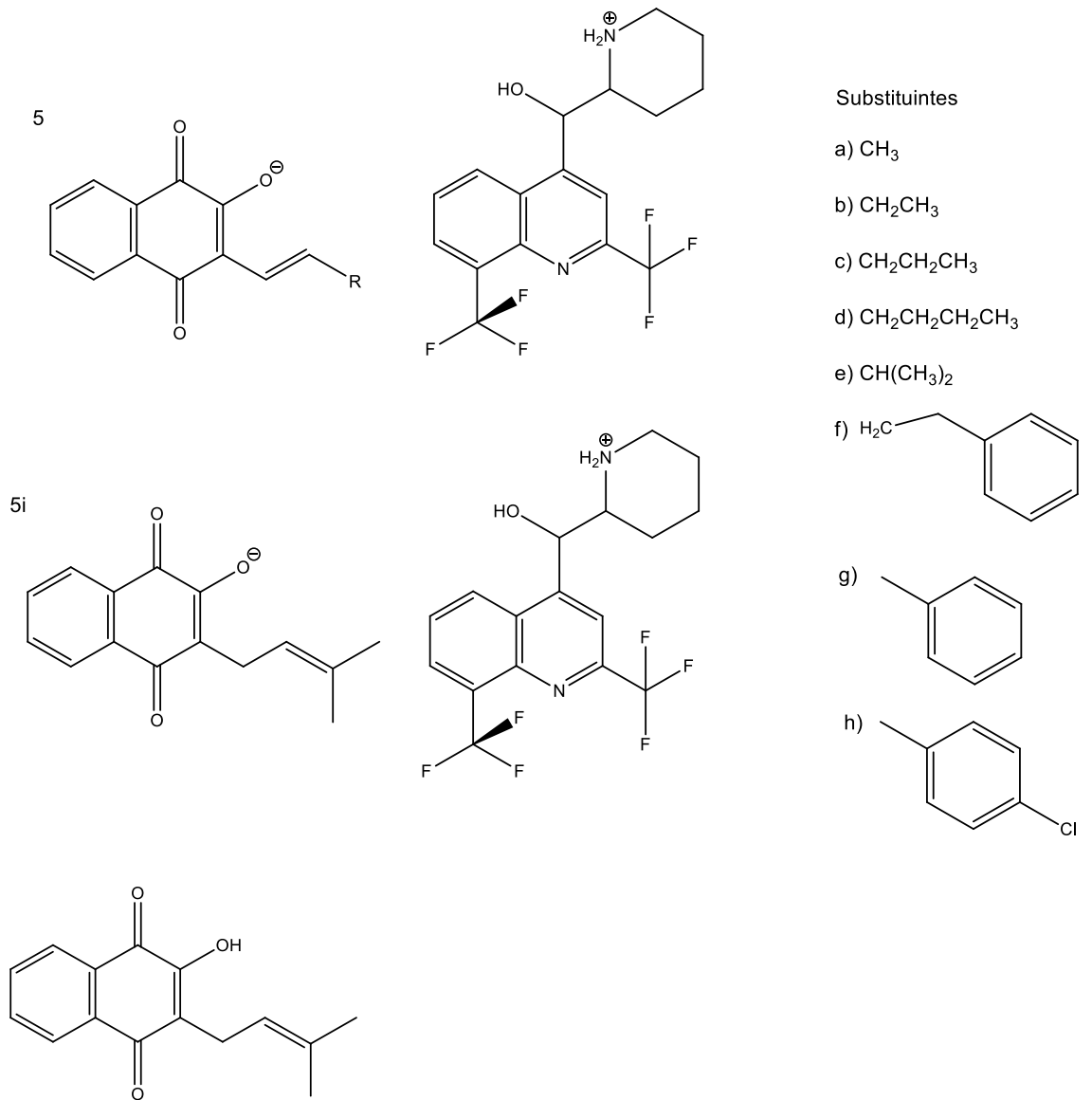
As substâncias avaliadas no presente projeto incluem naftoquinonas naturais como lapachol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona, e sintéticas: 2-hidróxi-3-(1'- alquenil)-1,4-naftoquinonas (HNQs) (série 1); *orto* e *para*-furanonaftoquinonas (*orto*-FNQs e *para*-FNQs); (série 2 e 3) aminopropoxinaftoquinonas (AMQs) (série 4) e sais formados pela combinação de mefloquina com HNQs ou lapachol (série 5) (Figura 14 e 15) obtidos, anteriormente, pela Doutora Tatiane Freitas Borgati (BORGATI, 2017).

**Figura 14-** Estruturas das HNQs, *orto*-FNQs, *para*-FNQs e AMQs



**Legenda:** 1 – HNQs, 2- *orto*-FNQs, 3- *para*-FNQs, 4- Amino derivados, R –Substituintes (grupos alquila)

**Figura 15- Estruturas químicas dos sais formados pela combinação de mefloquina com HNQs e com o lapachol**



**Legenda:** 5 –Sais, R – Substituintes (grupos alquila)

## 5.2 ADMET *in silico*

As predições *in silico* das substâncias **1a-1h**, **2a-2h**, **3a**, **3h**, **4a-4d** foram realizadas pelo programa de domínio público, PreADMET (PreADMET, 2017a). Os sais formados pela combinação da mefloquina com HNQs ou com o lapachol (**5a-5i**) não foram avaliados pelos métodos *in silico*. O programa não permite fazer predições de combinações de substâncias, apenas substâncias simples. Foram utilizadas as opções disponíveis gratuitamente: ADME (PreADMET, 2017b) e *Toxicology* (PreADMET, 2017c).

### 5.2.1 Predição *in silico* de ADME pelo programa PreADMET

Neste tópico foram efetuadas predições das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) das substâncias testadas cujas propriedades preditas de ADME pelo programa PreADMET e critérios de classificação são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1- Propriedades de ADME previstas pelo programa PreADMET e critérios de classificação**

| <b>Propriedades</b>  |                               |  |   |              |
|--|-------------------------------|--|---|--------------|
| <b>Ligações proteínicas plasmáticas (LPP)</b><br>BHE (MA et al., 2005) | a                             | Ligações químicas fortes > 90% LPP (Desvantagem)   |   |              |
|  |                               | Ligações químicas fracas < 90% LPP (Vantagem)  |   |              |
|  |                               | <b>Classificação</b>   | <b>BB (C<sub>cérebro</sub>/C<sub>sangue</sub>)</b>    | <b>LogBB</b> |
|  |                               | Alta permeabilidade pelo SNC   | >2,0  | > 0,3        |
|  | Média permeabilidade pelo SNC | 2,0 ~ 0,1  | 0,3~ -1,0   |              |
|  | Baixa permeabilidade pelo SNC | < 0,1  | > -0,1  |              |
| <b>Permeabilidade cutânea (SINGH &amp; SINGH, 1993)</b>                |                               | <b>Kp= Km*D/h</b>  |   |              |
|  |                               | Km= coeficiente de distribuição entre extrato córneo e veículo<br>D= média do coeficiente de difusão (cm <sup>2</sup> /h)<br>h= espessura da pele (cm) |   |              |
|  |                               | <b>Valores desejáveis entre -1 e -5</b>  |   |              |
| <b>Absorção intestinal humana (YEE et al., 1997)</b>                   |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Absorção intestinal humana</b>                     |              |
|  |                               | Substâncias pouco absorvidas   | 0~20%   |              |
|  |                               | Substâncias moderadamente absorvidas   | 20~70%  |              |
|  |                               | Substâncias bem absorvidas   | 70~100%   |              |
| <b>Permeabilidade em células CACO2 (YAZDANIAN et al., 1998) e MDCK</b> |                               | <b>Classificação</b>   | <b>P<sub>CACO-2</sub> (nm/sec)</b>                    |              |
|  |                               | Baixa permeabilidade   | < 4   |              |
|  |                               | Média permeabilidade   | 4 ~70   |              |
|  |                               | Alta permeabilidade  | > 70  |              |
| <b>Solubilidade em água ou solução tampão (ph 7,4)</b>                 |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Solubilidade (mg/L)</b>                            |              |
|  |                               | Solubilidade baixa   | <10   |              |
|  |                               | Solubilidade moderada  | 10 a 60   |              |
|  |                               | Solubilidade alta  | >60   |              |
| <b>Inibição das enzimas do citocromo (P450) <i>in vitro</i></b>        |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Características</b>                                |              |
|  |                               | Inibidores   | Substâncias que inibem a enzima                       |              |
|  |                               | Não inibidores   | Substâncias que não inibem a enzima                   |              |
| <b>Substrato para as enzimas do citocromo (P450)</b>                   |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Características</b>                                |              |
|  |                               | Substratos   | Substâncias que são substrato para a enzima           |              |
|  |                               | Não substratos   | Substâncias que não são substratos para a enzima      |              |
|  |                               | Substrato fraco  | Substâncias que são substratos fracos para as enzimas |              |
| <b>Inibição da glicoproteína (Pgp)</b>                                 |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Características</b>                                |              |
|  |                               | Inibidores   | Substâncias que inibem a proteína                     |              |
|  |                               | Não inibidores   | Substâncias que não inibem a proteína                 |              |
| <b>Sklog (log cutâneo)</b>   |                               | <b>Classificação</b>   | <b>Valores desejáveis</b>                             |              |
|  |                               | sklogD   | Entre -1 e 4  |              |
|  |                               | sklogP   | <5  |              |
|  |                               | sklogS   | Entre -1 e -5   |              |

### 5.2.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET

A predição de toxicologia foi realizada com o objetivo de prever se as substâncias testadas causam toxicidade para o organismo. As propriedades avaliadas constam da Tabela 2.

Tabela 2- Propriedades preditas pelo programa PreADMET –Toxicologia

| Regras                                      | Características |  |                   |
|---|-----------------|--|-------------------|
| Teste de Ames<br>(AMES et al., 1972)        | <b>Tipo</b>     | <b>Definição</b>   | <b>Descrição</b>  |
|   | Negativo        | Nenhuma mudança na população vs placa em branco                      | Predição negativa |
|   | Positivo        | Mudança na população, mais que o dobro da mudança da placa em branco | Predição positiva |
| Carcinogenicidade em roedores e camundongos | <b>Tipo</b>     | <b>Definição</b>   | <b>Descrição</b>  |
|   | Negativo        | Nenhuma evidência de atividade carcinogênica                         | Predição negativa |
|   | Positivo        | Clara evidência de atividade carcinogênica                           | Predição positiva |
| Inibição dos canais hERG                    | <b>Tipo</b>     | <b>Descrição</b>   |                   |
|   | Baixo risco     | Predição negativa  |                   |
|   | Médio risco     | Predição intermediária   |                   |
|   | Ato risco       | Predição positiva  |                   |

### 5.3 Ensaios *in vitro*

A atividade antiplasmódica das substâncias foi avaliada em culturas de *P. falciparum* resistente a cloroquina (cepa W2) e a citotoxicidade foi determinada em culturas de células de hepatoma humano (HepG2), renais (LLC-PK1 – células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco), pulmonares (A549 – adenocarcinoma de pulmão humano), fibroblasto de pulmão (MRC-5 – células de fibroblasto de pulmão de feto humano) e neurológicas (Neuro-2A – neuroblastoma de camundongos) (ARAUJO et al., 2014).

As amostras foram dissolvidas em DMSO (solução estoque) a uma concentração de 50mg/ml. Para a realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída em meio, até as concentrações desejadas.

#### 5.3.1 Atividade antiplasmódica

##### 5.3.1.1 Cultivo *in vitro* das fases intraeritocitárias de *Plasmodium falciparum* (W2)

Os parasitos da cepa W2 (cloroquina resistente) foram cultivados em hemácias humanas *in vitro*, sob condições estabelecidas por Trager e Jensen em 1976 (TRAGER & JENSEN, 1976) modificado por Jensen e Trager em 1977

(JENSEN & TRAGER, 1977); e mantidos na rotina no Laboratório de Fitoquímica e Bioensaios (BORGATI et al., 2017; GONTIJO et al., 2019). Os parasitos foram mantidos em placas de cultivo, em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 mM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 g/mL de gentamicina; 10% (v/v) de plasma humano inativado ou 10% (v/v) de albumax II e hematócrito a 5%. As placas foram mantidas a 37°C, em recipientes plásticos do tipo “tupperware”, nos quais a concentração adequada de CO<sub>2</sub> foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. Antes de cada teste de atividade antimalárica, os parasitos cultivados foram sincronizados pelo método do sorbitol (LAMBROS & VANDERBERG, 1979). Cultivos com predomínio de formas jovens (anéis), obtidas logo após a sincronização foram utilizados nos ensaios quimioterápicos.

### **5.3.1.2 Determinação da parasitemia**

A parasitemia foi determinada, diariamente, em esfregaços sanguíneos das culturas. Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados, secos ao ar, fixados com metanol, e corados com solução recém-diluída de Giemsa, na proporção de duas gotas para cada 1ml de água tamponada (pH 6,8), durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi calculada pela contagem do número de hemácias infectadas e expressa em percentual de hemácias parasitadas. Parasitemias maiores que 5%, foram contadas cerca de 1000 hemácias. Para infecções muito baixas, menores que 5%, foram contadas 6000 hemácias.

### **5.3.1.3 Atividade antiplasmódica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (W2) pela quantificação da lactato desidrogenase (pLDH) (MAKLER & HINRICHS, 1993)**

Foram utilizadas, para a realização desse teste, culturas sincronizadas com 2% de parasitemia, no estágio de trofozoíto jovem e 1% de hematócrito. Em seguida, foram distribuídas em microplacas de 96 poços colocando-se 180 µL por poço. As substâncias foram adicionadas em diferentes concentrações na placa

contendo os parasitos (Tabela 3). Os poços controles (sem a adição de substâncias) continham hemácias não infectadas (controle negativo) ou hemácias infectadas (controle positivo). Como antiplasmódico padrão foi utilizado o sal difosfato de cloroquina (CQ) e atovaquona – fármaco disponível comercialmente - é uma hidroxí-1,4-naftoquinona. As amostras foram testadas em triplicata, em seis concentrações distintas, diluição seriada 1:2 (150 $\mu$ M; 75 $\mu$ M; 37,5 $\mu$ g/ml; 18,75 $\mu$ M; 9,37 $\mu$ M e 4,69 $\mu$ M) para a determinação do  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50% dos parasitos). Se necessário, a concentração inicial da substância no teste era diminuída até a determinação do  $CI_{50}$ . Após 48 h de incubação, as microplacas foram congeladas (-20°C) e descongeladas à temperatura ambiente (TA) por duas vezes com o objetivo de promover a lise das hemácias. Em uma nova placa de 96 poços foram adicionados 100 $\mu$ L/poço do reagente Malstat, preparado solubilizando-se em 200 mL de água destilada: 400  $\mu$ L Triton X-100, 4 g de L-lactato de sódio, 1,32 g de Tris e 22mg de 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD). Na mesma placa foi adicionado 25  $\mu$ L/poço da solução NBT/PES, composta por 160 mg de *NitroBlueTetrazolium Salt* (NBT) e 8 mg de etosulfato de fenazina (PES), em 100mL de água destilada. Por fim, 15 $\mu$ L do conteúdo de cada poço da placa teste foi adicionado a esta segunda placa que foi incubada por 1 h, 37°C, ao abrigo da luz. Foram realizados três experimentos independentes para cada substância. A leitura foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. A média de produção de  $pLDH$  dos controles positivos foi considerada como 100% de viabilidade, já os negativos, como 0% de viabilidade. A partir desses dois valores, foi calculada a viabilidade dos parasitos mantidos tanto em contato com as amostras teste quanto com os antiplasmódicos padrões. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal.





**Tabela 3- Distribuição das amostras na placa para o teste de atividade antiplasmódica pelo  $\rho$ LDH**

|   | 0             |               | 1             |               | 2             |               |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | Controle (HN) |               |               | Controle (HP) |               |               |
| B | 150 $\mu$ M   | 150 $\mu$ M   | 150 $\mu$ M   | 150 $\mu$ M   | 150 $\mu$ M   | 150 $\mu$ M   |
| C | 75 $\mu$ M    | 75 $\mu$ M    | 75 $\mu$ M    | 75 $\mu$ M    | 75 $\mu$ M    | 75 $\mu$ M    |
| D | 37,5 $\mu$ M  | 37,5 $\mu$ M  | 37,5 $\mu$ M  | 37,5 $\mu$ M  | 37,5 $\mu$ M  | 37,5 $\mu$ M  |
| E | 18,75 $\mu$ M | 18,75 $\mu$ M | 18,75 $\mu$ M | 18,75 $\mu$ M | 18,75 $\mu$ M | 18,75 $\mu$ M |
| F | 9,37 $\mu$ M  | 9,37 $\mu$ M  | 9,37 $\mu$ M  | 9,37 $\mu$ M  | 9,37 $\mu$ M  | 9,37 $\mu$ M  |
| G | 4,69 $\mu$ M  | 4,69 $\mu$ M  | 4,69 $\mu$ M  | 4,69 $\mu$ M  | 4,69 $\mu$ M  | 4,69 $\mu$ M  |
| H |               |               |               |               |               |               |

**Legenda:**

**Controle (HN)** - meio completo + hemácias não parasitadas - 6 poços (sextuplicata)

**Controle (HP)** - meio completo+ hemácias parasitadas - 6 poços (sextuplicata)

|   |   |
|---|---|
|   | - substância 1 - cada concentração feita em triplicata. |
|  | - substância 2 - cada concentração feita em triplicata. |
|  | - substância 3 - cada concentração feita em triplicata. |
|  | - substância 4 - cada concentração feita em triplicata. |

### 5.3.2 Cultivo de células HepG2 (Hepatoma humano)

Todas as substâncias que apresentaram atividade antiplasmódica significativa ( $CI_{50} < 100\mu\text{M}$ ) nos ensaios *in vitro* com *P. falciparum*, foram avaliadas em células HepG2 para a determinação do  $CC_{50}$  (concentração citotóxica de 50% das células).

Para as substâncias que apresentaram atividade  $CI_{50} < 100\mu\text{M}$  foi calculado o Índice de Seletividade (IS) que é dado pela razão entre o valor obtido de  $CC_{50}$  para células HepG2 e o valor de  $CI_{50}$  para *P. falciparum*. O índice de seletividade permite inferir se a amostra possui um efeito direcionado ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua citotoxicidade para quaisquer tipos celulares.

O meio de cultura foi substituído a cada dois dias e, quando as culturas atingiam confluência de 70 a 80%, as mesmas foram repicadas ou utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Para o repique celular, as garrafas contendo as células foram lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foi adicionada tripsina em cada garrafa (garrafa média

– 75cm<sup>2</sup> = 500µl de tripsina) deixando em repouso na estufa a 37°C por no máximo 5 minutos. Posteriormente foi acrescentada 3 ml de meio completo contendo 5% de soro fetal bovino. Foram utilizadas diluições de 1/6.

O meio completo para a HepG2 era composto de 10,4g de meio RPMI; 2,2g bicarbonato de sódio diluídos em 1L de água para injeção, pH 7,2.

### 5.3.3 Outras células

Todas as substâncias que apresentaram atividade antiplasmódica significativa (CI<sub>50</sub> <100µM) nos ensaios *in vitro* com *P. falciparum*, foram avaliadas em células LLC-PK1. As substâncias mais promissoras, (IS>5, e CC<sub>50</sub> para células LLC-PK1 >60µM) foram selecionadas para a continuação do trabalho, isto é, para avaliação da citotoxicidade nas demais células de diferentes órgãos (A549, Neuro-2A, MRC-5).

Todas as células abaixo foram mantidas em meio suplementado com 2,2 g de bicarbonato de sódio:

- LLC-PK1: (células epiteliais de rim de porco) - Meio MEM + 5% SFB
- A549: (Adenocarcinoma de pulmão humano) - Meio MEM + 10% SFB
- Neuro-2A (neuroblastoma de camundongos) - Meio DMEM + 10% SFB
- MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano) - Meio DMEM + 5% SFB

O meio de cultura foi substituído a cada dois dias e, quando as culturas atingiram confluência de 80%, as mesmas foram repicadas ou utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

#### **5.3.4 Validação do método de determinação de citotoxicidade pelo teste do MTT – {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difenil tetrazólio]}**

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que permite a avaliação de citotoxicidade celular. Sob a ação de desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, o MTT, de cor amarela, sofre redução do anel tetrazólio, resultando na formação da formazana, de coloração azul arroxeada. Para validar a técnica do MTT para determinação de citotoxicidade, uma cultura de células de HepG2 na concentração de  $1 \times 10^4$  foi distribuída em placas de 96 poços (100µl/poço), quantidade necessária para se atingir 70-80% de confluência, após 24 horas, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Em alguns poços não foram colocadas células (controles negativos). Posteriormente, o meio foi descartado e substâncias padrão (difosfato de cloroquina, mefloquina, atovaquona, lapachol) foram adicionadas em diferentes concentrações, tendo sido confeccionadas duas placas idênticas. Após 24 horas, uma solução do MTT em PBS (2mg/ml, 28µl/poço), foi adicionada aos poços de cada uma das placas uma das quais foi incubada por 90 min e a outra, por 4 horas. Após a incubação o conteúdo de cada poço foi descartado e foi adicionado a todas as placas DMSO (100µl/poço). Para escolha do comprimento de onda da leitura no espectrofotômetro (Infinite M200Pro – TECAN) foram registradas curvas de absorção na faixa de 400 a 700 nm, para as placas incubadas por 90 min e 4 horas. Com estes dados foram calculadas as porcentagens de redução das células viáveis, nos dois tempos: 90 min e 4 horas.

#### **5.3.5 Ensaio de citotoxicidade**






A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se diferentes tipos de células (HepG2, LLC-PK1, A549, Neuro-2A) pelo ensaio de redução do 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço e incubadas de 17 a 24 horas em estufa a 37°C e atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 100 µL de meio completo contendo diferentes concentrações das amostras testadas em triplicata. Em cada teste foram utilizadas oito concentrações diferentes (Tabela 4), em diluições seriadas 1:2, com concentração máxima de 400µM. Para cada substância foram realizado três experimentos independentes.

Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 28  $\mu\text{L}$ /poço do sal de tetrazólio (MTT), na concentração de 2mg/mL, em tampão fosfato (PBS). Após 1h30min de incubação com o MTT, todo o conteúdo foi aspirado por pipeta de Pasteur, adicionou-se DMSO a cada poço (100  $\mu\text{L}$ /poço) para solubilizar os cristais de formazana quando presentes. Esse ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann, 1893 (MOSMANN, 1983), com modificações validadas no item anterior. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de 510 nm. A concentração citotóxica que inibe em 50% o crescimento das células na presença das amostras teste foi determinada em comparação com células cultivadas sem as amostras teste e com o DMSO, consideradas como 100% de crescimento (VAROTTI et al., 2008). As substâncias foram diluídas em DMSO com a concentração máxima de 0,5%. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal.

**Tabela 4- Distribuição das amostras na placa teste – Método MTT**

|   | 1          | 2 | 3 | 4                   | 5 | 6 | 7                   | 8 | 9 | 10                  | 11 | 12 |
|---|------------|---|---|---------------------|---|---|---------------------|---|---|---------------------|----|----|
| A | Controle 1 |   |   | 400 $\mu\text{M}$   |   |   | 400 $\mu\text{M}$   |   |   | 400 $\mu\text{M}$   |    |    |
| B |            |   |   | 200 $\mu\text{M}$   |   |   | 200 $\mu\text{M}$   |   |   | 200 $\mu\text{M}$   |    |    |
| C |            |   |   | 100 $\mu\text{M}$   |   |   | 100 $\mu\text{M}$   |   |   | 100 $\mu\text{M}$   |    |    |
| D |            |   |   | 50 $\mu\text{M}$    |   |   | 50 $\mu\text{M}$    |   |   | 50 $\mu\text{M}$    |    |    |
| E | Controle 2 |   |   | 25 $\mu\text{M}$    |   |   | 25 $\mu\text{M}$    |   |   | 25 $\mu\text{M}$    |    |    |
| F |            |   |   | 12,5 $\mu\text{M}$  |   |   | 12,5 $\mu\text{M}$  |   |   | 12,5 $\mu\text{M}$  |    |    |
| G |            |   |   | 6,25 $\mu\text{M}$  |   |   | 6,25 $\mu\text{M}$  |   |   | 6,25 $\mu\text{M}$  |    |    |
| H |            |   |   | 3,125 $\mu\text{M}$ |   |   | 3,125 $\mu\text{M}$ |   |   | 3,125 $\mu\text{M}$ |    |    |

**Legenda**

|   |  |
|---|--|
|  | - controle 1 - células + meio                          |
|  | - controle 2 - células + meio + DMSO                   |
|  | - substância 1 - cada concentração feita em triplicata |
|  | - substância 2 - cada concentração feita em triplicata |
|  | - substância 3 - cada concentração feita em triplicata |

### 5.3.6 OECD 129 (documento guia de uso, de testes de citotoxicidade, para estimar a dose inicial dos testes de toxicidade oral aguda sistêmica)

A OECD 129 é um teste de viabilidade celular baseado na habilidade de células com membranas intactas de incorporar e reter o corante Vermelho Neutro em seus lisossomos; a quantidade de corante incorporado pode ser medida, após a extração, por sua absorvância (ZUANG, 2001).

Para este teste foi utilizado as substâncias ativas contra *P. falciparum in vitro* ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ ), com índice de seletividade maior que 5 ( $IS > 5$ ) em relação às células HepG2 e  $CC_{50} > 60 \mu\text{M}$  para células LLC-PK1. As células Balb 3T3 (fibroblastos provenientes do embrião de camundongos) foram plaqueadas em placas de 96 poços com  $3 \times 10^3$  células por poço e incubadas por 24 horas. Uma solução estoque de  $200000 \mu\text{g/mL}$  da substância foi preparada em DMSO e foram feitas diluições em série de dez vezes (2000; 200; 20; 2; 0,2; 0,02; 0,002;  $0,0002 \mu\text{g/mL}$ ) em DMEM; para uma triagem inicial. As células foram incubadas por 48 horas. Após a incubação, o meio foi removido e a solução vermelha neutra ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) foi adicionada, incubada por 3 horas. A solução com Vermelho Neutro foi removida e  $100 \mu\text{L/poço}$  de solução reveladora (água, ácido acético glacial e etanol) foram adicionados para a solubilização dos cristais. A absorvância foi lida a  $540 \text{ nm}$  no espectrofotômetro (Molecular Devices SPECTRA Max PLUS 384).

Para determinação da  $CC_{50}$  foi realizado segundo teste, em sextuplicata, três experimentos independentes, no qual as etapas de plaqueamento celular eram idênticas ao primeiro teste. A primeira concentração do segundo teste foi escolhida após a predição do  $CC_{50}$  no primeiro teste. As diluições sucessivas, do segundo teste, foram feitas utilizando o fator de diluição 1,39. Essas concentrações foram aplicadas às células e seguiram as etapas de incubação e leitura de acordo com o primeiro teste. O valor de  $CC_{50}$  foi calculado e utilizado na seguinte equação de regressão logarítmica para estimar o  $LD_{50}$  em mg/kg:

$$\text{Log}LD_{50} = 0,372 * \text{log}CC_{50} + 2,024$$

$$LD_{50} = 10^{\text{log}LD_{50}}$$

#### 5.4. Toxicidade oral aguda – OECD 423

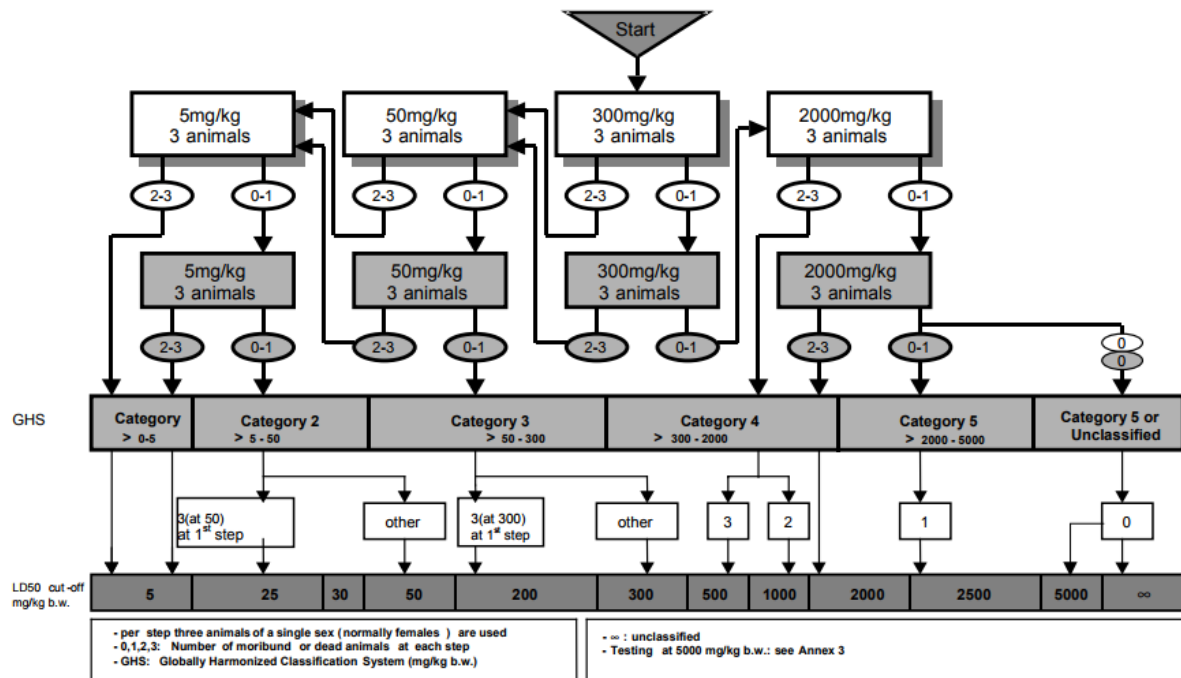
Toxicidade aguda é aquela produzida por um candidato a fármaco ou substância química quando o mesmo é administrado em uma ou mais doses, durante um período que não exceda 24 horas, em condições padronizadas.

O estudo de toxicidade aguda foi realizado de acordo com guia OECD 423 (Figura 16). Esse procedimento substitui o teste de DL<sub>50</sub> introduzido por Trevan em 1927 (TREVAN, 1927), visando à utilização de um menor número de animais nos experimentos. Os experimentos envolvendo o uso de animais de laboratório neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, CEUA-UFMG, processo nº 415/2015.

A toxicidade aguda serve ainda de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas com doses repetidas. O protocolo orienta a utilização de animais do mesmo sexo, preferencialmente fêmeas, uma vez que as mesmas se mostraram ligeiramente mais sensíveis em estudos previamente realizados.

De acordo com as orientações da OCDE 129, a dose inicial estabelecida foi de 300 mg/kg seguida de 2000 mg/kg. (Figura 16). Os camundongos receberam as substâncias que foram testadas, na dose de 300mg/kg (3 animais/grupo) e nos dias subsequentes – 14 dias – foram avaliadas as mortes dos animais. Se morrerem dois ou três animais, o teste da substância é repetido, utilizando-se a dose de 50mg/kg. Se morrerem dois ou três testa-se a dose de 5mg/kg. Se morrerem mais de dois camundongos, na dose de 5mg/kg, a substância será classificada na **categoria 1 (valores >0 e no máximo– 5)**. Se morrer apenas um animal ou nenhum, na dose de 5mg/kg, a substância será classificada na **categoria 2 (valores >5 e no máximo 50)**. Se houver no máximo uma morte, na dose de 50mg/kg, a substância é classificada na **categoria 3 (valores >50 e no máximo 300)**. No entanto, se nenhum animal morrer ou morrer apenas um, na dose de 300mg/kg, a substância é testada na dose de 2000mg/kg. Se morrer de 2 a 3 camundongos, os animais são classificados na **categoria 4 (valores >300 e no máximo 2000)** A substância será classificada na **categoria 5 (valores >2000)** se morrerem no máximo um camundongo na dose de 2000mg/kg.

**Figura 16-** Fluxograma de classificação de substâncias a partir do estudo toxicológico agudo iniciando-se a partir da dose de 300 mg/kg (OECD 423)



#### 5.4.1 Animais

Os camundongos Swiss (30 g ± 20%), fêmeas, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, foram divididos em quatro grupos de 3 (três) animais, sendo três grupos teste e um controle. Os animais foram submetidos às seguintes condições ambientais: temperatura de 23 ± 2 °C, umidade de 50 a 60%, ciclo claro-escuro de 12 h (07:00-19:00), em gabinete, sendo alimentados com ração do mesmo lote em *pellet* e água potável *ad libitum*. Esses animais foram climatizados por 5 (cinco) dias antes de iniciar o experimento. Os ensaios foram realizados no laboratório de Toxicologia Experimental da FAFAR.

#### 5.4.2 Tratamento

Os animais foram submetidos ao jejum, com água potável *ad libitum*, 3-4 horas anteriores ao teste. Foram pesados e a administração do produto realizada por gavagem. A alimentação foi reiniciada 1-2 horas após o término da administração. Após administração das doses, foi realizada observação cuidadosa

dos animais (grupo controle e grupo teste) aos 5, 15, 30, 45, 60 minutos e a cada hora até a 12<sup>a</sup> hora no primeiro dia. O período de observação dos animais, após administração das doses, foi de mais 13 dias (12:00-14:00h - uma vez/dia) com fornecimento de alimento e água.

Diariamente foram avaliados os seguintes parâmetros: locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pêlos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência, número de mortes e a forma de sua ocorrência. Os animais tiveram seu peso corporal avaliado nos seguintes dias: 1, 2, 3, 4, 8, 12 e no dia da eutanásia. Foram atribuídos escores de 0 a 4, a partir daquele parâmetro de comportamento considerado normal. Após esse período, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos foram retirados para as análises macroscópicas e histopatológicas. Foram retiradas as seguintes vísceras: coração, fígado, pâncreas, supra-renais, rins, baço, estômago e pulmões.

Procedimentos a seguir:

- ✓Retirada dos órgãos e conservação em solução de formol 10%;
- ✓Pesagem do fígado e rins; e de algum outro órgão que tenha alteração;
- ✓Exame macroscópico dos órgãos inteiros;
- ✓Grupo teste foi avaliado em relação ao grupo controle.

## **5.5 Teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos**

Os experimentos envolvendo o uso de animais de laboratório neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, CEUA-UFMG, processo nº 115/2019. Todas as substâncias que não foram tóxicas no teste de toxicidade oral aguda (OECD 423) foram submetidas aos testes *in vivo* conforme protocolo descrito por Peters (1965) (PETERS, 1965), com modificações.

Camundongos suíços, fêmeas, com aproximadamente 8 semanas, foram inoculados com hemácias infectadas com *P. berghei*, cepa ANKA, gentilmente cedida pelo Dr. Luciano Andrade Moreira, CPqRR/MG. Os parasitos foram mantidas em camundongos por passagens sanguíneas semanais. Cada camundongo foi inoculado com  $1 \times 10^5$  hemácias parasitadas, via intraperitoneal, em 0,2 mL de RPMI suplementado com 5% SFB (1º dia do experimento). Aproximadamente 24 h após a inoculação, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco

camundongos por gaiola. Os animais foram distribuídos em grupos controles: um não tratado e um tratado com difosfato de cloroquina (CQ), e três grupos teste, com 5 animais por grupo. No 2º, 3º e 4º dias após a inoculação, os camundongos dos grupos teste, controle tratado e controle não tratado receberam, por via oral, as substâncias (200 mg/kg), CQ (30 mg/kg) e salina, respectivamente. As amostras foram diluídas em água tratada contendo 3% de DMSO; o difosfato de cloroquina foi diluído em soro fisiológico. A parasitemia foi avaliada no 5º e 9º dias de experimento, pela contagem dos parasitos em esfregaços sanguíneos; a redução da parasitemia foi calculada em relação ao grupo controle não tratado. A mortalidade dos animais foi avaliada até o 60º dia após a inoculação.

A atividade antimalárica foi determinada pela percentagem de redução da parasitemia dos animais tratados em relação aos controles. Inibição de 30% do crescimento dos parasitos, quando comparados o grupo controle e o grupo teste, foi considerada como indicador de uma amostra ativa (ANDRADE-NETO et al., 2003).

Para avaliação da parasitemia os esfregaços sanguíneos dos camundongos foram secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa, na proporção de duas gotas para cada 1mL de água tamponada (pH 6,8). Após 10min, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas. Nesse caso, a avaliação foi realizada pela estimativa do número total de hemácias visualizadas em cada campo microscópico, sendo quantificados os parasitos em 50 a 100 campos. A parasitemia foi expressa em percentagem de hemácias parasitadas.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Resultados anteriores**

Nesta presente tese foram incluídos resultados de avaliações de atividade antiplasmódica e citotoxicidade descritos por Tatiane Freitas Borgati (BORGATI, 2017). Os resultados compilados constam da Tabela 5.

**Tabela 5-** Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) em cultura de *Plasmodium falciparum* (W2) (pLDH); concentração citotóxica inibitória de 50% do crescimento (CC<sub>50</sub>) de células HepG2 (MTT); e Índice de Seletividade (IS) das NQs sintetizadas, e dos controles: lapachol, atovaquona e mefloquina (BORGATI, 2017)

| Substâncias | CI <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> (µM) | CC <sub>50</sub> - HepG2 (µM) | IS     |
|-------------|--|-------------------------------|--------|
| Lapachol    | 191,16                                     | >1000                         | >5,23  |
| Mefloquina  | 0,053                                      | 12,05                         | 227,36 |
| Atovaquona  | 1,04                                       | 113,13                        | 108,78 |
| 1a          | 99,85                                      | 970,77                        | 9,72   |
| 1b          | 62,56                                      | 139,01                        | 2,22   |
| 1c          | 52,67                                      | 146,82                        | 2,79   |
| 1d          | 100,82                                     | 21,54                         | 0,21   |
| 1e          | 72,19                                      | >1000                         | >13,85 |
| 1f          | 45,81                                      | 19,51                         | 0,43   |
| 1g          | 110,61                                     | 940,06                        | 8,50   |
| 1h          | 39,55                                      | 335,85                        | 8,49   |
| 2a          | 23,20                                      | 4,72                          | 0,20   |
| 2b          | 25,08                                      | 11,90                         | 0,47   |
| 2c          | 24,70                                      | 11,54                         | 0,47   |
| 2d          | 50,22                                      | 12,99                         | 0,26   |
| 2e          | 26,41                                      | 21,33                         | 0,81   |
| 2f          | 23,43                                      | 13,68                         | 0,58   |
| 2g          | 40,76                                      | 6,09                          | 0,15   |
| 2h          | 19,92                                      | 68,67                         | 3,45   |
| 3a          | 26,55                                      | 869,12                        | 32,73  |
| 3b          | 28,89                                      | 12,52                         | 0,43   |
| 3c          | 11,66                                      | 115,88                        | 9,94   |
| 3d          | 23,77                                      | 119,17                        | 5,01   |
| 3e          | 30,53                                      | 143,28                        | 4,69   |
| 3f          | 18,78                                      | 97,89                         | 5,21   |
| 3g          | 21,80                                      | 120,83                        | 5,54   |
| 3h          | 140,74                                     | >1000                         | >7,10  |
| 4a          | >150                                       | >1000                         | <6,67  |
| 4b          | >150                                       | >1000                         | <6,67  |
| 4c          | >150                                       | >1000                         | <6,67  |
| 4d          | >150                                       | >1000                         | <6,67  |
| 5a          | 0,098                                      | 7,58                          | 77,35  |
| 5b          | 0,117                                      | 8,32                          | 71,11  |
| 5c          | 0,053                                      | 8,97                          | 169,24 |
| 5d          | 0,109                                      | 10,18                         | 93,39  |
| 5e          | 0,058                                      | 10,13                         | 174,65 |
| 5f          | 0,054                                      | 9,20                          | 170,37 |
| 5g          | 0,082                                      | 9,71                          | 118,41 |
| 5h          | 0,151                                      | 11,58                         | 76,69  |
| 5i          | 0,072                                      | 8,94                          | 124,17 |

## 6.2 ADMET *in silico*

As propriedades ADMET foram simuladas *in silico*, pelo programa PreADMET que compreende a avaliação das propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicologia.

### 6.2.1 Predição de ADME pelo programa PreADMET

As Tabelas de 6-9 apresentam um resumo das predições das propriedades **ADME** para todas as substâncias das séries HNQs (**1a-h**), *orto*-FNQs (**2a-h**), *para*-FNQs (**3a-h**) amino derivados da lawsona (**4a- d**),  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol e atovaquona.

**Tabela 6-** Resumo da predição das propriedades ADME das HNQs, de acordo com o programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias –HNQs(Série 1) |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
|                                  | a                          | b | c | d | e | f | g | h |
| BHE                              |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Permeabilidade cutânea           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Solubilidade em água             |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Solubilidade em tampão           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Permeabilidade Caco2             |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Permeabilidade MDCK              |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Absorção intestinal humana       |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Ligações a proteínas plasmáticas |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| Inibição da gpP                  |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 2C19 (Inibição)           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 2C9 (Inibição)            |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 2D6 (Inibição)            |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 2D6 (substrato)           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 3A4 (Inibição)            |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| P450 - 3A4 (Substrato)           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| SklogD                           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| SklogP                           |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| logS (tampão)                    |                            |   |   |   |   |   |   |   |
| logS (água pura)                 |                            |   |   |   |   |   |   |   |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 7-** Resumo da predição das propriedades ADME das *orto*-FNQs, de acordo com o programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias <i>orto</i> -FNQs (Série 2) |             |             |             |             |             |             |             |
|----------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                  | a                                       | b           | c           | d           | e           | f           | g           | h           |
| BHE                              | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | verde claro | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| Permeabilidade cutânea           | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| Solubilidade em água             | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| Solubilidade em tampão           | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | vermelho    | verde claro | vermelho    |
| Permeabilidade Caco2             | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| Permeabilidade MDCK              | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| Absorção intestinal humana       | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| Ligações à proteínas plasmáticas | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| Inibição da gpP                  | verde claro                             | verde claro | verde claro | vermelho    | vermelho    | vermelho    | verde claro | vermelho    |
| P450 - 2C19 (Inibição)           | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| P450 - 2C9 (Inibição)            | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| P450 - 2D6 (Inibição)            | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| P450 - 2D6 (substrato)           | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| P450 - 3A4 (Inibição)            | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |
| P450 - 3A4 (Substrato)           | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| SklogD                           | verde claro                             | verde claro | verde claro | vermelho    | verde claro | verde claro | vermelho    | vermelho    |
| SklogP                           | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| logS (tampão)                    | verde claro                             | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro | verde claro |
| logS (água pura)                 | vermelho                                | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    | vermelho    |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 8-** Resumo da predição das propriedades ADME das *para*-FNQs, de acordo com o programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias <i>para</i> -FNQs(Série 3) |              |              |              |              |              |              |              |
|----------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | a                                      | b            | c            | d            | e            | f            | g            | h            |
| BHE                              | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | verde escuro | vermelho     | vermelho     | vermelho     | verde escuro |
| Permeabilidade cutânea           | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| Solubilidade em água             | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| Solubilidade em tampão           | verde claro                            | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  | vermelho     | verde claro  | vermelho     |
| Permeabilidade Caco2             | verde claro                            | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  |
| Permeabilidade MDCK              | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| Absorção intestinal humana       | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| Ligações à proteínas plasmáticas | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| Inibição da gpP                  | verde escuro                           | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 2C19 (Inibição)           | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 2C9 (Inibição)            | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 2D6 (Inibição)            | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| P450 - 2D6 (substrato)           | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 3A4 (Inibição)            | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 3A4 (Substrato)           | verde claro                            | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde escuro | verde claro  | verde claro  |
| SklogD                           | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | vermelho     | verde escuro | verde escuro | vermelho     | vermelho     |
| SklogP                           | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| logS (tampão)                    | verde escuro                           | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| logS (água pura)                 | vermelho                               | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     | vermelho     |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 9-** Resumo da predição das propriedades ADME das AMQs e naftoquinonas naturais e atovaquona, de acordo com o programa PreADMET

| Propriedades                     | AMQs (Série 4) |              |              |              | Naftoquinonas naturais e sintética |              |              |              |
|----------------------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | a              | b            | c            | d            | $\alpha$ -lap                      | $\beta$ -lap | lap          | atov         |
| BHE                              | verde claro    | verde escuro | verde escuro | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | verde claro  | vermelho     |
| Permeabilidade cutânea           | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| Solubilidade em água             | verde claro    | verde claro  | vermelho     | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | verde claro  | vermelho     |
| Solubilidade em tampão           | verde claro    | verde claro  | vermelho     | verde claro  | vermelho                           | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| Permeabilidade Caco2             | verde claro    | verde claro  | verde claro  | verde claro  | verde claro                        | verde claro  | verde claro  | verde claro  |
| Permeabilidade MDCK              | verde escuro   | verde claro  | verde claro  | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | verde claro  |
| Absorção intestinal humana       | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| Ligações à proteínas plasmáticas | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| Inibição da gpP                  | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | vermelho     |
| P450 - 2C19 (Inibição)           | vermelho       | verde escuro | verde escuro | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 2C9 (Inibição)            | vermelho       | verde escuro | vermelho     | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 2D6 (Inibição)            | verde escuro   | verde escuro | vermelho     | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | verde escuro |
| P450 - 2D6 (substrato)           | vermelho       | verde escuro | verde escuro | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | vermelho     | vermelho     |
| P450 - 3A4 (Inibição)            | vermelho       | verde escuro | verde escuro | verde escuro | vermelho                           | vermelho     | verde escuro | verde escuro |
| P450 - 3A4 (Substrato)           | verde escuro   | vermelho     | verde claro  | vermelho     | verde escuro                       | verde escuro | verde claro  | vermelho     |
| SklogD                           | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | vermelho     |
| SklogP                           | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | vermelho     |
| logS (tampão)                    | verde escuro   | verde escuro | verde escuro | verde escuro | vermelho                           | verde escuro | verde escuro | vermelho     |
| logS (água pura)                 | verde escuro   | verde escuro | vermelho     | verde escuro | verde escuro                       | verde escuro | verde escuro | vermelho     |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis.  $\alpha$ -lap -  $\alpha$ -lapachona;  $\beta$ -lap -  $\beta$ -lapachona; lap – lapachol; atov – atovaquona

As substâncias **2d**, **3d**, **3h**, **4b-4d** tiveram valores de predição menores que 0,1 para **BHE** (Barreira HematoEncefálica - concentração no cérebro/concentração no sangue) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo – Tabelas A1 a A4– propriedade A), estas substâncias apresentaram baixa absorção pelo SNC, o que é uma propriedade favorável. As substâncias **1a-1h**, **4a** e **lapachol** foram estimadas com média absorção pelo SNC (valores entre 0,1 e 2). Para as substâncias **2a-2c**, **2e-2h**, **3a-3c**, **3e-3g**,  $\alpha$ -lapachona;  $\beta$ -lapachona e atovaquona foi prevista com propriedade desfavorável - alta absorção pelo SNC (valores >2).

Analisando os valores preditivos da **permeabilidade cutânea** (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo Tabelas A1 a A4– propriedade O), que está representado por logKp, cm/hora, todas as substâncias apresentaram valores de predição favoráveis entre -1 e -5.

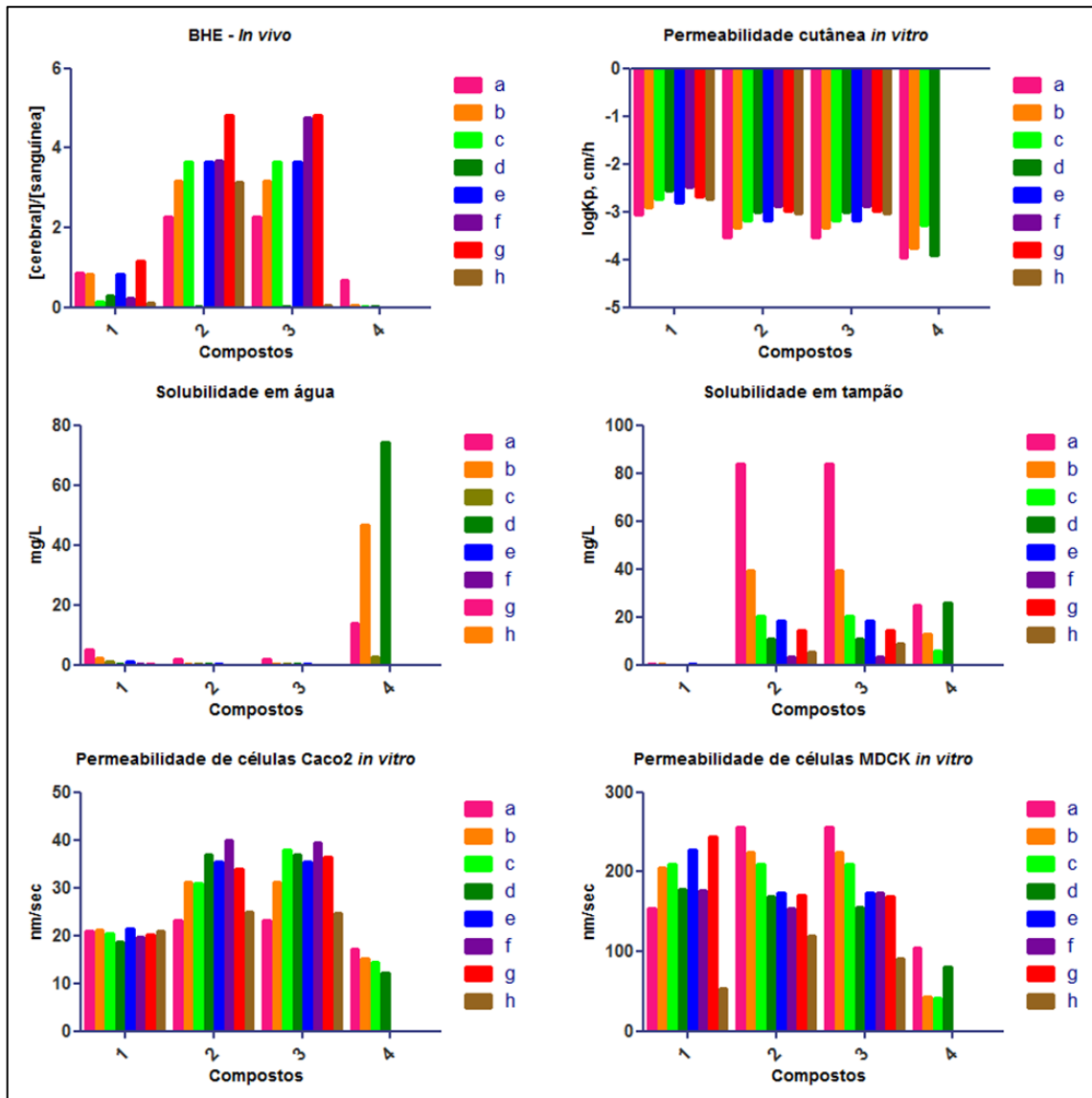
Distintos valores para predição de **solubilidade em água** (mg/L) foram preditos para as substâncias (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo Tabelas A1 a A4–propriedade N), sendo que a maioria delas apresentou predição desfavorável (solubilidade baixa): **1a-1h; 2a-2h; 3a-3h; 4c;  $\alpha$ -lapachona;  $\beta$ -lapachona e atovaquona**. Apresentaram valores de predição moderados: **4a, 4b e lapachol**. A única substância que apresentou uma predição favorável (alta solubilidade) foi **4d**.

Em relação à predição de **solubilidade** das substâncias em **solução tamponada** em mg/L (pH 7,4) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo Tabelas A1 a A4–propriedade B) observou-se que as substâncias **2a, 3a** apresentaram os maiores valores de predição de solubilidade (mg/L) em sistema tamponado, ou seja substâncias com alta solubilidade (predição favorável). As substâncias que apresentaram uma solubilidade baixa, predição desfavorável, foram: **1a -1h, 2f, 2h, 3f, 3h, 4c,  $\alpha$ -lapachona;  $\beta$ -lapachona e atovaquona**.

Em relação à **permeabilidade preditiva em células Caco2 *in vitro*** (nm/sec), todas as substâncias apresentam absorção média (IRVINE et al., 1999; YAMASHITA et al., 2000) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo Tabela A1 a A4–propriedade C), ou seja valores entre 4 e 70 nm/sec.

Para os testes de **permeabilidade preditiva em células MDCK** (nm/sec) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 1; Anexo Tabelas A1 a A4– propriedade K) a maioria das substâncias apresentou alta permeabilidade, ou seja valores maiores que 70 (predição favorável). As substâncias **4b, 4c, 1h e atovaquona** apresentaram média absorção, valores entre 4 e 70 nm/sec.

**Gráfico 1-** Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, de acordo com o programa PreADMET. Propriedades: BHE (barreira hematoencefálica) *in vivo*; permeabilidade cutânea *in vitro*; solubilidade das substâncias em água e solução tamponada; permeabilidade em células Caco2 *in vitro*, permeabilidade em células MDCK *in vitro*



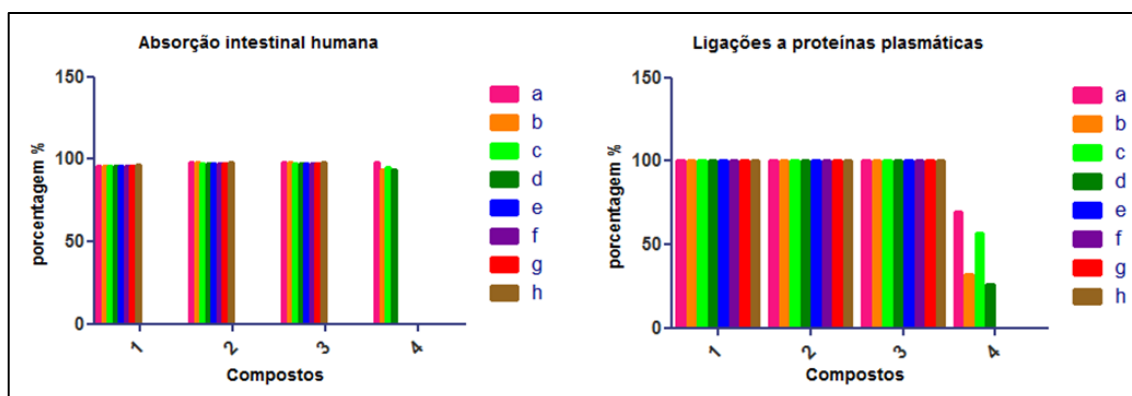
**Legenda:** HNQs (série 1a-h), *orto*-furanaftoquinias (série 2a-h), *para*-furanonaftoquinonas (série 3a-h), e AMQs (4a-4b)

Avaliando os valores preditivos da porcentagem de **absorção intestinal humana** (Tabelas 6 a 9, Gráfico 2; Anexo Tabelas de A1 a A4– propriedade J;), as substâncias apresentaram valores de absorção maiores que 93%, que é favorável para todas as substâncias.

Em relação às predições de **ligações a proteínas plasmáticas** (Tabelas 6 a 9, Gráfico 2; Anexo Tabelas de A1 a A4 – propriedade M) apresentam ligações

químicas fortes, ou seja valores >90% (predição desfavorável), as substâncias **1a-1h**, **2a-2h**, **3a-3h**,  **$\beta$ -lapachona**, **lapachol** e **atovaquona**. As substâncias **4a-4d**, e  **$\alpha$ -lapachona** apresentam ligações fracas (predição favorável) .

**Gráfico 2-** Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, realizadas pelo programa PreADMET. Propriedades: absorção intestinal humana e ligações a proteínas plasmáticas



Legenda: HNQs (série 1a-h), *orto*-furanftoquininas (série 2a-h), *para*-furanonaftoquinonas (série 3a-h), e AMQs (4a-4b)

As substâncias **1a-1h**; **2a-2c**; **2g**; **3a**; **4a-4d**;  **$\alpha$ -lapachona**,  **$\beta$ -lapachona** e **lapachol** não são **inibidores da gpP** (Tabelas 6 a 9, Anexo Tabelas A1 a A4– propriedade L), caracterizando uma predição favorável. Por outro lado, as substâncias **2d-2f**, **2h**, **3b-3h** e **atovaquona** são **inibidores da gpP** (predição desfavorável), de acordo com o programa PreADMET.

As predições pelo programa PreADMET, em relação a algumas enzimas da família do **citocromo P450**, são apresentadas abaixo (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4– propriedade D-I):

•**P450 2C19 (inibição)**: as substâncias foram preditas como inidores dessa enzima (propriedade desfavorável), com exceção de **4b-4d**.

•**P450 2C9 (inibição)**: as substâncias foram preditas como inibidores da enzima (propriedade desfavorável), com exceção de **4b e 4d**.

•**P450 2D6 (inibição)**: as substâncias apresentaram predição favorável em relação a essa propriedade - **não** são inibidores da enzima, com exceção de **4c**.

•**P450 2D6 (substrato)**: as substâncias foram preditas como **não** sendo substratos da enzima (predição desfavorável), com exceção de **4b-4d**.

•**P450 3A4 (inibição)**:

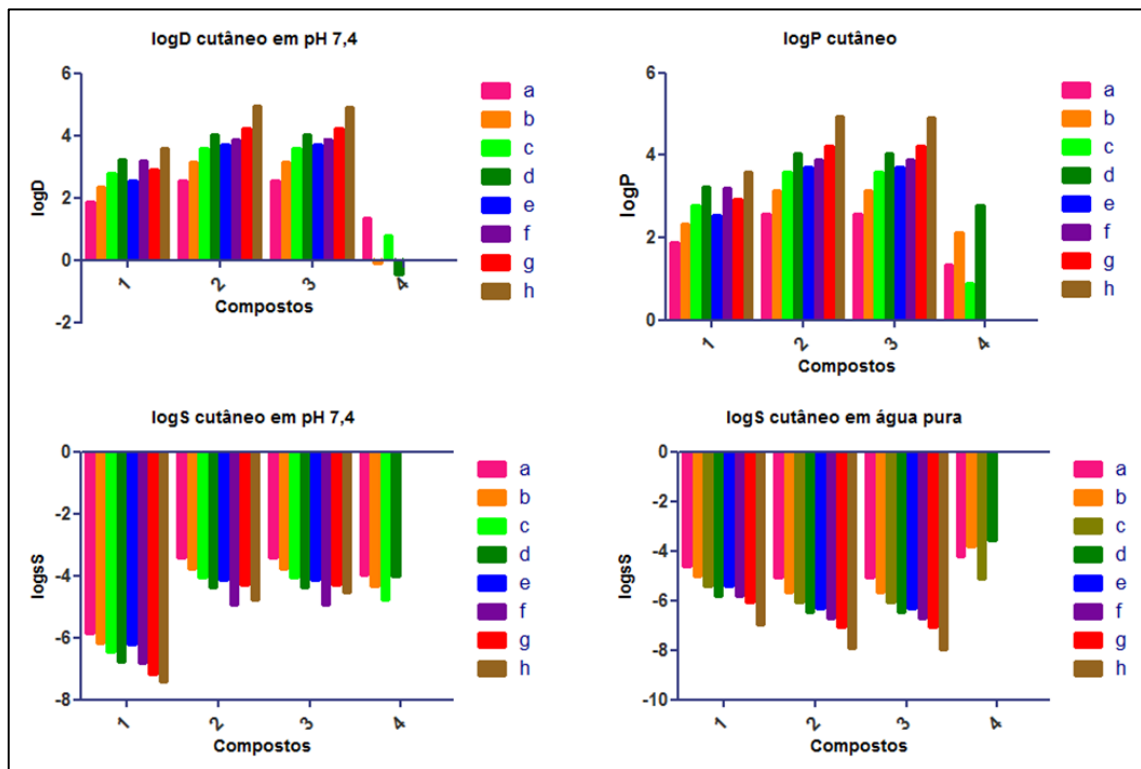
•São inibidores (predição desfavorável): **2a-2h, 3a-3h, 4a,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona.**

•Não são inibidores (predição favorável): **1a-1h, 4b-4d, lapachol e atovaquona.**

•**P450 3A4 (substrato):** apenas as substâncias **1f, 2f, 3f, 4a,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona** foram preditas como substratos para essa enzima (predição favorável).

Em relação aos valores dos **sklogD** (log D para a permeabilidade cutânea) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 3; Anexo Tabelas de A1 a A4– propriedade P), as substâncias apresentaram valores de predição entre -1 e 4 (OPREA, 2002), com exceção das substâncias **2d, 2g, 2h, 3d, 3g, 3h e atovaquona**. As exceções representam substâncias com baixa capacidade de permeabilidade cutânea (predição desfavorável).

**Gráfico 3-** Gráfico de barras com valores para propriedades ADME, de acordo com o programa PreADMET. Propriedades: logD cutâneo, logP cutâneo, logS cutâneo em pH 7, 4; logS cutâneo em água pura



**Legenda:** HNQs (série 1a-h), *orto*-furanftoquinas (série 2a-h), *para*-furanonaftoquinonas (série 3a-h), e AMQs (4a-4b)

Em relação aos valores do **sklogP** (log P para a permeabilidade cutânea) (Tabelas 6 a 9, Gráfico 3; Anexo Tabelas de A1 a A4– propriedade Q), as substâncias apresentaram valores <5 (OPREA, 2002), ou seja, são substâncias com alta capacidade de permeabilidade cutânea (predição favorável).

Segundo Huuskonen e colaboradores (HUUSKONEN et al., 1998) os valores de **logS** para a maioria dos fármacos devem ser entre -5 e -1 (Tabelas 6 a 9, Gráfico 3; Anexo Tabelas de A1 a A4– propriedades R e S). Para os valores de **log S em solução tamponada** (Tabelas 6 a 9, Gráfico 3; Anexo Tabelas de A1 a A4 – propriedade R), as substâncias que apresentaram valores preditos favoráveis foram: **2a-2h, 3a-3h, 4a-4d,  $\beta$ -lapachona e lapachol**. Já para os valores de **logS em água** (Tabelas 6 a 9, Gráfico 3; Anexo Tabelas de A1 a A4 – propriedade S), valores de predição entre -5 e -1 foram preditos para: **1a, 4a, 4b, 4d,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e lapachol** (predição favorável).

### 6.2.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET

Em resumo, os resultados sobre a predição das propriedades toxicológicas consta nas Tabelas 10 a 13, para todas as substâncias das séries HNQs (**1a-h**), *orto*-FNQs (**2a-h**), *para*-FNQs (**3a-h**), amino derivados da Lawsona (**4a- d**),  **$\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol e atovaquona**.

Considerando a predição de inibição dos **canais de hERG** (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas de A5 a A8– propriedade D), todas as substâncias foram preditas com um risco médio de cardiotoxicidade (predição intermediária), com exceção da  **$\alpha$ -lapachona** (predição favorável).

**Tabela 10-** Resumo da predição das propriedades toxicológicas das HNQs, pelo programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias –HNQs<br>Série 1 |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------------------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
|                                  | a                            | b | c | d | e | f | g | h |
| hERG                             |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| Teste de Ames                    |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em camundongos |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em ratos       |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (com ativação)             |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (sem ativação)             |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (com ativação)            |                              |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (sem ativação)            |                              |   |   |   |   |   |   |   |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 11-** Resumo da predição das propriedades toxicológicas das *orto*-FNQs, pelo programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias <i>orto</i> -FNQs– Série2 |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
|                                  | a                                     | b | c | d | e | f | g | h |
| hERG                             |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| Teste de Ames                    |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em camundongos |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em ratos       |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (com ativação)             |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (sem ativação)             |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (com ativação)            |                                       |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (sem ativação)            |                                       |   |   |   |   |   |   |   |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 12-** Resumo da predição das propriedades toxicológicas das *para*-FNQs, pelo programa PreADMET

| Propriedades                     | Substâncias <i>para</i> -FNQs – Série 3 |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                                  | a                                       | b | c | d | e | f | g | h |
| hERG                             |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Teste de Ames                    |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em camundongos |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Carcinogenicidade em ratos       |   |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (com ativação)             |   |   |   |   |   |   |   |   |
| TA100 (sem ativação)             |   |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (com ativação)            |   |   |   |   |   |   |   |   |
| TA1535 (sem ativação)            |   |   |   |   |   |   |   |   |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis

**Tabela 13-** Resumo da predição das propriedades toxicológicas das AMQs e naftoquinonas naturais e atovaquona, pelo programa PreADMET

| Propriedades                     | AMQs (Série 4) |   |   |   | Naftoquinonas naturais e sintética |              |     |      |
|----------------------------------|----------------|---|---|---|------------------------------------|--------------|-----|------|
|                                  | a              | b | c | d | $\alpha$ -lap                      | $\beta$ -lap | lap | atov |
| hERG                             |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| Teste de Ames                    |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| Carcinogenicidade em camundongos |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| Carcinogenicidade em ratos       |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| TA100 (com ativação)             |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| TA100 (sem ativação)             |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| TA1535 (com ativação)            |                |   |   |   |                                    |              |     |      |
| TA1535 (sem ativação)            |                |   |   |   |                                    |              |     |      |

Legenda: verde escuro – propriedades favoráveis; verde claro – propriedades intermediárias; vermelho – propriedades desfavoráveis.  $\alpha$ -lap -  $\alpha$ -lapachona;  $\beta$ -lap -  $\beta$ -lapachona; lap - lapachol; atov – atovaquona

Analisando a predição **carcinogenicidade em camundongos** (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade B) apenas as substâncias **4a** e **4c** não foram carcinogênicas (predição favorável). Já em relação à predição da **carcinogenicidade em ratos** (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade C), **1a-1h**, **4a-4d**,  **$\alpha$ -lapachona**, e  **$\beta$ -lapachona** foram preditos como não carcinogênicos, enquanto as substâncias **2a-2h**, **3a-3h**, e **lapachol** foram preditas como carcinogênicas.

Em relação à predição de mutagenicidade pelo **Teste de Ames** (AMES et al., 1992) (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade A) todas as substâncias foram preditas como potenciais mutagênicos – predição desfavorável.

Considerando as análises da predição de mutagenicidade pelo **Teste de Ames *in vitro* – cepa TA100 (ativação metabólica por homogeneizado de fígado de rato)** (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade E), apenas as substâncias **4b, 4c, 4d, lapachol e atovaquona** apresentaram resultados preditivos negativos em relação à capacidade carcinogênica (propriedade favorável).

Para o **Teste de Ames *in vitro*- cepa TA100 (sem ativação metabólica)** (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade F), somente para a **atovaquona** não foi predita atividade mutagênica.

De acordo com as análises de predição de mutagenicidade pelo **Teste de Ames *in vitro* – cepa TA1535** (ativação metabólica por homogeneizado de fígado de rato) (Tabelas 10 a 13, Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade G), as substâncias apresentaram as seguintes classificações:

•**Negativas (Não mutagênicas) – predição favorável para: 1a-1h, 2b-2d, 2f-2h, 3c, 3d, 3f, 3h, 4a-4d, lapachol e atovaquona.**

•**Positivas (Mutagênicas) – predição desfavorável para: 2a, 2e, 3a, 3b, 3e, 3g,  $\alpha$ -lapachona, e  $\beta$ -lapachona.**

Os resultados da predição para o Teste de Ames *in vitro* - **cepa TA1535** (sem ativação metabólica) (Anexo Tabelas A5 a A8 – propriedade H), permitiram classificar as substâncias avaliadas *in silico* da seguinte forma:

•**Negativas (Não mutagênicas) – predição favorável para: 1c-1h, 2a, 2e-2h, 3a, 3e-3h, 4a,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol e atovaquona.**

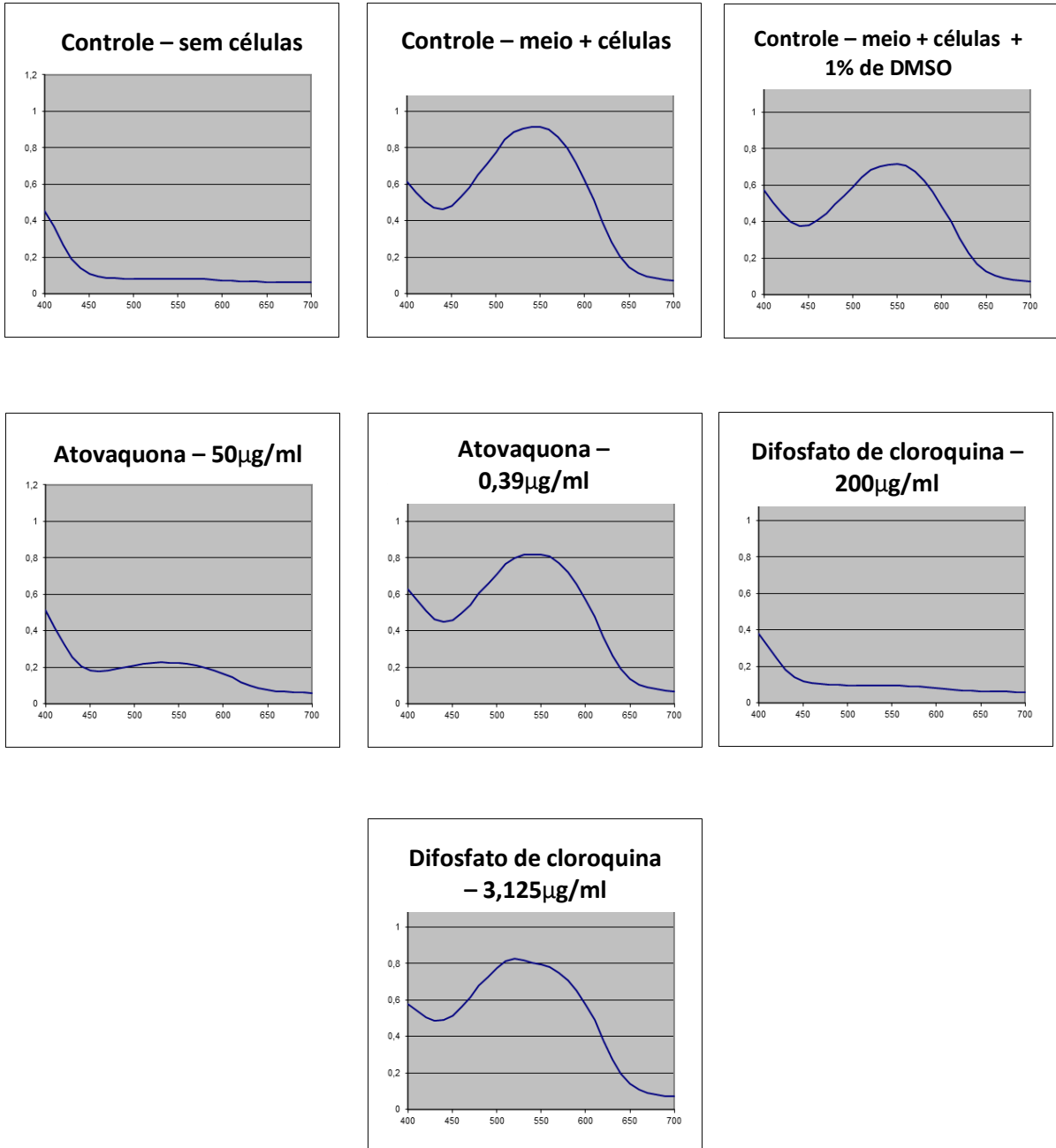
•**Positivas (Mutagênicas) – predição desfavorável para : 1a, 1b, 2b-2d, 3b-3d, e 4b-4d.**

### **6.3 Validação do método de determinação de citotoxicidade pelo teste do MTT – {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difenil tetrazólio]}**

Para validar o MTT como um método para determinação de citotoxicidade *in vitro* foram calculadas as porcentagens de redução das células viáveis, em dois tempos (90 min e 4 horas) e foram registradas as curvas de absorção na faixa de 400 a 700 nm, sendo que, em ambos os tempos (90 min e 4 horas) foram observados resultados semelhantes. Esses resultados permitiram estabelecer a

realização do ensaio de citotoxicidade do MTT no tempo de 90 min e a leitura no comprimento de 540nm (Gráfico 4).

**Gráfico 4- Curvas de absorção para substâncias padrão, no tempo de 90 min, em espectrofotômetro (Infinite M200Pro – TECAN), para o ensaio de citotoxicidade com células HepG2**



#### 6.4 Atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum* (W2) (pLDH) e citotoxicidade em células HepG2 (MTT)

Foram realizados os testes de atividade antiplasmódica, pelo método pLDH, das substâncias  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona sendo que os resultados para as demais substâncias constam na publicação em anexo (BORGATI, 2017). Estas substâncias,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona, apresentaram atividade antiplasmódica moderada, com valores médios de  $CI_{50}$  de 22,64  $\mu$ M e 37,82  $\mu$ M, respectivamente (Tabela 14). Em seguida, foram realizados os testes de citotoxicidade em células HepG2 sendo a  **$\beta$ -lapachona mais citotóxica que a  $\alpha$ -lapachona** (Tabela 15). Ambas as substâncias apresentaram baixos valores de IS, ou seja <5, para  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona, respectivamente, 1,36 e 0,17 (Tabela 16).

**Tabela 14-** Concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) para  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona contra o *Plasmodium falciparum* (W2)

| Substâncias         |            | $CI_{50}$ ( $\mu$ M) |       |       | Média | DesvPad |
|---------------------|------------|----------------------|-------|-------|-------|---------|
|                     | MM (g/mol) | EX1                  | EX2   | EX3   |       |         |
| $\alpha$ -lapachona | 242,27     | 20,43                | 25,01 | 22,49 | 22,64 | 2,29    |
| $\beta$ -lapachona  | 242,27     | 33,80                | 38,18 | 41,48 | 37,82 | 3,85    |
| CQ                  | 319,88     | 0,28                 | 0,31  | 0,26  | 0,28  | 0,03    |

Legenda: MM – Massa Molar; EX – Experimento; Desvpad – Desvio padrão.

**Tabela 15-** Concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) para  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona contra células HepG2

| Substâncias         |            | $CC_{50}$ ( $\mu$ M) |        |        | Média  | DesvPad |
|---------------------|------------|----------------------|--------|--------|--------|---------|
|                     | MM (g/mol) | EX1                  | EX2    | EX3    |        |         |
| $\alpha$ -lapachona | 242,27     | 29,51                | 33,76  | 29,06  | 30,78  | 2,59    |
| $\beta$ -lapachona  | 242,27     | 5,09                 | 7,76   | 6,52   | 6,46   | 1,34    |
| CQ                  | 319,88     | 312,61               | 297,34 | 304,32 | 304,76 | 7,64    |

Legenda: MM – Massa Molar; EX – Experimento; Desvpad – Desvio padrão.

**Tabela 16-** Valores de  $CC_{50}$ ,  $CI_{50}$  determinados e de IS calculados para  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona

| Substâncias         | $CI_{50}$<br><i>falciparum</i> | P. | $CC_{50}$<br>HepG2 | IS      |
|---------------------|--------------------------------|----|--------------------|---------|
| $\alpha$ -lapachona | 22,64                          |    | 30,78              | 1,36    |
| $\beta$ -lapachona  | 37,82                          |    | 6,46               | 0,17    |
| CQ                  | 0,28                           |    | 304,76             | 1088,43 |

Legenda: MM – Massa Molar; EX – Experimento; Desvpad – Desvio padrão.

## 6.5 Citotoxicidade *in vitro*

### 6.5.1 Citotoxicidade em células LLC-PK1 (células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco)

Foram realizados testes para determinação da concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ) das células LLC-PK1 (Passagem 33 a 43), pelo método do MTT (MOSMANN, 1983; com modificações), das seguintes substâncias (Tabela 17):

Lapachol,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, atovaquona, difosfato de cloroquina (CQ);

➤HNQs: 2-hidróxi-1,4-naftoquinonas (**1a - 1h**);

➤*orto*-FNQs: *orto*-furanonaftoquinonas (**2a - 2g**). Não foi possível testar a substância **2h**, pois a quantidade disponível não era suficiente.

➤*para*-FNQs: *para*-furanonaftoquinonas (**3a - 3g**). Não foi possível testar a substância **3h**, pois a quantidade produzida foi pequena.

➤AMQs: Aminonaftoquinonas (**4a**). **4b, 4c, 4d**, não foram testadas; essas três substâncias foram inativas no teste de atividade antiplasmódica ( $CI_{50}>50\mu\text{g/ml}$ ).

➤Sais formados pela combinação de mefloquina e HNQs (**5a- 5i**)

As HNQs foram as menos citotóxicas com valores de  $CC_{50}$  entre 34,74–209,53 $\mu\text{M}$ , seguidas das *para*-FNQs ( $CC_{50}=3,70$ -127,99 $\mu\text{M}$ ), depois pela *orto*-FNQs ( $CC_{50}=2,49$ -27,50 $\mu\text{M}$ ), e finalmente os sais ( $CC_{50}=5,59$ -21,87 $\mu\text{M}$ ). A aminonaftoquinona **4a** (AMQ) foi a menos citotóxica com  $CC_{50}=361,58\mu\text{M}$ . (Tabela 17).

Entre as naftoquinonas naturais, considerando da substância mais citotóxica para a menos citotóxica, tem-se a seguinte ordem crescente para  $CC_{50}$ :  $\beta$ -lapachona ( $CC_{50}=2,24\mu\text{M}$ );  $\alpha$ -lapachona ( $CC_{50}= 8,93\mu\text{M}$ ); lapachol ( $CC_{50}=289,57\mu\text{M}$ ). A CQ e a

atovaquona foram usadas como controles e apresentaram, respectivamente,  $CC_{50}=41,06\mu\text{M}$  e,  $CC_{50}=210,60\mu\text{M}$  (Tabela 17).

Comparando os grupos de substâncias (médias dos  $CC_{50}$ ) no programa **Prism 5** (Tabela 18), pelo teste de Tukey's ( $P<0,05$ ), as HNQs apresentaram diferença significativa em relação às *orto*-FNQs e os sais; os demais grupos, quando comparados entre si, não apresentaram diferença estatística significativa (**Gráfico 5**).

**Tabela 17- Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC<sub>50</sub>) de células renais de porco - LLC-PK1 - testadas contra as substâncias avaliadas pelo Teste do MTT**

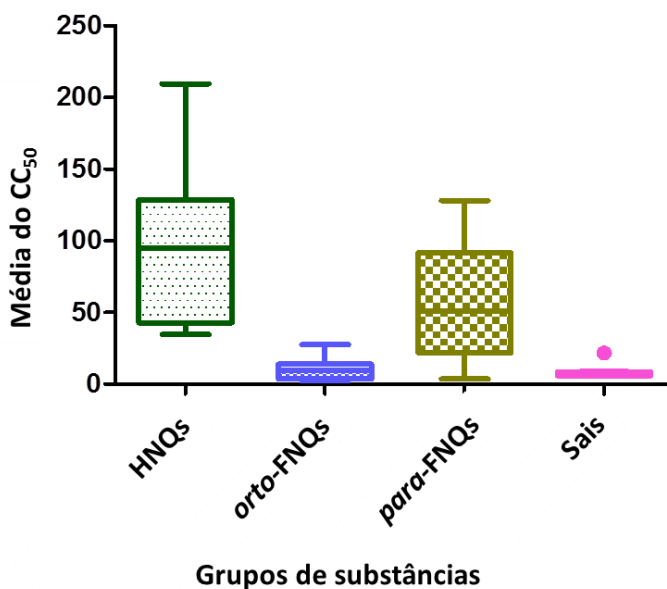
| Substâncias | CC <sub>50</sub> (µM) |        |        |        |               |         |
|-------------|-----------------------|--------|--------|--------|---------------|---------|
|             | MM (g/mol)            | EX1    | EX2    | EX3    | Média         | DesvPad |
| 1a          | 214,22                | 104,80 | 94,29  | 106,24 | <b>101,78</b> | 6,52    |
| 1b          | 228,25                | 32,16  | 36,67  | 35,40  | <b>34,74</b>  | 2,33    |
| 1c          | 242,27                | 135,55 | 135,88 | 121,39 | <b>130,94</b> | 8,27    |
| 1d          | 256,3                 | 65,04  | 53,69  | 62,31  | <b>60,35</b>  | 5,92    |
| 1e          | 242,27                | 93,94  | 79,00  | 92,50  | <b>88,48</b>  | 8,24    |
| 1f          | 290,09                | 37,95  | 31,64  | 41,47  | <b>37,02</b>  | 4,98    |
| 1g          | 276,29                | 206,85 | 220,17 | 201,56 | <b>209,53</b> | 9,59    |
| 1h          | 310,73                | 119,11 | 118,49 | 128,79 | <b>122,13</b> | 5,78    |
| 2a          | 212,02                | 2,50   | 4,43   | 3,87   | <b>3,60</b>   | 0,99    |
| 2b          | 226,06                | 2,65   | 2,70   | 2,12   | <b>2,49</b>   | 0,32    |
| 2c          | 240,08                | 6,04   | 6,33   | 8,54   | <b>6,97</b>   | 1,37    |
| 2d          | 254,09                | 14,25  | 10,86  | 8,22   | <b>11,11</b>  | 3,02    |
| 2e          | 240,08                | 27,78  | 25,91  | 28,82  | <b>27,50</b>  | 1,47    |
| 2f          | 288,08                | 8,64   | 12,18  | 21,14  | <b>13,99</b>  | 6,44    |
| 2g          | 274,27                | 7,95   | 11,96  | 9,37   | <b>9,76</b>   | 2,03    |
| 3a          | 212,02                | 76,60  | 66,74  | 68,06  | <b>70,47</b>  | 5,35    |
| 3b          | 226,06                | 4,07   | 2,83   | 4,20   | <b>3,70</b>   | 0,76    |
| 3c          | 240,08                | 25,07  | 29,95  | 28,24  | <b>27,75</b>  | 2,48    |
| 3d          | 254,09                | 16,61  | 28,22  | 20,98  | <b>21,94</b>  | 5,86    |
| 3e          | 240,08                | 58,94  | 44,78  | 48,36  | <b>50,69</b>  | 7,36    |
| 3f          | 288,08                | 121,70 | 134,68 | 127,60 | <b>127,99</b> | 6,50    |
| 3g          | 274,27                | 85,32  | 96,80  | 92,86  | <b>91,66</b>  | 5,83    |
| 4a          | 230,22                | 362,04 | 369,34 | 353,36 | <b>361,58</b> | 8,00    |
| 5a          | 592,54                | 6,97   | 8,71   | 5,35   | <b>7,01</b>   | 1,68    |
| 5b          | 606,57                | 7,73   | 5,26   | 5,72   | <b>6,24</b>   | 1,31    |
| 5c          | 620,59                | 8,23   | 9,46   | 6,30   | <b>8,00</b>   | 1,59    |
| 5d          | 634,62                | 10,30  | 5,59   | 7,77   | <b>7,89</b>   | 2,36    |
| 5e          | 620,59                | 6,54   | 7,30   | 6,62   | <b>6,82</b>   | 0,42    |
| 5f          | 668,64                | 5,44   | 5,91   | 6,03   | <b>5,79</b>   | 0,31    |
| 5g          | 654,61                | 6,54   | 5,12   | 5,10   | <b>5,59</b>   | 0,83    |
| 5h          | 689,05                | 20,17  | 26,67  | 18,76  | <b>21,87</b>  | 4,22    |
| 5i          | 620,59                | 8,86   | 7,60   | 9,83   | <b>8,76</b>   | 1,12    |
| α-lapachona | 242,27                | 10,08  | 7,47   | 8,23   | <b>8,59</b>   | 1,34    |
| β-lapachona | 242,27                | 2,27   | 1,61   | 2,85   | <b>2,24</b>   | 0,62    |
| Lapachol    | 242,27                | 281,26 | 289,47 | 286,48 | <b>285,74</b> | 4,16    |
| Atovaquona  | 366,84                | 216,47 | 209,90 | 205,43 | <b>210,60</b> | 5,55    |
| CQ          | 319,88                | 45,98  | 43,04  | 41,17  | <b>43,40</b>  | 2,42    |

**Legenda:** MM – massa molar; **EX1**– experimento 1; **EX2**- experimento 2; **EX3**- experimento 3; **DesvPad**- desvio padrão. Controles: lapachol, atovaquona e difosfato de cloroquina

**Tabela 18-** Resultados do teste de Tukey's realizado pelo programa Prism 5, comparando as médias dos valores das  $CC_{50}$  nos diferentes grupos de substâncias

| Teste de Tukey (comparação múltipla)   | Diferença da Média | q      | Significativo $P < 0.05$ | Resumo | 95% CI          |
|--|--------------------|--------|--------------------------|--------|-----------------|
| HNQs vs <i>orto</i> -FNQs              | 87,35              | 6,595  | Yes                      | ***    | 36.05 to 138.6  |
| HNQs vs <i>para</i> -FNQs              | 41,81              | 3,157  | No                       | Ns     | -9.489 to 93.10 |
| HNQs vs SAIS                           | 89,46              | 7,194  | Yes                      | ***    | 41.30 to 137.6  |
| <i>orto</i> -FNQs vs <i>para</i> -FNQs | -45,54             | 3,329  | No                       | ns     | -98.52 to 7.439 |
| <i>orto</i> -FNQs vs SAIS              | 2,111              | 0,1637 | No                       | ns     | -47.84 to 52.06 |
| <i>para</i> -FNQs vs SAIS              | 47,65              | 3,695  | No                       | ns     | -2.298 to 97.60 |

**Gráfico 5-** Comparação entre as médias dos valores de  $CC_{50}$ , em células LLC-PK1, dos diferentes grupos de substâncias



### 6.5.2 Citotoxicidade em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), Neuro-2A (Neuroblastoma de camundongos) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano)

Foram determinadas as  $CC_{50}$  em células A549 (Passagens 36 a 46), células Neuro-2A (Passagens 215 a 225) e MRC-5 (Passagens 17 a 27) pelo método do MTT. Foram selecionadas para estes testes as substâncias que apresentaram atividade antiplasmódica  $CI_{50} < 100 \mu M$  e  $IS > 5$ , conforme consta da Tabela 5 e da tese de Borgati (BORGATI, 2017); e que apresentaram  $CC_{50} > 60 \mu M$ , em células LLC-PK1 (Tabela 19). O teste foi realizado com quatro HNQs (**1a**, **1e**, **1g**, **1h**), com três *para*-FNQs (**3a**, **3f**, **3g**) e uma AMQ (**4a**). Também foram determinados os valores de  $CC_{50}$  das seguintes substâncias: atovaquona,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol e difosfato de cloroquina.

**Tabela 19-** Substâncias selecionadas para os testes de citotoxicidade em células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), neuroblastoma de camundongo (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5); com base no IS ( $CC_{50}$  HepG2/ $CI_{50}$  *P. falciparum*), e nos valores de  $CC_{50}$  em células renais de porco (LLC-PK1)

| Substâncias | IS     | $CC_{50}$ em LLC-PK1 ( $\mu M$ ) |
|-------------|--------|----------------------------------|
| <b>1a</b>   | 9,72   | 101,78                           |
| <b>1e</b>   | >13,85 | 88,48                            |
| <b>1g</b>   | 8,50   | 209,53                           |
| <b>1h</b>   | 8,49   | 122,13                           |
| <b>3a</b>   | 32,73  | 70,47                            |
| <b>3f</b>   | 5,21   | 127,99                           |
| <b>3g</b>   | 5,54   | 91,66                            |
| <b>4a</b>   | >5,51  | 361,58                           |

O resumo dos resultados de  $CC_{50}$  está apresentado na Tabela 20.

As substâncias foram pouco citotóxicas nas células A549 ( $CC_{50}$  entre 105,41-867,81  $\mu M$ ), com exceção da **3a** ( $CC_{50} = 5,84 \mu M$ ).  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona foram muito citotóxicas, respectivamente,  $CC_{50} = 15,59 \mu M$  e  $7,21 \mu M$ .

**Tabela 20-** Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento ( $CC_{50}$ ) de células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), de neuroblastoma de camundongos (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) testadas contra as substâncias avaliadas, através do Teste do MTT

| Substâncias         | MM (g/mol) | $CC_{50}$ ( $\mu$ M)    |                   |                   |
|---------------------|------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
|                     |            | A549                    | Neuro-2A          | MRC-5             |
| 1a                  | 214,22     | 308,44 $\pm$ 5,89       | 156,68 $\pm$ 9,47 | 90,87 $\pm$ 8,44  |
| 1e                  | 242,27     | 214,04 $\pm$ 4,29 $\pm$ | 84,40 $\pm$ 5,22  | 54,91 $\pm$ 5,77  |
| 1g                  | 276,29     | 105,41 $\pm$ 6,53       | 193,10 $\pm$ 6,58 | 169,98 $\pm$ 8,26 |
| 1h                  | 310,73     | 208,24 $\pm$ 4,91       | 45,63 $\pm$ 4,70  | 30,26 $\pm$ 3,51  |
| 3a                  | 212,02     | 5,84 $\pm$ 3,16         | 8,96 $\pm$ 1,67   | 3,66 $\pm$ 0,33   |
| 3f                  | 288,08     | >400                    | 25,92 $\pm$ 6,86  | 15,95 $\pm$ 3,96  |
| 3g                  | 274,27     | 247,08 $\pm$ 9,66       | 160,30 $\pm$ 5,30 | >400              |
| 4a                  | 230,22     | >400                    | >400              | >400              |
| Lapachol            | 242,27     | >400                    | >400              | >400              |
| Atovaquona          | 366,84     | 132,70 $\pm$ 4,23       | 43,44 $\pm$ 3,03  | 54,54 $\pm$ 2,19  |
| $\alpha$ -lapachona | 242,27     | 15,59 $\pm$ 2,48        | 44,47 $\pm$ 2,51  | 10,92 $\pm$ 1,44  |
| $\beta$ -lapachona  | 242,27     | 7,21 $\pm$ 0,49         | 2,09 $\pm$ 1,23   | 2,34 $\pm$ 0,13   |
| CQ                  | 319,88     | 79,68 $\pm$ 3,58        | 50,11 $\pm$ 2,11  | 64,70 $\pm$ 4,59  |

Legenda: MM –massa molar

Nas células Neuro-2A as substâncias mais citotóxicas foram **3a**, **3f**, e **1h**; com valores de  $CC_{50}$  respectivamente 8,96 $\mu$ M; 25,92 $\mu$ M; 45,63 $\mu$ M. A  $\beta$ -lapachona apresentou alta citotoxicidade com  $CC_{50}$  de 2,09 $\mu$ M. Nas células MRC-5 as substâncias apresentaram, no geral, valores menores de  $CC_{50}$  do que nas células A549 e Neuro-2A. As substâncias mais citotóxicas nas células MRC-5 foram respectivamente **3a**, **3f**, **1h** e **1e**, com valores de  $CC_{50}$  de 3,66 $\mu$ M; 15,95 $\mu$ M; 30,26 $\mu$ M e 54,91 $\mu$ M.  $\alpha$  e  $\beta$ -lapachona foram muito citotóxicas nessa célula com valores de  $CC_{50}$  de 10,92  $\mu$ M e 2,34  $\mu$ M, respectivamente.

Para a seleção das substâncias com perfil mais satisfatório como potencial candidato a desenvolvimento como fármaco antimalárico para realizar os demais testes: OECD 129, toxicidade oral aguda *in vivo* (OECD 423) através da extrapolação do resultado obtido pela OECD 129, e teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos, os resultados foram resumidos na Tabela 21.

**Tabela 21-** Resumo dos resultados *in vitro* com os valores de IS ( $CC_{50}$  HepG2 /  $CI_{50}$  *P. falciparum*) e  $CC_{50}$  de testes em células epiteliais do túbulo proximal de rim de porco (LLC-PK1), células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), células de neuroblastoma de camundongos (Neuro-2A) e fibroblasto de pulmão de feto humano (MRC-5) avaliadas contra as substâncias selecionadas

| Substâncias | IS          | $CC_{50}$ em LLC-PK1 ( $\mu$ M) | $CC_{50}$ em A549 ( $\mu$ M) | $CC_{50}$ em Neuro-2A ( $\mu$ M) | $CC_{50}$ em MRC-5 ( $\mu$ M) |
|-------------|-------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>1a</b>   | 9,72        | 101,78                          | <b>308,44</b>                | <b>156,68</b>                    | <b>90,87</b>                  |
| <b>1e</b>   | >13,85      | 88,48                           | 214,04                       | 84,40                            | 54,91                         |
| <b>1g</b>   | <b>8,50</b> | <b>209,53</b>                   | 105,41                       | <b>193,10</b>                    | <b>169,98</b>                 |
| <b>1h</b>   | <b>8,49</b> | <b>122,13</b>                   | 208,24                       | 45,63                            | 30,26                         |
| <b>3f</b>   | 5,21        | <b>127,99</b>                   | >400                         | 25,92                            | 15,95                         |
| <b>3g</b>   | 5,54        | 91,66                           | <b>247,08</b>                | <b>160,30</b>                    | >400                          |
| <b>4a</b>   | >5,51       | <b>361,58</b>                   | >400                         | >400                             | >400                          |
| Lapachol    | >5,23       | <b>285,74</b>                   | >400                         | >400                             | >400                          |

Dentre as substâncias avaliadas destacam-se quatro apresentando os melhores perfis dentro de cada categoria, em termos de IS, e  $CC_{50}$  nas células LLC-PK1; A549; Neuro-2A e MRC-5. Os melhores valores de índice de seletividade, sendo o IS dado pela razão entre o valor de  $CC_{50}$  para células HepG2 e o valor de  $CI_{50}$  para *P. falciparum* foram aqueles das substâncias **1e**, **1a**, **1g** e **1h**, com valores >13,85; 9,72; 8,50; 8,49, respectivamente.

Comparando os valores de  $CC_{50}$  nas células LLC-PK1, as substâncias menos citotóxicas foram **4a**, **1g**, **3f** e **1h**, com valores de 361,58 $\mu$ M; 209,53 $\mu$ M; 127,99 $\mu$ M e 122,13 $\mu$ M, respectivamente. Nas células A549, os melhores resultados foram para as substâncias **4a** e **3f** ambas com  $CC_{50}$  >400 $\mu$ M, seguidas das substâncias **1a** ( $CC_{50}$ =308,44 $\mu$ M) e **3g** ( $CC_{50}$ =247,08 $\mu$ M).

Nas células Neuro-2A e MRC-5 os melhores valores foram para **4a**, **3g**, **1g** e **1a** com valores respectivos de  $CC_{50}$  nas células Neuro-2A >400 $\mu$ M; 160,30 $\mu$ M; 193,10; 156,68 $\mu$ M e em MRC-5 >400 $\mu$ M; >400 $\mu$ M; 169,98 $\mu$ M; 90,87 $\mu$ M.

Comparando os grupos de substâncias (médias dos  $CC_{50}$ ), em cada célula, no programa **Prism 5**, pelo teste de Tukey's ( $P < 0,05$ ), as substâncias que apresentaram maior diferença significativa foram: a substância **4a** em relação a **1e** e **1h**, seguidas do lapachol quando comparado com as substâncias **1e** e **1h**, e da substância **3f** quando comparada a substância **4a**.

Com base no resumo dos resultados (Tabela 21) foram selecionadas as substâncias **1a** e **1g** que apresentaram os maiores valores de  $CC_{50}$  em três das

quatro células avaliadas, a saber: **1a** (A549, Neuro-2A e MRC-5) e **1g** (LLC-PK1, Neuro-2A e MRC-5).

Em relação à substância padrão testada neste trabalho, a atovaquona e às substâncias naturais lapachol,  $\alpha$  e  $\beta$ -lapachona, o lapachol apresentou o melhor perfil, tendo sido a substância menos citotóxica destas séries avaliadas.

### 6.5.3 OECD 129 – (*guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*)

O teste segundo à OECD 129, das substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** foi realizado com células Balb 3T3 (fibroblastos provenientes do embrião de camundongos). Os resultados estão mostrados nas Tabelas 22 e 23.

**Tabela 22-** Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento ( $CC_{50}$ ) de células Balb 3T3 testadas contra as substâncias avaliadas pela OECD 129

| Substâncias     | $CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |       | Média | DesvPad |
|-----------------|--------------------------------|-------|-------|-------|---------|
|                 | EX1                            | EX2   | EX3   |       |         |
| <b>1a</b>       | 21,23                          | 24,46 | 17,44 | 21,04 | 2,87    |
| <b>1g</b>       | 23,17                          | 27,15 | 20,75 | 23,69 | 2,64    |
| <b>Lapachol</b> | 48,25                          | 52,34 | 55,21 | 51,93 | 2,86    |

**Tabela 23–** Valores de  $LD_{50}$  *in vitro* (OECD 129) que foram utilizados para a extrapolação de dose *in vivo* no teste de toxicidade oral aguda (OECD 423)

| Substâncias     |                | EX1      | EX2      | EX3      | Média     | DesvPad  |
|-----------------|----------------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                 |                |          |          |          |           |          |
|                 | <b>LogLD50</b> | 2,51876  | 2,53736  | 2,48528  | 2,51380   | 0,02155  |
|                 | <b>LD50</b>    | 330,1870 | 344,6355 | 305,6891 | 326,83720 | 16,07527 |
| <b>1g</b>       |                |          |          |          |           |          |
|                 | <b>LogLD50</b> | 2,52992  | 2,55596  | 2,51504  | 2,53364   | 0,01691  |
|                 | <b>LD50</b>    | 338,7817 | 359,7162 | 327,3708 | 341,95623 | 13,39439 |
| <b>Lapachol</b> |                |          |          |          |           |          |
|                 | <b>LogLD50</b> | 2,64896  | 2,66384  | 2,67128  | 2,66136   | 0,00928  |
|                 | <b>LD50</b>    | 445,6152 | 461,1477 | 469,1157 | 458,62620 | 9,75831  |

Com base nos resultados da OECD 129 decidiu-se começar o teste de toxicidade oral aguda (OECD 423) na dose de 300mg/kg que é a dose imediatamente abaixo das  $LD_{50}$  calculadas (Figura 16, Tabela 23).

## 6.6 Toxicidade oral aguda - OECD 423

O estudo de toxicidade oral aguda das substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** foi realizado em camundongos que foram divididos, inicialmente, em dois grupos: um controle negativo (CTL -) e um grupo teste (grupo I). O grupo teste, recebeu as substâncias teste por gavagem, na dose de 300 mg/kg (3% de DMSO, em salina). O grupo controle recebeu apenas salina.

Não foi observada nenhuma morte nos dois grupos do experimento de nenhuma das três substâncias teste. Nenhum sinal de toxicidade foi visualizado, com exceção de uma leve excitação, em todos os animais do grupo teste do lapachol, excitação esta iniciada no sexto dia e terminada no oitavo dia. Não houve ganho ou perda de peso significativa.

Como não houve morte de nenhum camundongo na dose de 300mg/kg, foi realizado um outro teste com um grupo de 3 camundongos que receberam uma dose de 2000mg/kg das substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** (grupo II). Também não foi observada nenhuma morte ou sinal de toxicidade significativo.

Para confirmar, um terceiro grupo recebeu a dose de 2000mg/kg das substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** (grupo III), sendo observados os mesmos achados do grupo anterior (grupo II):

- Os camundongos dos grupos II e III da substância **lapachol** tiveram uma leve excitação iniciada no sétimo dia que finalizou no décimo dia.

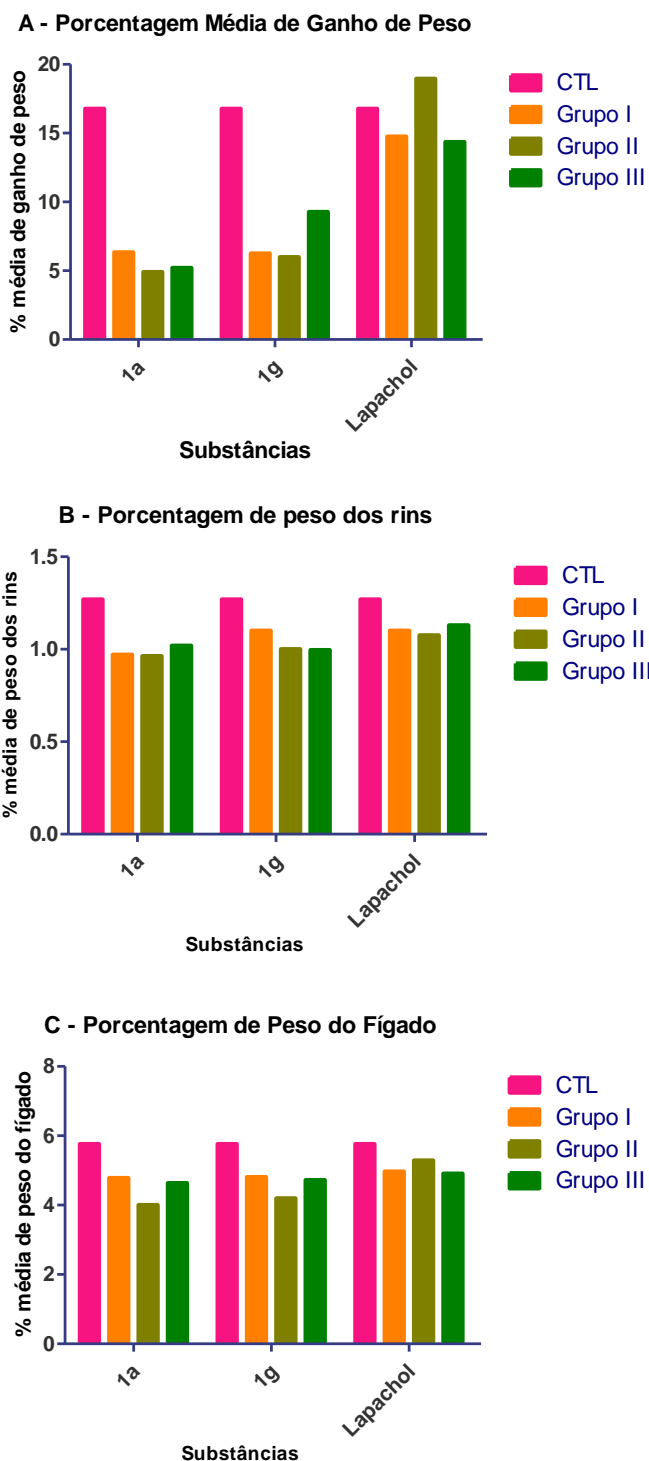
- Os camundongos dos grupos II e III das substâncias **1a** e **1g** apresentaram sinais de elevada excitação no primeiro dia e uma leve excitação no segundo dia. Os sinais de excitação desapareceram no terceiro dia do experimento.

Houve uma morte no grupo III (2000mg/kg), da substância **1g**, camundongo 2, no final do primeiro dia (7 horas após da administração da dose).

No geral, os ensaios demonstraram que as substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** não foram tóxicas para os camundongos nas doses ensaiadas, com exceção de uma morte no grupo III (substância **1g** - 2000mg/kg).

Os resultados dos experimentos estão resumidos no Gráfico 6. Todos os dados, com valores numéricos, do experimento de toxicidade oral aguda estão nas Tabelas do Anexo (Tabelas A9 a A17).

**Gráfico 6**– Resumo dos dados dos experimentos de toxicidade oral aguda (OECD423). (A) - Porcentagem média de ganho de peso dos camundongos, por grupo, durante o experimento. (B) - Porcentagem média do peso dos rins dos camundongos por grupo, no dia da eutanásia. (C) - Porcentagem média do peso do fígado dos camundongos por grupo, no dia da eutanásia, no experimento de Toxicidade Oral Aguda (OECD 423)



**Legenda:** CTL - Grupo controle; Grupo I - 300mg/kg; Grupo II - 2000mg/kg; Grupo III - Repetição da dose de 2000mg/kg

## 6.7 Teste de esquizotocidas sanguíneos em camundongos

Para o experimento com *P. berghei* os animais foram divididos em 5 grupos:

- Grupo I – **Difosfato de Cloroquina (CQ)** (30mg/kg) – Controle tratado
- Grupo II – Substância **1a** (200mg/kg)
- Grupo III – Substância **1g** (200mg/kg)
- Grupo IV – **Lapachol** (200mg/kg)
- Grupo V – **Salina** – Controle não tratado

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos do sangue da cauda dos camundongos, em todos os grupos, no quinto e no nono dia do experimento. Foi demonstrado que apenas a CQ foi capaz de curar a parasitemia dos camundongos infectados. Os resultados da redução da parasitemia consta na Tabela 24. Nenhuma das substância: **1a**, **1g** e **lapachol**, foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais.

**Tabela 24**– Percentual de parasitemia em camundongos inoculados com *P. berghei* ANKA ( $1 \times 10^5$  parasitos - via intra peritoneal) tratados com três doses consecutivas das substâncias 1a, 1g e lapachol na dose de 200mg/kg; difosfato de cloroquina (30mg/kg/dia) ou controle não tratado (salina). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados no 5º e 9º dia após a inoculação. N=5 animais/grupo

| Substâncias     | Percentual de parasitemia |            |
|-----------------|---------------------------|------------|
|                 | 5º dia                    | 9º dia     |
| <b>1a</b>       | 0,69±0,04                 | 12,57±2,62 |
| <b>1g</b>       | 0,76±0,09                 | 14,93±1,37 |
| <b>Lapachol</b> | 0,53±0,06                 | 12,64±3,21 |
| <b>Salina</b>   | 0,71±0,03                 | 13,25±1,98 |
| <b>CQ</b>       | 0                         | 0          |

Os animais do grupo tratado com a CQ sobreviveram até o 60º dia. Os animais dos demais grupos foram eutanasiados ao sinal de sofrimento, como mostrado na Tabela 25.

**Tabela 25– Registro dos dias de eutanásia dos camundongos do experimento *in vivo* com o *Plasmodium berghei***

| <b>Substância</b> | <b>Número do animal</b> | <b>Dia da eutanásia</b> |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>1a</b>         |                         |                         |
|                   | 1                       | 22 <sup>o</sup>         |
|                   | 2                       | 19 <sup>o</sup>         |
|                   | 3                       | 20 <sup>o</sup>         |
|                   | 4                       | 18 <sup>o</sup>         |
|                   | 5                       | 19 <sup>o</sup>         |
| <b>1g</b>         |                         |                         |
|                   | 1                       | 18 <sup>o</sup>         |
|                   | 2                       | 11 <sup>o</sup>         |
|                   | 3                       | 23 <sup>o</sup>         |
|                   | 4                       | 19 <sup>o</sup>         |
|                   | 5                       | 21 <sup>o</sup>         |
| <b>Lapachol</b>   |                         |                         |
|                   | 1                       | 20 <sup>o</sup>         |
|                   | 2                       | 18 <sup>o</sup>         |
|                   | 3                       | 21 <sup>o</sup>         |
|                   | 4                       | 19 <sup>o</sup>         |
|                   | 5                       | 23 <sup>o</sup>         |
| <b>Salina</b>     |                         |                         |
|                   | 1                       | 20 <sup>o</sup>         |
|                   | 2                       | 19 <sup>o</sup>         |
|                   | 3                       | 18 <sup>o</sup>         |
|                   | 4                       | 22 <sup>o</sup>         |
|                   | 5                       | 9 <sup>o</sup>          |

## 7 DISCUSSÃO

A resistência do parasito aos fármacos disponíveis, incluindo aqueles à base de artemisinina e derivados, tem motivado a pesquisa de novos antimaláricos sendo que cerca de 13 novos antimaláricos são relatados como em desenvolvimento clínico, nove dos quais na Fase 2 (WELLS et al., 2015; ASHLEY & PHIO, 2018). A maioria são esquizotomicidas sanguíneos destinadas ao tratamento de malária *falciparum* não complicada. Entre os desafios que marcaram este período destacam-se os crescentes relatos de malária multirresistente a vários medicamentos na sub-região do Grande Mekong, tais como artemisinina, mefloquina e piperaquina (LEANG et al., 2015; AMARATUNGA et al, 2016). A necessidade de novos fármacos para tratar a doença e prevenir a transmissão, resultou na priorização do foco no objetivo a longo prazo de PD&I de novos quimioterápicos na forma de formulações de liberação prolongada. Lacunas no tratamento da doença são novos fármacos para tratar malária grave, tendo em vista à resistência à artemisina (FAIRHURST & DONDORP, 2016; MENARD & DONDORP, 2017) e inseticidas eficazes, para a prevenção. Em última análise, a eliminação da malária requer medicamentos que sejam seguros e bem tolerados para serem usados em populações vulneráveis: na gravidez, especialmente no primeiro trimestre, e naqueles que sofrem de desnutrição ou co-infecção com outros agentes patogênicos (BURROWS et al., 2013; 2017).

Considerando que poucos são os relatos sobre pesquisas de toxicologia pré-clínica, e o interesse na formação de recursos humanos neste tema, planejou-se o presente trabalho que teve início com a síntese de de uma série de naftoquinonas que foram avaliadas quanto a atividade antiplasmódica e citotoxicidade, conforme consta de Borgati (BORGATI, 2017). A seguir são discutidos os resultados que foram apresentados na presente tese.

## 7.1 ADMET *in silico*

### 7.1.1 Predição de ADME pelo programa PreADMET

Um desafio significativo na descoberta de novos fármacos é obter uma farmacocinética favorável ou aceitável dos possíveis candidatos. Esse processo envolve medir e otimizar vários parâmetros para alcançar simultaneamente o melhor equilíbrio de propriedades físico-químicas e potência no alvo terapêutico (BOYER et al., 2007). O principal objetivo das técnicas *in silico* no processo de desenvolvimento de fármacos é a utilização de modelos computacionais que permitam otimizar a seleção de candidatos a fármacos a partir de grandes *pools* de substâncias disponíveis (SHEARER et al., 2005).

Os fármacos que atuam no SNC precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHC) para alcançar seu alvo molecular. Em contraste, para fármacos com um alvo periférico, pouca ou nenhuma penetração de BHC pode ser necessária para evitar os efeitos colaterais no SNC (LANGE & DANHOF, 2002). No presente trabalho, através do programa PreADMET (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4), constatou-se que algumas substâncias apresentaram predição de alta absorção pelo SNC, a saber **2a-2c**, **2e-2h**, **3a-3c**, **3e-3g**,  **$\alpha$ -lapachona**,  **$\beta$ -lapachona** e **atovaquona**. Assim, pode-se prever que essas substâncias podem ser candidatos a fármacos com atuação em casos de malária cerebral. No entanto, se o objetivo for tratar os demais sintomas da malária, as substâncias com predição favorável são **2d**, **3d**, **3h**, **4b-4d**. Estudos recentes com 41 substâncias - 1,4-naftoquinonas (SHIN et al., 2019), buscando substâncias para tratar a doença de Alzheimer, através de *docking* e estudos biofísicos *in vitro*, revelaram que apenas quatro dessas substâncias atravessam na barreira hematoencefálica.

Substâncias com baixa solubilidade aquosa e taxa de dissolução lenta podem levar a uma baixa absorção oral e, portanto, à baixa biodisponibilidade oral. Em geral, baixa solubilidade está relacionada a alta lipofilia, enquanto que as substâncias hidrofílicas geralmente mostram pouca permeabilidade e, portanto, baixa absorção. Portanto, a medida da solubilidade e lipofilia, bem como as constantes de ionização estão altamente relacionadas e são muito importantes no processo PD&I de fármacos (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003). No presente trabalho, as predições pelo Programa PreADMET da solubilidade em

sistema tamponado (pH 7,4) (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4) demonstraram que a maioria das substâncias possui média solubilidade, com valores entre 10,662 a 39,165mg/L (**2b-2e, 2g, 3b-3e, 3g, 4a, 4b, 4d**). Por outro lado, a maioria das substâncias foi predita com baixa solubilidade em água, valores entre 0,003 a 4,930mg/L, com exceção das substâncias **4d, 4a, 4b** e **lapachol** – as três últimas com valores de predição de média solubilidade. Dados da literatura estão de acordo com as predições obtidas nesse trabalho, demonstrando que lapachol (LUI et al., 1985),  $\beta$ -lapachona (JANG et al., 2013) e atovaquona apresentam baixa solubilidade em água (BAGGISH & HILL, 2002).

Nas predições realizadas no presente estudo pelo programa PreAMET, demonstrou-se que as substâncias **1b, 1c, 2c, 3c, 2b, 3b, 1e, 1g, 2a, 3a**; apresentaram os maiores valores (acima de 200nm/sec), para a permeabilidade preditiva em células MDCK, (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4), ou seja, substâncias com alta permeabilidade em membranas celulares. Por outro lado, observou-se que todas as substâncias tiveram uma média absorção, com valores entre 12,153 e 44,093nm/sec, quando suas estruturas foram analisadas em relação à permeabilidade em células Caco2 (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com a plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) (SUMSAKUL & NA-BANGCHANG., 2016), composto ativo isolado de plantas, utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, como malária, leishmaniose, infecções virais e cânceres; com o objetivo de investigar a permeabilidade em células Caco-2 (adenocarcinoma colorretal epitelial humano) e seus efeitos na expressão e função da glicoproteína-P. A resistência elétrica e permeação da plumbagina das direções apical para basolateral e basolateral para apical foram  $10,29-15,96 \times 10^{-6}$  e  $7,40-9,02 \times 10^{-6}$  cm / s, respectivamente, com as taxas de efluxo de 0,57-0,73. Os resultados sugerem permeabilidade moderada da plumbagina através da monocamada de células Caco2 em ambas as direções.

Os xenobióticos são definidos como substâncias químicas às quais um organismo está exposto que são extrínsecos ao metabolismo normal desse organismo. Sem metabolismo, muitos xenobióticos atingiriam concentrações tóxicas. Para muitos fármacos, é necessário que aconteça o metabolismo ou biotransformação, que ocorre parcialmente na parede intestinal, durante a absorção, mas principalmente no fígado. Inicialmente, uma fração da dose inicial do fármaco,

que atinge a veia porta é, então, absorvida, e a fração que atinge a circulação sanguínea, após a primeira passagem através do fígado, vai definir a biodisponibilidade do fármaco. Tradicionalmente, faz-se uma distinção entre metabolismo da fase I e da fase II, embora estes não ocorram necessariamente de forma sequencial. No metabolismo da fase I, a molécula é funcionalizada, por exemplo, através de oxidação, redução ou hidrólise. As enzimas mais importantes envolvidas nesta fase são as da família do citocromo P450. Em particular, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19 são importantes para o metabolismo de fármacos em seres humanos. No metabolismo da fase II, a molécula funcionalizada do fármaco é ainda transformada através das chamadas reações de conjugação que incluem, por exemplo, glicuronidação e sulfatação, bem como a conjugação com glutatona (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003). No presente estudo, a análise das predições das enzimas da família citocromo P450 (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4), demonstraram que as substâncias 4b-4d são substratos para a P450-2D6 enquanto que as substâncias **1f**, **2f**, **3f**, **4a**,  **$\alpha$ -lapachona** e  **$\beta$ -lapachona** são substratos para P450-3A4. Ser um substrato para uma enzima da família P450 é uma propriedade favorável, pois a interação enzima com o substrato facilita a metabolização da substância.

Pesquisas realizadas por Kim e colaboradores (KIM et al., 2013), avaliando os efeitos inibitórios da  $\beta$ -lapachona nas atividades enzimáticas do CYP450 *in vitro*, demonstraram que essa substância tem efeitos inibitórios dependentes da concentração das enzimas do CYP testadas, tempo de exposição e isotipo. Estes resultados estão de acordo com os dados de predição do presente estudo que demonstraram que a  $\beta$ -lapachona apresentou dados desfavoráveis para algumas enzimas da família CYP450, tais como inibição da CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, dificultando assim a metabolização da substância no fígado pelo organismo.

Um dos transportadores mais bem estudados é gpP, um membro da família de transportadores de ATP (ABC – ATP Binding Cassette) que foi identificado primeiro como o transportador responsável pela resistência a múltiplos fármacos (MDR) observado em agentes antitumorais. Estudos realizados por Rijpma e colaboradores (RIJPMA et al., 2014) demonstraram que atovaquona e quinina podem reduzir a atividade do transportador ABC. Atovaquona parece ser um inibidor potente de proteína de resistência ao câncer de mama (PRCM) e a quinina age como um inibidor de gpP *in vitro*. Ambos os compostos inibiram a atividade do

transportador ABC em concentrações que equivalem a concentrações plasmáticas profiláticas e efetivas. Possíveis interações da atovaquona e da quinina com anti-retrovirais e antibióticos foram descritas, o que pode ser explicado pelos efeitos inibitórios observados na atividade de transporte de PRCM e gpP (RIJPM et al., 2014). No presente trabalho foi predita com propriedade desfavorável da atovaquona em relação a proteína gpP.

Gschwind e colaboradores (GSCHWIND et al., 2013) foram os pioneiros na pesquisa com células Caco-2 empregadas para estudar o transporte da proteína gpP em antagonistas de vitamina K (naftoquinona). Os antagonistas de vitamina K são prescritos em todo o mundo e permanecem como o anticoagulante oral de escolha. Essas drogas são caracterizadas por um índice terapêutico baixo e uma grande variabilidade inter e intra-individual. A p-glicoproteína poderia contribuir para essa variabilidade. Foi demonstrado que nenhum dos três antagonistas testados são substratos gpP fortes. Na presente tese, foi demonstrado através da predição realizada pelo programa PreADMET (Tabelas 6 a 9, Anexo – Tabelas A1 a A4), que as HNQs, substâncias **2a-2c**, **2g**, **3a**, **4a-4d**,  **$\alpha$ -lapachona**,  **$\beta$ -lapachona**, e **lapachol** não são inibidores da gpP, o que facilitaria a absorção intestinal, configurando uma característica favorável.

Portanto, nas predições de ADME (Tabelas 6 a 9), a série das AMQS, com um total de 4 substâncias, foi a que apresentou o maior número de propriedades favoráveis para a maioria das substâncias, a saber: 13 propriedades – BHE; permeabilidade cutânea; absorção intestinal humana; ligações à proteínas plasmáticas; inibição da gpP, inibição da P450 – 2C19, P450 – 2D6 e P450 – 3A4; substrato P450 – 2D6; sklogD; sklogP; logS de solução tamponada e água pura; seguido-se as HNQs em número de 8 substâncias, com 8 propriedades favoráveis para a maioria das substâncias – permeabilidade cutânea; permeabilidade em células MDCK; absorção intestinal humana; inibição da gpP; inibição da P450 2D6 e 3A4; sklogD e sklogP; e das naftoquinonas naturais (3 substâncias) e atovaquona com 8 propriedades favoráveis – permeabilidade cutânea; permeabilidade MDCK; absorção intestinal humana; inibição gpP; inibição da P450 – 2D6; sklogD; sklogP; logS água pura. As *orto*-FNQs e *para*-FNQs, com 8 substâncias cada série, tiveram resultados semelhantes nas predições *in silico* apresentando 7 propriedades favoráveis para a maioria das substâncias: permeabilidade cutânea, permeabilidade

em células MDCK, absorção intestinal humana, inibição da P450 2D6, sklogD, sklogP; logS de solução tamponada.

### **7.1.2 Predição de propriedades toxicológicas pelo programa PreADMET**

No ambiente celular encontra-se normalmente equilíbrio entre espécies pró-oxidante e espécies antioxidantes. Ao desbalanço em favor das espécies oxidantes, dá-se o nome de stress oxidativo (HALLIWELL et al., 2007). Várias doenças, entre elas a malária, possuem a característica de suas células estarem em condição de stress oxidativo. Dentre os pró-oxidantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e íons metálicos livres (JAMIER et al., 2010). A formação de espécies reativas de oxigênio é um atributo da vida aeróbica normal, de forma que o desenvolvimento celular em ambiente contendo oxigênio não seria possível sem a presença de um sistema defensivo que conta com poderosas enzimas, bem como componentes não enzimáticos antioxidantes (SIES, 1991). As naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas devido à sua fácil redução e, portanto, à capacidade de atuar como oxidante (PINTO & CASTRO, 2009). Essa propriedade redox promove também a formação de espécies altamente reativas que podem reagir diretamente com o DNA ou outras macromoléculas celulares, como lipídios e proteínas, levando a danos celulares (VILLAMIL et al., 2004), sendo este um mecanismo de ação farmacológica das quinonas.

A toxicidade cardíaca representa uma das principais causas de falha de candidatos a fármacos ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento de fármacos. Vários produtos farmacêuticos muito bem sucedidos tiveram que ser retirados do mercado ou rotulados com avisos de uso rigoroso devido a efeitos cardíacos adversos. Para proteger os pacientes em ensaios clínicos, a Conferência Internacional de Harmonização publicou diretrizes para recomendar que todos os novos fármacos sejam testados pré-clinicamente para a sensibilidade do canal hERG antes de serem submetidos para revisões regulatórias. No entanto, estudos extensivos demonstraram que a medição da atividade hERG tem limitações devido aos múltiplos alvos moleculares dos candidatos à fármacos através dos quais pode mitigar ou abolir uma arritmia potencial e, portanto, um modelo que mede múltiplos efeitos de canais iônicos provavelmente será mais preditivo. Vários métodos

fenotípicos de transferência rápida foram desenvolvidos para prever as potenciais substâncias tóxicas cardíacas nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos utilizando células embrionárias ou cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (LU et al., 2008; BENAY et al., 2015). No presente estudo, observou-se, nos testes preditivos, que todas as substâncias apresentaram um médio risco cardíaco quando avaliadas as predições de inibição dos canais de hERG, com exceção da  $\alpha$ -lapachona (Tabelas 10 a 13, Anexo – Tabelas A5 a A8).

Neste trabalho demonstrou-se, através de testes preditivos, que todas as HNQs, *para*-FNQs, *orto*-FNQs, AMQs (**4b**, **4d**),  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e **atovaquona** foram carcinogênicas para camundongos; apenas as substâncias **4a** e **4c** não foram carcinogênicas (Tabelas 10 a 13, Anexo – Tabelas A5 a A8). Já em relação a carcinogenicidade em ratos, as substâncias **1a-1h**, **4a-4d**,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e **atovaquona** não foram carcinogênicas. A predição de carcinogenicidade em camundongos não impediu a aprovação da **atovaquona**, que é utilizada desde o ano 2000 junto com o Proguanil (Malarone) como quimioprolifática para os viajantes (CHEN & KEYSTONE, 2005).

Estudos de mutagenicidade pelo Teste de Ames, realizados por Hakura e colaboradores (HAKURA et al., 1994) com uma série de treze derivados das naftoquinonas (NQs), em diferentes cepas de *Salmonella*, com e sem ativação metabólica demonstraram que a maioria dos NQs utilizadas neste estudo apresentaram mutagenicidade. A NQ mutagênica mais potente foi a 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona, para a cepa TA104, sem ativação metabólica. As NQs de potencial redox mais elevados foram mais mutagênicas que as NQs de potencial redox mais baixo. Foi observada redução significativa da mutagenicidade das 1,4-naftoquinonas sem ativação metabólica, na presença de catalase.

No presente estudo, as previsões através do teste de Ames foram feitas para as cepas TA100 e TA1535, com e sem ativação metabólica (Tabelas 10 a 13, Anexo – Tabelas A5 a A8). Um maior número de substâncias foram preditas como mutagênicas para a cepa TA100. Não houve previsão de potencial mutagênico (com ativação metabólica) para **4b**, **4c**, **4d**, **lapachol**, **atovaquona** e a previsão foi, também negativa apenas para a **atovaquona** quando sem ativação metabólica. Já para a cepa TA1535 (com ativação metabólica) foram preditas como não mutagênicas as substâncias **1a-1h**, **2b-2d**, **2f-2h**, **3c**, **3d**, **3f**, **3h**, **4a-4d**, **lapachol** e

atovaquona, e para a cepa TA1535 (sem ativação metabólica) as substâncias **1c-1h, 2a, 2e-2h, 3a, 3e-3h, 4a,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona, lapachol e atovaquona** foram preditas como não mutagênicas.

Estudos anteriores com o lapachol demonstraram efeitos clastogênicos tanto em micronúcleos *in vivo* quanto nos ensaios de aberração cromossômica em células da medula óssea de ratos Wistar machos (MAISTRO et al., 2010). Em estudos para investigar a genotoxicidade do lapachol (COSTA et al., 2010), utilizando *Drosophila melanogaster*, através de um teste que avalia a presença de manchas na asa em descendentes de cruzamentos padrão; foi demonstrado que o lapachol exibe uma atividade genotóxica promutagênica.

Poucos são os relatos na literatura sobre genotoxicidade de naftoquinonas. Um destes, se refere ao efeito mutagênico bacteriano fraco na cepa TA98 de *S. typhimurium* (STAMBERG et al., 1979). Em estudos de mutagenicidade com HNQs e benzoquinonas (TIKKANEN et al., 1983), foi demonstrado que seis das dezesseis HNQS foram mutagênicas para a cepa TA 2637 com ativação metabólica, a saber: plumagina, naftazarina, 2-hidroxi-naftoquinona, vitamina K3, juglona e 7-metiljulgona. Nenhuma das treze benzoquinonas testadas foi mutagênica. Foram realizados estudos para avaliar a capacidade de várias quinoneiminas de induzir micronúcleos nas células da medula óssea como uma medida de sua genotoxicidade (SICARDI & FERRATO, 1995), a 2-hidroxi-naftoquinona testada produziu apenas um aumento significativo na frequência de micronúcleos a 50 mg/kg, enquanto que nenhuma atividade mutagênica foi encontrada para a 1,4-naftoquinona-4-imina e a 3,4-dimetil-5-aminoisoxazol nas doses testadas.

Em uma avaliação da genotoxicidade realizada com o principal ingrediente natural da tintura natural de Henna (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (KIRKLAND & MARZIN, 2003), não foram demonstrados efeitos genotóxicos significativos, em ensaios bacterianos (teste de Ames) ou em mamíferos (V79 hprt). Foi sugerido, portanto, que a HNQ contida na Henna, quando utilizada para tingir o cabelo, não representa riscos genotóxicos para o consumidor.

Concluimos em relação aos testes de predição de toxicologia realizados pelo programa PreADMET, as HNQs e as AMQs apresentaram o maior número de propriedades favoráveis ou intermediárias para a maioria das substâncias, 4 propriedades cada, a saber: HNQs (oito substâncias em um total de quarenta e duas) – hERG, carcinogenicidade em ratos, TA1535 com e sem ativação metabólica;

AMQs (4 substâncias em um total de 42): hERG, carcinogenicidade em ratos, TA100 com ativação metabólica e TA1535 com ativação metabólica. As *orto*-FNQs (8 substâncias em um total de 42) apresentaram 3 propriedades favoráveis ou intermediárias: hERG, TA1535 com e sem ativação metabólica. Para as naftoquinonas naturais (3 substâncias em um total de 42) e atovaquona foram preditas 3 propriedades favoráveis ou intermediárias: hERG, carcinogenicidade em ratos, TA 1535 sem ativação. Às *para*-FNQs (8 substâncias em um total de 42) foram atribuídas 2 propriedades favoráveis ou intermediárias: hERG e TA1535 sem ativação metabólica.

## 7.2 Atividade antiplasmódica em *Plasmodium falciparum* (W2) (pLDH)

Como já mencionado anteriormente, o interesse nas propriedades antimaláricas das hidroxinaftoquinonas aumentou desde o desenvolvimento da atovaquona (SRIVASTAVA et al., 1997). No entanto, a sua baixa biodisponibilidade (DRESSMAN & REPPAS 2000) indica a necessidade de modificações químicas, especialmente no grupo alquila da cadeia lateral para produzir novos análogos (SCHUCK et al., 2013). Além disso, o aumento da resistência à atovaquona estimula a busca de análogos para os quais não seja observada resistência do parasito (VAIDYA & MATHER 2000; FIVELMAN et al., 2002).

Em relação às naftoquinonas naturais, no presente trabalho foram testadas  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona (Tabela 14), que não foram avaliadas durante o desenvolvimento do trabalho da tese de Borgati (BORGATI, 2017), cujos resultados constam da Tabela 5. O lapachol foi o primeiro dessas três naftoquinonas naturais a ter sua atividade antimalárica demonstrada experimentalmente em células sanguíneas de pato parasitadas por *P. lophurae* (FIESER et al., 1948b). Posteriormente, ensaios *in vitro* contra *P. falciparum* (linhagens BHZ 23/86 e BHZ 26/86) mostraram uma boa atividade para  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona, inibindo completamente o crescimento de parasitos nas concentrações de 2 e 20  $\mu$ M. A  $CI_{50}$  da  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona foram, respectivamente, 0,18  $\mu$ M e 0,6  $\mu$ M, enquanto que o lapachol foi inativo (CARVALHO et al., 1990).

Recentemente, foi relatado o efeito de lapachol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona contra os estágios eritrocíticos em diferentes cepas de *P. falciparum*, como W2- resistente à cloroquina (KAPADIA et al., 2001; MOREIRA et al., 2015; SOUZA et al., 2014;

BRANDÃO et al., 2018) e cepa F32 - sensível à cloroquina (PÉREZ-SACAU et al., 2005). A partir dos dados da literatura (Tabela 26), infere-se que os valores de  $CI_{50}$  para as três naftoquinonas dependem da metodologia do teste, da cepa do parasito e do tempo de exposição da substância ao parasito. De um modo geral, na literatura citada, a  $\alpha$ -lapachona revelou  $CI_{50}$  mais baixa, seguido por  $\beta$ -lapachona e lapachol. No presente trabalho (Tabela 5 e Tabela 14), os valores de  $CI_{50}$  para  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e lapachol foram respectivamente 22,64, 37,82 e 191,16 $\mu$ M. Deve-se comentar que, em nosso próprio laboratório, usando a mesma metodologia, uma  $CI_{50}$  mais baixa (123,5  $\mu$ M) do lapachol foi previamente determinada, reforçando-se a influência dos efeitos mencionados (Tabela 5).

**Tabela 26–** Dados da literatura para atividade *in vitro* de  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e lapachol contra diferentes cepas de *Plasmodium falciparum*

| Substâncias   | Referência                  | Parasito  | Teste   | Descrição  |
|---|-----------------------------|---|---|--|
| Lapachol<br>$\alpha$ -lapachona<br>$\beta$ -lapachona | Carvalho, 1990              | <i>P. falciparum</i><br>(Cepas BHZ 23/86 e BHZ 26/86) | Teste Tradicional –<br>esfregaço<br>sanguíneo<br>72 horas                                       | $\alpha$ -lapachona<br>Cl <sub>50</sub> : 0,18 $\mu$ M<br><br>$\beta$ -lapachona<br>Cl <sub>50</sub> : 0,6 $\mu$ M<br><br>Lapachol inativo                             |
| Lapachol  | Kapadia et al.,<br>2001     | <i>P. falciparum</i><br>Cepa W2                       | Metódo da<br>incorporação da<br>hipoxantina [ <sup>3</sup> H]-<br>90 horas                      | Lapachol<br>Cl <sub>50</sub> : 42,12 $\mu$ M   |
| Lapachol<br>$\beta$ -lapachona                        | Pérez-Sacau et<br>al., 2005 | <i>P. falciparum</i><br>Cepa F32                      | Teste Tradicional –<br>esfregaço<br>sanguíneo<br>48 horas                                       | $\beta$ -lapachona<br>Cl <sub>50</sub> : 4,1 $\mu$ M<br><br>Lapachol<br>Cl <sub>50</sub> : 24,4 $\mu$ M  |
| Lapachol  | Souza et al.,<br>2014       | <i>P. falciparum</i><br>Cepa W2                       | Teste da detecção<br>qualitativa da<br>proteína II rica em<br>Histidina<br>(HRPII)<br>48 horas. | Lapachol<br>Cl <sub>50</sub> : 93,0 $\mu$ M  |
| Lapachol<br>$\alpha$ -lapachona<br>$\beta$ -lapachona | Moreira et al.,<br>2015     | <i>P. falciparum</i><br>Cepa W2                       | Metódo da<br>incorporação da<br>hipoxantina [ <sup>3</sup> H]-<br>48 horas                      | $\alpha$ -lapachona<br>Cl <sub>50</sub> : 15,8 $\mu$ M<br><br>$\beta$ -lapachona<br>Cl <sub>50</sub> : 20,5 $\mu$ M<br><br>Lapachol<br>Cl <sub>50</sub> : 80,4 $\mu$ M |
| Lapachol  | Brandão et al<br>2018       | <i>P. falciparum</i><br>Cepa W2                       | PfLDH<br>48 horas   | Lapachol<br>Cl <sub>50</sub> : 123,5 $\mu$ M   |

Durante a execução do projeto desta tese foi avaliada a atividade antiplasmódica da  $\alpha$ -lapachona e da  $\beta$ -lapachona, que apresentaram valores médios de Cl<sub>50</sub> de 22,64  $\mu$ M e 37,82  $\mu$ M, respectivamente. A atividade antiplasmódica das demais substâncias (séries de 1 a 5, respectivamente, HNQs, *orto*-FNQ, *para*-FNQ, AMQs e sais de mefloquina e HNQs ou lapachol) foi descrita pela Dra. Tatiane Borgati (BORGATI, 2017). Na presente etapa as substâncias 4b-d foram descartadas por não terem apresentado atividade contra o *P. falciparum* (W2), no trabalho anterior.

No presente trabalho foi analisado o índice de seletividade, que é dado pela razão entre o valor de CC<sub>50</sub> para células HepG2 e o valor de Cl<sub>50</sub> para *P. falciparum* de todas as substâncias, a saber: resultados da Tese da Dra Tatiane Borgati

(BORGATI, 2017) e Tabela 5; e resultados da presente tese (Tabelas 14 a 16) Por meio do IS é possível inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos celulares. Foi demonstrado que as HNQs (**1a-1h**) apresentaram valores de IS entre 0,21 e >13,85; as *orto*-FNQs IS entre de 0,15 e 3,45; as *para*-FNQs IS entre 0,43-32,73. Toda as 4 substâncias da série das AMQs apresentaram o mesmo valor de IS <6,67, isso se deve ao fato de todas elas serem inativas no teste antiplasmódico para a cepa W2, e não apresentarem citotoxicidade para as células HepG2. As substâncias que apresentaram o melhor valor de IS foram as da série 5 (**5a-5i**), com valores de IS entre 71,11-174,65, no entanto, esses sais formados pela combinação de mefloquina e HNQs foram muito citotóxicas para as células LLC-PK1 (Tabela 17), valores entre 5,59 - 21,87  $\mu\text{M}$ .

### 7.3 Citotoxicidade *in vitro*

No presente estudo, os ensaios *in vitro* foram realizados em células imortalizadas e tumorais de diferentes tecidos. Em relação às naftoquinonas naturais o lapachol não foi citotóxico ou mostrou baixa citotoxicidade para todos as células testadas. Determinações anteriores da  $\text{CC}_{50}$  do lapachol para as células A549 (adenocarcinoma de pulmão), HepG2 (hepatoblastoma) e BGM (células renais) estão de acordo com nossos resultados (OLIVEIRA et al., 2002; SOUZA et al., 2014). No entanto,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona foram citotóxicos nos testes *in vitro* contra as células tumorais (fígado, pulmão, neurológicas) e células imortalizadas (rim e fibroblasto) (Tabela 17 e 20). Deve-se notar que foi demonstrado que a  $\alpha$ -lapachona apresenta um menor potencial citotóxico *in vitro* do que o seu isômero  $\beta$ -lapachona (NETTO-FERREIRA et al., 2008), como também foi observado no presente estudo (Tabela 17 e 20) . Em geral, as *para*-naftoquinonas (lapachol e  $\alpha$ -lapachona) são consideravelmente mais estáveis em comparação com as *orto*-naftoquinonas ( $\beta$ -lapachona) devido à funcionalidade tensionada da 1,2-dicetona desta última (BOLTON E DUNLAP, 2016). Nesse sentido, a maior reatividade da  $\beta$ -lapachona, diretamente relacionada à sua estrutura de *orto*-naftoquinona, pode ser a causa de sua maior citotoxicidade. De fato, a  $\beta$ -lapachona e derivados são amplamente reconhecidos como agentes anticâncer e foram objeto de várias patentes (HUSSAIN & GREEN, 2017).

A nefrotoxicidade é um efeito adverso frequente em fármacos e pode se apresentar como uma lesão aguda ou insuficiência renal grave (CHOUDHURY & AHMED, 2006). As linhagens celulares renais têm sido empregadas em metodologias para a avaliação da nefrotoxicidade de produtos terapêuticos (JUNG et al., 2009; LINCOPAN et al., 2005; PRICE et al., 2004) e técnicas *in vitro* permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de nefrotoxicidade (WILMES et al., 2011). No presente estudo, a nefrotoxicidade *in vitro* das substâncias foi avaliada em células LLC-PK1 pelo método do MTT. As substâncias mais citotóxicas foram, em ordem crescente  **$\beta$ -lapachona < 2b < 2a < 3b < 5g < 5f < 5b < 5e < 2c < 5a < 5d < 5c < 5i <  $\alpha$ -lapachona < 2g < 2d < 2f < 5h < 3d < 2e < 3c < 1b < 1f < CQ < 3e.**

No presente trabalho as substâncias mais citotóxicas para as células LLC-PK1 (renais) foram as *orto*-naftoquinonas (**2b, 2a**). Outros estudos têm demonstrado a citotoxicidade dessa classe de substâncias. A biflorina é uma *o*-naftoquinona isolada das raízes da planta *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae). Neste estudo, os efeitos citotóxicos da biflorina foram verificados e apoptose tardia foi detectada em várias linhagens celulares de câncer por análise *in situ* (WISINTAINER, et al., 2015).

Complexos de aminonaftoquinonas com cobalto, cobre, níquel e zinco (KOSIHA et al., 2017) foram avaliados em células A549 e mostraram ser citotóxicas. No presente trabalho, a aminonaftoquinona testada **4a** (Tabela 20) não apresentou citotoxicidade para a célula A549 ( $CC_{50} > 400 \mu M$ ).

Diversos trabalhos têm demonstrado a citotoxicidade das naftoquinonas. Avaliações de 1,4 – naftoquinonas (PINGAEW et al., 2015) demonstraram um amplo espectro de citotoxicidade contra várias linhagens tumorais incluindo HuCCA-1 (células de colangiocarcinoma humano), HepG2 (hepatoma humano), A549 (adenocarcinoma alveolar humano) e MOLT-3 (linfoblasto de sangue humano). Outros estudos com 1,4 – naftoquinonas visando selecionar agentes antitumorais potentes (ZHANG et al., 2018) demonstraram que uma substância denominado “14” foi considerada a mais citotóxica contra três linhagens celulares (MDA-MB-231 (câncer de mama), BEL-7402 (câncer de fígado) e A2780 (câncer de ovário)) com valores de  $CC_{50}$  de  $0,66 \pm 0,05$ ,  $5,11 \pm 0,12$  e  $8,26 \pm 0,22 \mu M$ , respectivamente. A citotoxicidade da substância 2-acetil-7-metoxinafto[2,3-b]furano-4,9-quinona (AMNQ) (KUETE et al., 2017) isolada da casca de *Milletia versicolor* (família Fabaceae) foi avaliada em diversas linhagem sensíveis ou resistentes à drogas. A

naftoquinona AMNQ exibiu valores de  $CC_{50}$  variando de 0,79  $\mu\text{M}$  (contra células de hepatocarcinoma HepG2) a 3,26  $\mu\text{M}$  (contra células de câncer de mama MDA-MB231 / BCRP) contra 9 linhagens de células de câncer testadas.

As seguintes substâncias foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade em células renais de porco (LLC-PK1): lapachol,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, atovaquona, difosfato de cloroquina; 2-hidróxi-1,4-naftoquinonas (**1a -1h**); *orto*-furanonaftoquinonas (**2a - 2g**), *para*-furanonaftoquinonas (**3a - 3g**); **4a** (AMQs). Sais formados pela combinação de mefloquina e HNQs (**5a- 5i**). As substâncias **2h** e **3h** não foram avaliadas porque a quantidade disponibilizada não era suficiente. As HNQs foram as menos citotóxicas com valores de  $CC_{50}$  entre 34,74–209,53 $\mu\text{M}$ , seguidas das *para*-FNQs ( $CC_{50}$ =3,70-127,99 $\mu\text{M}$ ), depois pelas *orto*-FNQs ( $CC_{50}$ =2,49-27,50 $\mu\text{M}$ ) e, finalmente, os sais ( $CC_{50}$ =5,59-21,87 $\mu\text{M}$ ).

Com base no IS (Índice de Seletividade) das substâncias (BORGATI, 2017 e Tabela 5) e nos valores de  $CC_{50}$  nas células LLC-PK1 (renais) (Tabela 17), foram selecionadas as naftoquinonas para avaliar seu potencial citotóxico em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano): **1a, 1e, 1g, 1h, 3a, 3f, 3g, 4a**. Estas substâncias não foram citotóxicas para as células A549, com exceção da **3a**. As substâncias **3a, 3f** e **1h** foram mais citotóxicas para as células Neuro-2A, com valores de  $CC_{50}$  de 8,96 $\mu\text{M}$ ; 25,92 $\mu\text{M}$ ; 45,63 $\mu\text{M}$ , respectivamente. Nas células MRC-5 as substâncias mais citotóxicas foram, respectivamente, **3a, 3f, 1h** e **1e**, com valores de  $CC_{50}$  de 3,66 $\mu\text{M}$ ; 15,95 $\mu\text{M}$ ; 30,26 $\mu\text{M}$  e 54,91 $\mu\text{M}$ .

#### **7.4 OECD 129 – (guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests)**

No presente trabalho a OECD 129 foi empregado para predizer a dose inicial no teste de Toxicidade Oral Aguda (OECD 423), como descrito por vários autores (SANTOS et al., 2018; REUS et al., 2020; TONHOLO et al., 2020).

Em um trabalho realizado em 2011 (SCHRAGE et al., 2011), aplicando um modelo computacional com dados da literatura, pesquisadores consideraram a utilidade do teste de citotoxicidade *in vitro* através da OECD 129 com fibroblastos Balb 3T3 após uma exposição de 48 horas. Inicialmente, foram consideradas 16 substâncias, utilizadas para validar o modelo computacional, que possuíam dados *in*

*vivo* e *in vitro* disponíveis, para provar a proficiência técnica no teste *in vitro*. Em seguida, o modelo computacional foi realizado com 187 substâncias, incluindo uma ampla variedade de produtos químicos, agroquímicos e formulações. A dose inicial para ensaios de toxicidade oral aguda em ratos (LD<sub>50</sub>) foi estimada usando o modelo de previsão apresentado no estudo de validação do ICCVAM (Comitê de Coordenação Interinstitucional para a Validação de Métodos Alternativos) e, posteriormente, comparada com os resultados obtidos pelos testes *in vivo* realizados de acordo com as diretrizes da OCDE 423. Analisando a utilidade do teste *in vitro* para prever a dose inicial de um estudo *in vivo* e a possível redução no uso de animais que isso geraria, a previsão pelo teste de citotoxicidade foi útil para 59% das substâncias.

Na presente tese foram selecionadas as substâncias **1a**, **1g** e **lapachol** (Tabela 21) para a realização dos testes segundo à OECD 129. Foram selecionadas as substâncias com os melhores valores de CC<sub>50</sub> em três das quatro células avaliadas, a saber: **1a** (A549, Neuro-2A e MRC-5) e **1g** (LLC-PK1, Neuro-2A e MRC-5). O lapachol apresentou o melhor perfil, dentre as substâncias padrão, tendo sido a substância menos citotóxica destas séries avaliadas. Com base nos dados de predição da OECD 129 foi determinado começar o teste de toxicidade oral aguda na dose de 300mg/kg.

## 7.5 Toxicidade oral aguda – OECD 423

Estudos realizados com substâncias da classe das naftoquinonas revelaram necrose tubular renal em ratos que receberam 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (MUNDAY et al., 1991), 2- hidroxi-3-alkil-1,4-naftoquinonas (MUNDAY et al., 1995) e 2-amino-1,4-naftoquinona (MUNDAY et al., 2005). A necrose tubular renal fatal também foi induzida numa criança tratada cutaneamente com henna, cujo principal componente é a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (DEVECIOĞLU et al., 2001).

Munday e colaboradores (MUNDAY et al., 2007) avaliaram a toxicidade de 16 derivados de 1,2 e 1,4-naftoquinona em ratos, a fim de estabelecer correlações estrutura-atividade. Das substâncias testadas apenas os derivados hidroxil e amino foram nefrotóxicos. Entre os derivados de 2-amino-1,4-naftoquinona, a substituição na posição 3 diminuiu a atividade hemolítica e aboliu a nefrotoxicidade. Essa substituição é idêntica ao do lapachol. A metilação do grupo hidroxila de 2-hidroxi-

1,4-naftoquinona teve um efeito semelhante. Em contraste, a metilação do grupo amino de 2-amino-1,4-naftoquinona aumentou a gravidade da hemólise e do dano renal. Entre as 1,2-naftoquinonas testadas, os derivados 4-metoxi e 4-amino eram mais tóxicos do que os isômeros 1,4 correspondentes, embora a 4-metil-1,2-naftoquinona fosse menos tóxica do que 2-metil-1,4-naftoquinona. Estes dados estão de acordo com o presente tese que demonstrou que  $\alpha$  e  $\beta$ -lapachona são mais citotóxicos que lapachol nos testes de citotoxicidade *in vitro* (Tabela 17 e 20). O lapachol teve o menor valor de  $CC_{50}$  (285,74 $\mu$ M) nas células LLC-PK1 e nas demais células A549, Neuro-2A e MRC-5,  $CC_{50} > 400 \mu$ M.  $\alpha$ -lapachona teve valores de  $CC_{50}$  entre 8,59 e 44,47 $\mu$ M para células LLC-PK1 e Neuro-2A, respectivamente.  $\beta$ -lapachona, a mais citotóxica das três naftoquinonas naturais, teve valores de  $CC_{50}$  entre 2,09 e 7,21 $\mu$ M para as células Neuro-2A e A549, respectivamente.

A toxicidade aguda ( $DL_{50}$ ) do lapachol, em ratos albinos, por via intraperitoneal, foi de 1.600mg/Kg (SANTANA et al., 1968). Posteriormente, Morrison e colaboradores (MORRISON et al., 1970) utilizando ratos e camundongos, encontraram valores de  $DL_{50}$  por via oral, maiores que 2.400mg/Kg para os primeiros e de 621mg/Kg para os segundos, sendo os machos mais suscetíveis à ação do lapachol, com  $DL_{50}$  de 487mg/Kg, enquanto para as fêmeas foi de 792mg/Kg. Em doses mais elevadas (1.200 a 2.400mg/Kg) em camundongos, a morte ocorreu após 1 a 6 dias e os sinais de toxicidade foram diarreia, edema e eritema nas pálpebras. Apesar de sua baixa toxicidade, o lapachol apresenta alguns efeitos como anorexia, náuseas e mais raramente vômitos, que pode ser facilmente controlado com antieméticos (SANTANA et al., 1968).

No teste de toxicidade oral aguda com as substâncias **1a**, **1g** e **lapachol**, os camundongos não apresentaram morte ou sinal de toxicidade significativo na dose de 300m/kg. Já na dose de 2000mg/kg os camundongos dos três grupos apresentaram sinais de excitação forte. Houve uma morte no grupo III (2000mg/kg), da substância **1g**, camundongo 2, no final do primeiro dia (7 horas após da administração da dose). Os dados mostram que as substâncias **1a**, **1g** e **lapachol**, no geral, não foram tóxicas para os camundongos nas doses ensaiadas.

## 7.6 Teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos

A atividade esquizonticida das naftoquinonas *in vivo* tem sido relatada há várias décadas. Estudos realizados com cinco séries de 2-hidroxi-1,4-naphthoquinonas (BERBERIAN & SLIGHTER, 1968) demonstraram que alguns membros das séries possuíam atividade esquizonticida em uma dose menor como também uma atividade curativa em altas doses.

No presente trabalho, as substâncias que foram selecionadas para os testes *in vivo* pertenciam ao grupo das HNQs (hidroxinaftoquinonas **1a**, **1g** e **lapachol**). Estudos com três novas naftoquinonas semi-sintéticas (MOREIRA et al., 2015) estruturalmente relacionadas as naftoquinonas naturais lapachol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona demonstraram que a substância estruturalmente relacionada ao lapachol (3-(3-Metilbut-1-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftaleno-2-il acetato) foi capaz de reduzir em 49% a parasitemia sanguínea, na dose de 200mg/kg, no oitavo dia do experimento, em comparação com o grupo não tratado.

Algumas moléculas benzo [a] fenazinas sintetizadas a partir de 1,2-naftoquinonas, além de lapachol e  $\beta$ -lapachona, foram testadas em camundongos infectados com *P. berghei* cepa NK65. Esses dados mostraram que o lapachol foi inativo e a  $\beta$ -lapachona teve uma atividade limítrofe (até 200 mg/kg) quando administrada por via oral, por gavagem, em 4 doses (ANDRADE-NETO et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados, posteriormente, por outros pesquisadores (FRIEBOLIN et al., 2008) que demonstraram que substâncias sintéticas promissoras *in vitro* (Cepas 3D7 e K1), baseadas em 1,4-dimetoxi-2-trifluorometilnaftaleno, mostraram atividade moderada *in vivo* (redução de 18% da parasitemia) em um tratamento de 4 dias, com uma dose diária de 21 mg/kg ou 30 mg/kg. Os resultados do presente trabalho no qual substâncias mais promissoras *in vitro*, não apresentaram atividade *in vivo* estão em concordância com esses dados da literatura (ANDRADE-NETO et al., 2004, FRIEBOLIN et al., 2008) Os resultados podem estar relacionados, parcialmente, com a baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade dessas naftoquinonas em água.

Diversos estudos foram realizados com a  $\beta$ -lapachona (LI et al., 1999; SHAPIRO et al., 2005; MA et al., 2015; BERMEJO et al., 2017), uma naftoquinona com diversas atividades biológicas, em particular o câncer (PARDEE et al., 2002; FERREIRA et al., 2016), devido à sua capacidade de induzir apoptose seletiva em

células tumorais Apesar de suas vantagens, a  $\beta$ -lapachona possui baixa solubilidade em fluidos biológicos e baixa biodisponibilidade. Na última década, várias estratégias de formulações farmacêuticas foram pesquisadas para tentar superar essas limitações e viabilizar seu uso terapêutico. As estratégias mais relevantes para administração oral foram focadas na melhoria de sua solubilidade, a fim de aumentar a biodisponibilidade oral dessa naftoquinona. O uso de ciclodextrinas ou a inclusão da substância ativa em micelas e micropartículas foram bem-sucedidas (NASONGKLA et al., 2003; DAHAN & MILLER, 2012; JANG et al., 2013; MANGAS-SANJUAN et al., 2016). Para aplicação tópica e local, hidrogéis sensíveis à temperatura foram desenvolvidos para atingir altas concentrações-alvo (CUNHA-FILHO et al., 2012). As micelas poliméricas administradas por via subcutânea provaram ser um sistema circulante duradouro e aumentaram a acumulação no tecido tumoral, tornando-se uma estratégia de formulação interessante (BLANCO et al., 2010).

Métodos alternativos do uso com sistemas de liberação controlada também têm sido pesquisadas para diversas outras quinonas (FERREIRA et al., 2016), tais como atovaquona (SHUBAR et al., 2011) e lapachol (LIRA ET AL., 2008; TABOSA et al., 2018); com bons resultados em alguns casos, indicando que essas formulações podem ser uma estratégia para melhorar o perfil farmacológico dessa classe de substâncias.

Na presente tese, não foi demonstrado sinais graves de toxicidade oral nos testes *in vivo* através da OECD 423, para as substâncias **1a**, **1g** e **lapachol**. No entanto, no teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos nenhuma das três substâncias testadas foram capazes de curar ou diminuir a parasitemia por *P. berghei*, quando comparadas com o grupo não tratado, demonstrando que é necessário a busca por novas estratégias utilizando, por exemplo, formulações farmacêuticas.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de programas computacionais, capazes de prever as propriedades ADMET (Administração, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) no processo de PD&I pode levar a um aumento na taxa de sucesso dos projetos de desenvolvimento de fármacos e medicamentos, pois as propriedades focadas nestas metodologias *in silico*, como o programa PreADMET utilizado na presente tese PreADMET, são as principais causas de falha de candidatos a fármacos, nos estágios iniciais da descoberta. Existem inúmeras ferramentas disponíveis para permitir a aplicação das propriedades ADMET em todas as etapas do processo de descoberta, incluindo a decisão sobre quais substâncias atendem aos critérios necessários para a progressão ao próximo estágio (VALERIO, 2009).

O presente trabalho destaca a aplicabilidade do programa PreADMET na identificação precoce de possíveis candidatos a desenvolvimento farmacêutico o que pode acelerar este processo além de permitir uma redução significativa do número de animais a ser utilizado na etapa de toxicologia pré-clínica. Esta informação ajuda a orientar a equipe do projeto durante o processo inicial de identificação do alvo e otimização de protótipos.

A malária é uma doença prevenível e tratável. O diagnóstico e o tratamento precoce, de acordo com as diretrizes recomendadas, podem reduzir, significativamente, a morbidade e a mortalidade, especialmente em crianças abaixo de 5 anos, que são a população mais afligida. O uso adequado da terapia medicamentosa ajuda a combater a resistência dos parasitos aos fármacos antimaláricos. Os principais desafios no desenvolvimento de novas gerações de antimaláricos fármacos são controlar, eliminar e, em última análise, erradicar a malária.

Na presente tese foram testadas inicialmente 42 substâncias: 8 HNQs, (**1a-1h**); 8 *orto*-FNQs (**2a-2h**), 8 *para*-FNQs (**3a-3h**), 4 AMQs (**4a-4d**), e 9 Sais da Meffloquina com HNQs ou lapachol (**5a-5i**),  **$\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol, atovaquona e difosfato de cloroquina**. As metodologias computacionais utilizadas neste trabalho permitiram prever que as AMQs e as HNQs possuíam o maior número de propriedades favoráveis para a maioria das substâncias da classe (Tabelas 6 a 9). Predições semelhantes foram feitas pelo programa PreADMET, em relação as propriedades de toxicidade demonstrando que as substâncias da classe

das AMQs e as HNQs apresentaram o maior número de propriedades favoráveis ou intermediárias para a maioria (Tabelas 10 a 13)

Em relação ao IS (Índice de Seletividade) de todas substâncias testadas para atividade antiplasmódica ( $CI_{50}$ ) e citotoxicidade em células HepG2 ( $CC_{50}$ ) como descrito na tese de Borgati (BORGATI, 2017 e Tabela 5) e na presente tese (Tabelas 14 a 16), 25 substâncias (**lapachol, atovaquona, 1a, 1e, 1g, 1h, 3a, 3c, 3d, 3f-3g, 4a-4d, 5a-5i**) apresentaram  $IS > 5$ . Se as substâncias para o teste *in vivo* tivessem sido escolhidas com base apenas nesse índice, o número de substâncias testadas seria muito maior, ou seja, 25 substâncias ao invés de apenas 3 substâncias.

Embora os sais de mefloquina formados pela combinação com HNQs ou lapachol – série 5, tenham apresentado os melhores valores de IS (Tabela 5) eles foram descartados nos testes de toxicidade em células LLC-PK1 por apresentarem alta toxicidade para estas células renais ( $CC_{50}=5,59-21,87\mu M$ ) (Tabela 17).

Para a realização dos testes de citotoxicidade nas demais células: A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), células Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão de feto humano); foi utilizado além do IS o valor de  $CC_{50}$  nas células LLC-PK1 (renais) (Tabela 19). Foram selecionadas as seguintes substâncias **1a, 1e, 1g, 1h, 3a, 3f, 3g, 4a**.

Na sequência, foram escolhidas as substâncias **1a, 1g e lapachol** (Tabela 21) para a realização dos demais testes: OECD 129, toxicidade oral aguda *in vivo* (OECD 423) através da extrapolação do resultado obtido pela OECD 129, e teste de esquizonticidas sanguíneos em camundongos. A escolha dessas substâncias foi realizada com base nos valores mais altos de  $CC_{50}$  em todas as células testadas (LLC-PK1, A549, Neuro-2A, MRC-5) que consta da Tabela 21.

Com base nos resultados da OECD 129 foi predito começar o teste de toxicidade oral aguda na dose de 300mg/kg. No teste de toxicidade oral aguda com as substâncias **1a, 1g e lapachol**, os camundongos não apresentaram morte ou sinal de toxicidade significativo na dose de 300mg/kg. Já na dose de 2000mg/kg os camundongos dos três grupos apresentaram sinais de excitação forte e houve uma morte no grupo III (2000mg/kg), da substância **1g**, camundongo 2, no final do primeiro dia (7 horas após da administração da dose).

As substâncias **1a, 1g e lapachol**, não apresentaram sinais graves de toxicidade para os camundongos nas doses ensaiadas. No entanto, no teste de

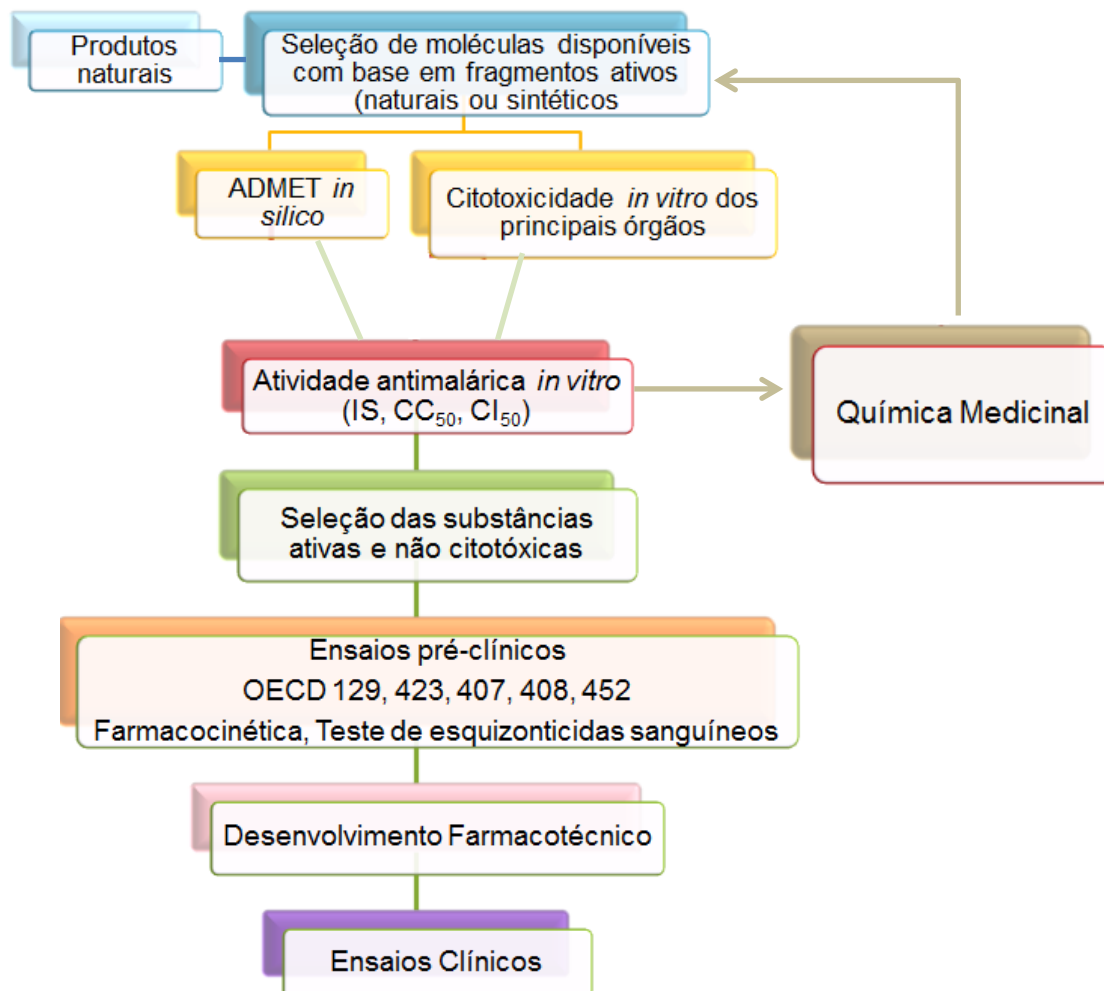
esquizonticidas sanguíneos em camundongos as três substâncias testadas não foram capazes de curar ou diminuir a parasitemia por *P. berghei*.

Nesta tese foram utilizadas várias metodologias visando selecionar possíveis candidatos a fármacos, a saber: *in silico* (propriedades ADME, e de toxicologia), teste antiplasmódico *in vitro*, citotoxicidade *in vitro* em diferentes tipos de células (renais, pulmonares, neuronais, fibroblastos), OECD 129, OECD 423 (Toxicidade oral aguda) e o teste de esquizonticidas sanguíneos *in vivo*. Essa sequência das metodologias utilizadas na presente tese visa reduzir o número de animais utilizados em teste *in vivo*. De fato, considerando o IS das substâncias ativas *in vitro* num total de 42 somente três foram selecionadas para realização dos testes da OECD 129, OECD 423 e teste de esquizonticidas sanguíneos *in vivo*

Considerando que estas três naftoquinonas não foram ativas nas concentrações de 200mg/kg nos testes de esquizonticidas sanguíneos em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* mas, por outro lado, não foram tóxicas nas concentrações de 300mg/kg e 2000mg/kg, há ainda duas abordagens a serem exploradas: realizar os testes farmacológicos *in vivo* de atividade antimalárica em concentrações mais elevadas e desenvolver formulações farmacêuticas especiais para compensar propriedades desfavoráveis como baixa solubilidade em água e biodisponibilidade.

Com base no estudo da presente tese e nos dados de Fidock *et al.*, 2004, podemos propor um caminho para a seleção de moléculas disponíveis com base em fragmentos ativos naturais e sintéticos (Figura 17). Nossa proposta visa inicialmente a realização do ADMET *in silico*, em seguida a avaliação da citotoxicidade *in vitro* de células dos principais órgãos, tais como fígado, rins, pulmão, coração e entre outros. À partir desses ensaios realizar a análise da atividade antimalárica *in vitro*. O compilado de todos esses testes permitirão a seleção das substâncias ativas e não citotóxicas. Na sequência pode-se realizar os ensaios pré-clínicos utilizando os documentos orientadores padronizados OECD 129, 423, 407, 408 E 452. Posteriormente, sugere-se realizar ensaios de farmacocinética e teste com os esquizonticidas sanguíneos, que possibilitarão o desenvolvimento farmacotécnico para enfim a realização dos ensaios clínicos.

Figura 17- Abordagem racional para a descoberta de antimaláricos (FIDOCK et al., 2004 com modificações)



## REFERÊNCIAS

- ACUTE TOXICITY WORKSHOP – 2015. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/go/atwks-2015>>. Acesso em: Outubro de 2019.
- AGRAWAL, D.; TEACH, S. J. Evaluation and management of a child with suspected malaria. **Pediatric Emergency Care**, v. 22, n.2, p. 127-133, 2006.
- AGUIAR, A. C. et al. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 831-845, 2012.
- AINGARAN, M. et al. Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 983-993, 2012.
- AJAY, et al. Designing libraries with CNS activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4942-4951, 1999.
- ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611, 2010.
- ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. Combination Therapy Strategies for the Treatment of Malaria. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3601, 2019.
- AMARATUNGA, C. et al. Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 357-365, 2016.
- AMES, B. N. et al. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 11, p. 3128-3132, 1972.
- ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p. 253-256, 2003.
- ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of phenazines from lapachol,  $\beta$ -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p. 1145-1149, 2004.
- ANTHONY, M. P. et al. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 316, 2012.
- ANTONY, H. A.; PARIJA, S. C. Antimalarial drug resistance: an overview. **Tropical Parasitology**, v. 6, n. 1, p. 30-41, 2016.

ARAUJO, G. L. et al. Toxicological *in vitro* and subchronic evaluation of LASSBIO-596. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 148-156, 2014.

ASHLEY, E. A. et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 5, p. 411-423, 2014.

ASHLEY, E.; A.; PHYO, A. P.. Drugs in development for malaria. **Drugs**, v. 78, n. 9, p. 861-879, 2018.

AYRTON, A.; MORGAN, P. Role of transport protein in drug absorption, distribution and excretion. **Xenobiotica**, v. 31, n. 8-9, p. 469-497, 2001.

BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. **Environmental Research**, v. 111, n. 4, p. 603-613, 2011.

BADERNA, D. et al. Chemical-based risk assessment and *in vitro* models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona Valley. **The Science of the Total Environment**, n. 463-464, p. 790-801, 2013.

BAGGISH, A. L.; HILL, D. R. Antiparasitic agent atovaquone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1163-1173, 2002.

BALOGUN, F. O.; ASHAFI, A. O. T. A Review of Plants Used in South African Traditional Medicine for the Management and Treatment of Hypertension. **Planta Medica**, v. 85, n. 04, p. 312-334, 2019.

BARAMEE, A. et al. Synthesis and *in vitro* activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1294-1302, 2006.

BARBER, B. E. et al. World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, 135p, 2017.

BARNES, K. I. et al. Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 11, p. 1605-1613, 2008.

BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. Mediterranean **Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012026, 2012.

BARTON, V. et al. Inhibiting *Plasmodium* cytochrome bc 1: a complex issue. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 440-446, 2010.

BASU, S.; SAHI, P. K. Malaria: an update. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 84, n. 7, p. 521-528, 2017.

BENAY, S. et al. Model-based assessment of erlotinib effect *in vitro* measured by real-time cell analysis. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 42, n. 3, p. 275-285, 2015.

BERBERIAN, D. A.; SLIGHTER JR, R. G. The schizonticidal activity of hydroxynaphthoquinones against *Plasmodium berghei* infections in mice. **The Journal of parasitology**, p. 999-1005, 1968.

BERGSTRÖM, C. A. et al. Computational prediction of formulation strategies for beyond rule of 5 compounds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 101, p. 6-21, 2016.

BERMEJO, M. et al. Enhancing oral absorption of  $\beta$ -lapachone: progress till date. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2017.

BESSEMS, J. et al. EURL ECVAM strategy for achieving 3Rs impact in the assessment of toxicokinetics and systemic toxicity. **Publications Office of the European Union**, 2015.

BJÖRNSSON, E. S. et al. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the population of Iceland. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1419-1425, 2013.

BLAIS, A. et al. Common characteristics for Na<sup>+</sup>- dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 99, n. 2, p. 113-125, 1987.

BLANCO, E. et al.  $\beta$ -lapachone micellar nanotherapeutics for non-small cell lung cancer therapy. **Cancer Research**, v. 70, n. 10, p. 3896-3904, 2010.

BLANEY, J. A very short history of structure-based design: how did we get here and where do we need to go? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 1, p. 13-14, 2012.

BODOR, N.; BUCHWALD, P. Molecular size based approach to estimate partition properties for organic solutes. **The Journal of Physical Chemistry B.**, v. 101, n. 17, p. 3404-3412, 1997.

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13-37, 2016.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119-124, 1985.

BORGATI, T. F. **Síntese, análise espectroscópica, atividade antiplasmódica, citotoxicidade e docking molecular de naftoquinonas relacionadas a produtos naturais e de derivados nitrogenados de lawsona.** Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFMG, Belo Horizonte, 2017.

BORGATI, T. F. et al. Synthesis, SAR, and Docking Studies Disclose 2-Arylfuran-1, 4-naphthoquinones as *In Vitro* Antiplasmodial Hits. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, 2017.

BOSMAN, A.; MENDIS, K. N. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. **The American Journal of Tropical Medicines and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 193-197, 2007.

BOSTROM, S. et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. **Malaria Journal**, v. 11, p. 109, 2012.

BOYER, S. et al. Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 2, p. 583-590, 2007.

BRANDÃO, G. C. et al. Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, *in vitro* activity, docking to PfDHODH and SAR of lapachol-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 191-205, 2018.

BRUCECHWATT, L. J. QINGHAOSU - A new antimalarial. **British Medical Journal**, v. 284, n. 6318, p. 767-768, 1982.

BRUNMARK, A.; CADENAS, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and biological implication. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 4, p. 435-477, 1989.

BRUNO, R. D.; NJAR, V. C. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 15, p. 5047-5060, 2007.

BURROWS, J. N. et al. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. **Malaria Journal**, v. 12, n. 187, p.1-20, 2013.

BURROWS, J. N. et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. **Malaria Journal**, v. 16, n. 26, p. 1-29, 2017.

CALDEIRA, T. G. et al. *In silico* and *in vitro* prediction of gastrointestinal absorption from potential drug eremantholide C. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1468-1476, 2017.

CAMENISH, G. et al. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs lipophilicity and molecular weight. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 317-324, 1998.

CARVALHO, L. H. **Proteínas circum-esporozoítas de *Plasmodium falciparum* e de *P.vivax*: avaliação das respostas de anticorpos e de proliferação celular em indivíduos naturalmente expostos à malária em áreas endêmicas da Amazônia brasileira.** Tese de doutorado, UFMG, Belo horizonte, 1990.

CASELLATO, A. et al. Novel 2-(R-phenyl) amino-3-(2-methylpropenyl)-[1, 4]-naphthoquinones: synthesis, characterization, electrochemical behavior and antitumor activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 169-178, 2010.

CAVALCANTI, B. C. et al. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 145-163, 2013.

CHAIN, E. et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **Lancet**, v. 236, p. 226-228, 1940.

CHEN, I. et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 1, p. e1001942, 2016.

CHEN, V.; DAILY, J. P. Tafenoquine: the new kid on the block. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p. 407-412, 2019.

CHEN, L. H.; KEYSTONE, J. S. New strategies for the prevention of malaria in travelers. **Infectious Disease Clinics**, v. 19, n. 1, p. 185-210, 2005.

CHOE, B. I.; LEE, G. H.. Promoting and improving three Rs practice: the Korean guidelines. **BMB Reports**, v. 50, n. 12, p. 610, 2017.

CHOI, S. S. et al. *In silico* modeling to predict drug-induced phospholipidosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 2, p. 195-204, 2013.

CHOUDHURY, D.; AHMED, Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nature Clinical Practice*. **Nephrology**, v. 2, n. 2, p. 80-91, 2006.

CHU, V. M. et al. Regional variation in life history traits and plastic responses to temperature of the major malaria vector *Nyssorhynchus darlingi* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5356, 2019.

CHUN, Y. J.; KIM, S. Discovery of cytochrome P450 1B1 inhibitors as new promising anti-cancer agents. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 6, p. 657-668, 2003.

COATNEY, G. R. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 12, p. 121-128, 1963.

CORREALE, J.; VILLA, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 12, p. 2067-2077, 2009.

COSTA, W. F. et al. Genotoxicity of lapachol evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 558-563, 2010.

COSTA, W. F. et al. Lapachol as na epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3236-3245, 2011.

COULTAS, D. B. et al. The epidemiology of interstitial lung diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, n. 4, p. 967-972, 1994.

CRESPO, R. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 204-209, 2011.

CUI, L. et al. Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, suppl 3, p. 57-68, 2015.

CUNHA-FILHO, M. S. S et al. Temperature-sensitive gels for intratumoral delivery of  $\beta$ -lapachone: Effect of cyclodextrins and ethanol. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

DAHAN, A.; MILLER, J. M. The solubility–permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 2, p. 244-251, 2012.

DANOUN, S. et al. Synthesis and protozoocidal activity of new 1, 4-naphthoquinones. **Heterocyclic Communications**, v. 5, n. 4, p. 343-348, 1999.

DASTON, G. et al. SEURAT: Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing – recommendations for future research in the field of predictive toxicology. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 15-23, 2015.

DAVIDSON, G. et al. The role of ecological linkange mechanisms in *Plasmodium knowlesi* transmission and spread. **EcoHealth**, p. 1-17, 2019.

DAVIES, C. S. et al. The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. **Acta Leidensia**, v. 58, n. 2, p. 115-128, 1989.

DEL CORRAL, J. M et al. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic 6(7)-alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. **Archiv der Pharmazie**, v. 335, n. 9, p. 427-437, 2002.

DEL CORRAL, J. M. et al. New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 21, p. 7231-7240, 2006.

DERDA, M. ; HADAŚ, E. The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2015.

DEVECIOĞLU, C. et al. Henna-induced hemolytic anemia and acute renal failure. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 65-66, 2001.

DIAZ, O. J. G. et al. A multi-scale modeling framework for individualized, spatiotemporal prediction of drug effects and toxicological risk. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 204, p. 1-11, 2013.

DIEZI, M. et al. Toxic and drug-induced peripheral neuropathies: updates on causes, mechanisms and management. **Current Opinion in Neurology**, v. 26, n. 5, p. 481-488, 2013.

DINGLASAN, R. R. et al. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 125-134, 2009.

DOMAGK G. Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 61, p. 250-253, 1935.

DRESSMAN, J. B.; REPPASS, C. *In vitro-in vivo* correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. suppl 2, p. s73-80, 2000.

DONDORP. A. M. et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.

EL HAGE, S. et al. Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4778-4782, 2009.

FAIRHURST, R. M.; DONDORP, A. M. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Emerging Infections** 10, p. 409-429, 2016.

FAUVEL, M. et al. Aerosolized liposomal amphotericin B: prediction of lung deposition, *in vitro* uptake and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 106-110, 2012.

FAWAZ G.; HADDAD, F. S. The effect of lapinone (M-2350) on *P. vivax* infection in man. **The American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, p. 569-571, 1951.

FERGUSON, M. A. et al. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 182-193, 2008.

FERREIRA, R. A. et al. Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, *in vitro* and in murine models of infection. **Parasite**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2002.

FERREIRA, R. A. et al. *Toxoplasma gondii*: *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 125-129, 2006.

FERREIRA, R. A. et al. New naphthoquinones and an alkaloid with *in vitro* activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 450-457, 2012.

FERREIRA, V. F. et al. Strategies for increasing the solubility and bioavailability of anticancer compounds:  $\beta$ -lapachone and other naphthoquinones. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 39, p. 5899-5914, 2016.

FIDOCK, David A. et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 6, p. 509-520, 2004.

FIESER, L. F. et al. Naphthoquinone antimalarials. XVIII. Metabolic oxidation products. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 94, p. 85-96, 1948a.

FIESER L. F. et al. Naphthoquinone antimalarials. XX. Metabolic degradation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 94, p. 112-124, 1948b.

FIESER, L. F.; BERLINERE, E. Naphthoquinone antimalarials: synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, n. 10, p. 3174-3215, 1948.

FIESER, L. F.; FIESER, M. Naphthoquinone antimalarial; the Hooker oxidation reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, n. 10, p. 3215-3222, 1948.

FIESER, L. F.; RICHARDSON, A. P. Naphthoquinone antimalarials. II. Correlation of structure and activity against *P. lophurae* in ducks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, p. 3156-3165, 1948.

FIVELMAN, Q. L. et al. Malaria treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. **Malaria Journal**, v. 1, n. 1, p. 1, 2002.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-236, 1929.

FLIEDER, D. B.; TRAVIS, W. D. Pathologic characteristics of drug-induced lung disease. **Clinics in Chest Medicine**, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2004.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 179-191, 2003.

FONSECA, S. G. C. et al. Lapachol – química, farmacologia, e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

FONTANA, R. J. et al. Idiosyncratic drug-induced liver injury is associated with substantial morbidity and mortality within 6 months from onset. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 96-108, 2014.

FRAMPTON, J. E. Tafenoquine: first global approval. **Drugs**, v. 78, n. 14, p. 1517-1523, 2018.

FRANÇA, T. C. C. et al. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FRID, A. A.; MATTHEWS, E. J. Prediction of drug-related cardiac adverse effects in humans –B: use of QSAR programs for early detection of drug-induced cardiac toxicities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP**, v. 56, n. 3, p. 276-289, 2010.

FRIEBOLIN, W. et al. Antimalarial dual drugs based on potent inhibitors of glutathione reductase from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1260-1277, 2008.

FRY, M.; PUDNEY, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4- (4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1545-1553, 1992.

GALINSKI, M. R.; BARWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Who cares? **Malaria Journal**, v. 7, n. Suppl 1, p. s9, 2008.

GANDHI, T. K. et al. Drug complication in outpatients. **Journal of General Internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 149-154, 2000.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.

GETHING, P. W. et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1814, 2012.

GHIAEE, A. et al. Herbal remedies connected to malaria like fever in Iranian ancient medicinal books – brief review article. **Iranian Journal of Parasitology**, v.9, n. 4, p. 553-559, 2014.

GHOSE, A. K.; CRIPPEN, G. M. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 27, n. 1, p. 21-35, 1987.

GHOSH, A. et al. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 196-201, 2000.

GOCHT, T. et al. The SEURAT-1 approach towards animal free human safety assessment. **Altex**, v. 32, n. 1, p. 9-24, 2015.

GONTIJO, D. C. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity, isolation of active alkaloids, and dereplication of *Xylopi* *sericea* leaves ethanol extract by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 260-269, 2019.

GOVERNA, P. et al. Phytotherapy in the management of diabetes: a review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 105, 2018.

GRAEWE, S. et al. Hostile takeover by *Plasmodium*: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002224, 2011.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266-1276, 2008.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 117-145, 2005.

GRÜRING, C. et al. Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. **Nature Communications**, v. 2, p. 165, 2011.

GSCHWIND, L. et al. Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the Caco-2 cell model. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, n. 4, p. 259-265, 2013.

GUALBERTO, S. A. **Síntese e atividades antiparasitárias e anti- *Toxoplasma gondii* de naftoquinonas**. Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2001.

HAKURA, A. et al. Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. **Chemical Research in Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 559-567, 1994.

HALLIWELL, B.. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HE, M. D. et al. L-carnitine protects against nickel-induced neurotoxicity by maintaining mitochondrial function in Neuro-2a cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, n. 1, p. 38-44, 2011.

HEUSSLER, V. et al. Host cell death induced by the egress of intracellular *Plasmodium* parasites. **Apoptosis**, v. 15, n. 3, p. 376-385, 2010.

HIDALGO, I. J. et al. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 736-749, 1989.

HILLYER, J.F. et al. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 673-681, 2007.

HOMBHANJE, F. W.; HUANG, Q. Artemisinin-naphthoquinone combination (ARCO®): an overview of the progress. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 3581-3593, 2010.

HOOKER, S. C. Lomatiol. Part II. Its occurrence, constitution, relation to and conversion into lapachol. Also a synthesis of lapachol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, p. 1181-1190, 1936.

HOOKER, S. C.; RICHARDSON, A. P. Naphthoquinone antimalarials. II. Correlation of structure and activity against *P. lophurae* in ducks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, p. 3156-3165, 1948.

HORNBERG, J. J. et al. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part II: screening strategies. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1137-1144, 2014.

HOU, S. H. et al. Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. **The American Journal of Medicine**, v. 74, n. 2, p. 243-248, 1983.

HUDSON, A. T. et al. Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. **Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 45-55, 1985.

HUDSON, A. T. et al. *In vitro* activity of 2-cycloalkyl-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinones against *Theileria*, *Eimeria* and *Plasmodia* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 271-275, 1986.

HUDSON, A. T. et al. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 17, n. 9, p. 427-435, 1991.

HULL, R. N. et al. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain LLC-PK. **In vitro**, v. 12, n. 10, p. 670-677, 1976.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2, p. 145-171, 2007.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 10, p. 1111-1121, 2017.

HUUSKONEN, J. et al. Aqueous solubility prediction of drugs based on molecular topology and neural network modeling. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 3, p. 450-456, 1998.

IDRO, R. et al. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatric Research**, v. 68, n. 4, p. 267-274, 2010.

INTERNATIONAL ARTEMISININ STUDY GROUP et al. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. **The Lancet**, v. 363, n. 9402, p. 9-17, 2004.

IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28-33, 1999.

IWATA, S. et al. Complete structure of 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. **Science**, v. 281, n. 5373, p. 64-71, 1998.

JACOBS, A. C.; HATFIELD, K.P. History of chronic toxicity and animal carcinogenicity studies for pharmaceuticals. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 2, p. 324-333, 2013.

JAIN, K. K. **Drug-Induced Neurological Disorders**. Hogrefe & Huber, 2001.

JAMIER, V. et al. Selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents as biochemical redox modulators with selective cytotoxicity. **Chemistry—A European Journal**, v. 16, n. 36, p. 10920-10928, 2010.

JANG, S. B. et al. Impact of micellar vehicles on *in situ* intestinal absorption properties of beta-lapachone in rats. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 9-13, 2013.

JENSEN, J. B.; TRAGER, W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. **The Journal of Parasitology**, p. 883-886, 1977.

JOICE, R. et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 244, p. 244re5-244re5, 2014.

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E. M. Prediction of drug solubility from Monte Carlo simulations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 11, p. 1155-1158, 2000.

JUNG, S. H. et al. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 313-320, 2009.

KAPADIA, G. J. et al. Aminonaphthoquinones—a novel class of compounds with potent antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 4, p. 363-367, 2001.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 489-499, 2005.

KAR, S.; ROY, K. Predictive toxicology using QSAR: a perspective. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 87, p. 1455-1515, 2010.

KAUFMAN, J. et al. Community-acquired acute renal failure. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, v. 17, n. 2, p. 191-198, 1991.

KENDALL, L. V. et al. Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. **ILAR Journal**, v. 59, n. 2, p. 177-194, 2018.

KIM, I. S. et al. Effects of  $\beta$ -lapachone, a new anticancer candidate, on cytochrome P450-mediated drug metabolism. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 699-702, 2013.

KIRKLAND, D.; MARZIN, D. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. **Mutation Research**, v. 537, n. 2, p. 183-199, 2003.

KLEIN, E. Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 311-317, 2013.

KLEINKNECHT, D. Acute kidney failure induced by drugs or contrast media. **La Revue du Praticien**, v. 45, n. 13, p. 1633-1637, 1995.

KOLBE, H.; LAUTEMANN, E. Ueber die Constitution und Basicität der Salicylsäure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 157-206, 1860.

KONYSHEVA, A. V. et al. Synthesis of cytotoxically active derivatives based on alkylated 2,3-seco-triterpenoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 140, p. 74-83, 2017.

KOSIHA, A.; et al.. Synthesis, characterization and DNA binding/cleavage, protein binding and cytotoxicity studies of Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes of aminonaphthoquinone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 168, p. 165-174, 2017.

KROGSTAD, D. J. et al. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 57-62, 1992.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity and mode of action of a naturally occurring naphthoquinone, 2-acetyl-7-methoxynaphtho [2, 3-b] furan-4, 9-quinone towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 33, p. 62-68, 2017.

LAMB, D. C. et al. The first virally encoded cytochrome p450. **Journal of Virology**, v. 83, n. 16, p. 826-8269, 2009.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, p. 418- 420, 1979.

LANGE, E. C.; DANHOF, M. Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, n. 10, p. 691-703, 2002.

LEANG, R. et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperazine in western Cambodia: dihydroartemisinin-piperazine open-label multicenter clinical assessment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4719-4726, 2015.

LEE, W. M. Drug-induced acute liver failure. **Clinics in Liver Disease**, v. 17, n. 4, p. 575-586, 2013.

LEONI, S. et al. The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 185, 2015.

LEWIS, J. H. 'Hy's law, 'the 'Rezulin Rule', and other predictors of severe drug-induced hepatotoxicity: putting risk-benefit into perspective. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 15, n. 4, p. 221-229, 2006.

LI, A. P. Primary hepatocyte cultures as an *in vitro* experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug–drug interactions. **Advances in Pharmacology**, v. 43, p. 103-130, 1997.

LI, Y. et al. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by  $\beta$ -lapachone in human carcinoma cells. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 4, p. 232-239, 1999.

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

LIAÑO, F. et al. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. **Kidney International-Supplements**, n. 66, p. 16-24, 1998.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIMONGI, J. E. et al. Malaria outbreaks in a non-endemic área of Brazil, 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 232-237, 2008.

LINCOPAN, N. et al. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 727-734, 2005.

LIPISKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIRA, A. A. M. et al. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LOOAREESUWAN, S. et al. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone clinical trials study group. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 533-541, 1999.

LÓPEZ, L. et al. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 42, n. 1, p. 6-17, 2011.

LOURENÇO, A. L. et al. Identification of nor- $\beta$ -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 684-689, 2011.

LU, H. R. et al. Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 7, p. 1427-1438, 2008.

LUCENA, M. I. et al. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 2001-2009, 2009.

LUI, C. Y. et al. Some formulation properties of lapachol, a potential oncolytic agent of natural origin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 11, n. 9-10, p. 1763-1779, 1985.

LUND, M. et al. Clinical implications of P-glycoprotein modulation in drug-drug interactions. **Drugs**, v. 77, n. 8, p. 859-883, 2017.

LYKE, K. E. Steady progress toward a malaria vaccine. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 5, p. 463-470, 2017.

MA, X. L. et al. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 500-12, 2005.

MA, X. et al. Esterase-activatable  $\beta$ -lapachone prodrug micelles for NQO1-targeted lung cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 201-211, 2015.

MAISTRO, E. L. et al. Lapachol induces clastogenic effects in rats. **Planta Medica**, v. 76, n. 09, p. 858-862, 2010.

MAKLER, M. T.; HINRICHS, D. J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 205-210, 1993.

MANGAS-SANJUAN, V. et al. Intestinal permeability of  $\beta$ -lapachone and its cyclodextrin complexes and physical mixtures. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 41, n. 6, p. 795-806, 2016.

MARELLA, A. et al. Malaria Hybrids: A Chronological Evolution. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1144-1177, 2019.

MARTÍNEZ, M. J. A.; BENITO, P. B. Biological activity of quinones. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 303-366, 2005.

MASANGO, M. G. et al. Cytotoxicity of diplodiatoxin, dipmatol and diplonine, metabolites synthesized by *Stenocarpella maydis*. **Toxicon**, v. 82, p. 26-29, 2014.

MATEUS, A. et al. Rapid measurement of intracellular unbound drug concentrations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2467-2478, 2013.

MATSSON, P. et al. Cell permeability beyond the rule of 5. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 42-61, 2016.

MATSUNO, O. Drug-induced interstitial lung disease: mechanisms and best diagnostic approaches. **Respiratory Research**, v. 31, p. 13-39, 2012.

MCKEAGE, K.; SCOTT, L. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. **Drugs**, v. 63, n. 6, p. 597-623, 2003.

MENARD, D.; DONDORP, A.. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, p. a025619, 2017.

MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. The history of antimalarial drugs. In: **Antimalarial chemotherapy**. Humana Press, Totowa, NJ, 2001. p. 15-25.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/31/Mapa-de-risco-da-mal-ria-por-munic--pio-de-infec---o-Brasil-2018-.pdf>>. Acesso em: 10 de outubro de 2019.

MONTANARI, C A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, D. R. M et al. Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potent and selective antiplasmodium agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 615-621, 2015.

MORO, M. G. et al. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 3, p. 288-297, 2018.

MORPHY, R. The influence of target family and functional activity on the physicochemical properties of pre-clinical compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 2969-2978, 2006.

MORRISON, R. K. et al. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1970.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, M. M. et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141-144, 2001.

MUCSI, Z.; CSIZMADIA, I. G. The Future of the drug discovery process and the fate of the pharmaceutical industry: an economical and scientific study. **Philosophical Nature**, v.1, n.1, p. 61-75, 2009.

MULLARD, A. 2014 FDA drug approvals. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2015.

MUNDAY, R. Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 85-90, 1991.

MUNDAY, R. et al. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1, 4-naphthoquinones in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 98, n. 2, p. 185-192, 1995.

MUNDAY, R. et al. Effect of inducers of DT-diaphorase on the haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-amino-1, 4-naphthoquinone in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 155, n. 3, p. 140-147, 2005.

MUNDAY, R. et al. Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1, 2-and 1, 4-naphthoquinone. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 262-269, 2007.

MYSHKIN, E. et al. Prediction of organ toxicity endpoints by QSAR modeling based on precise chemical-histopathology annotations. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 80, n. 3, p. 406-416, 2012.

NAGATA, K. et al. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 700-702, 1998.

NAIR, S. et al. A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast asian malaria parasites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 1526-1536, 2003.

NAKATO, H. et al. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of atovaquone proguanil (Malarone) for chemoprophylaxis against malaria. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 929-936, 2007.

NARULA, A. et al. New dimensions in the field of antimalarial research against malaria resurgence. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019.

NASH, K. et al. Hospital-acquired renal insufficiency. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, n. 5, p. 930-936, 2002.

NASONGKLA, N. et al. Enhancement of solubility and bioavailability of  $\beta$ -lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 10, p. 1626-1633, 2003.

NETTO-FERREIRA, J. C. et al. Characterization, reactivity and photosensitizing properties of the triplet excited state of  $\alpha$ -lapachone. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 44, p. 6645-6652, 2008.

NEVIN, R. L. et al. Prevalence of contraindications to mefloquine use among USA military personnel deployed to Afghanistan. **Malaria Journal**, v. 7, n.30, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NIZ, M. et al. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 37, 2017.

NORINDER, U.; BERGSTRÖM, C. A. Prediction of ADMET properties. **ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery**, v. 1, n. 9, p. 920-937, 2006.

NQORO, X. et al. Quinoline-based hybrid compounds with antimalarial activity. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2268, 2017.

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919-928, 2003.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991.

OECD 129. **OECD. Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129**. Paris, France: OECD; 2010.

OECD 423 **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris, France: OECD; 2011.

OLEJNICZAK, K. et al. Preclinical testing strategies. **Drug Information Journal**, v. 35, n. 2, p. 321-336, 2001.

OLIVEIRA, M. F. et al. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 2, p. 211-221, 2002.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.

LOTU, A. et al. Seven-year efficacy of RTS,S/AS01 malaria vaccine among young African children. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 26, p. 2519-2529, 2016.

OPREA, T. I. Virtual screening in lead discovery: a viewpoint. *Molecules*, v. 7, n. 1, p. 51-62, 2002.

PAINTER, H. J. et al. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 88-91, 2007.

PALM, K. et al. Evaluation of dynamic polar molecular surface area as predictor of drug absorption: comparison with other computational and experimental predictors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 27, p. 5382-5392, 1998.

PALMER, K.; et al. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 45, n. 3, p. 430-475, 1993.

PARDEE, A. B. et al. Cancer therapy with  $\beta$ -lapachone. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 3, p. 227-242, 2002.

PASSAGLI, M. et al. **Toxicologia forense: teoria e prática**. Millennium, 2009.

PATENT USA - 4981874. *Medicaments*. Disponível em: <<http://www.google.com/Patents/US4981874>> Acesso em: 3 de agosto de 2017.

PATERNÓ, E. Ricerche sull'acido lapacico. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 12, p. 337-392, 1882.

PAUEKSAKON, P.; FOGO, A. B. Drug-induced nephropathies. **Histopathology**, v. 70, n. 1, p. 94-108, 2017.

PAYNE, D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? **Parasitology Today**, v. 4, n. 4, p. 112-115, 1988.

PELTIER, A.; RUSSELL, J. W. Recent advances in drug-induced neuropathies. **Current Opinion in Neurology**, v. 15, n. 5, p. 633-638, 2002.

PELTIER, A.; RUSSELL, J. W. Advances in understanding drug-induced neuropathies. **Drug Safety**, v. 29, n. 1, p. 23-30, 2006.

PENNA-COUTINHO, J. et al. Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. **PLoSOne**, v. 6, n. 7, p. e21237, 2011.

PEREIRA, V. S. S. et al. *In vitro* antiplasmodial activity, pharmacokinetic profiles and interference in isoprenoid pathway of 2-aniline-3-hydroxy-1.4-naphthoquinone derivatives. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2018.

PÉREZ-SACAU, E. et al. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 264-274, 2005.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. **Experimental Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 80-89, 1965.

PETERSEN, I. et al. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1551-1562, 2011.

PIMENTA, P. F. et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23-47, 2015.

PINA-COSTA et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazon endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 617-633, 2014.

PINGAEW, R. et al. Novel 1, 4-naphthoquinone-based sulfonamides: Synthesis, QSAR, anticancer and antimalarial studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 446-459, 2015.

PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L.. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570, 2009.

PIRIA, R. et al. Sur des nouveaux produits extraits de la salicin. **CR Acad Sci**, v. 6, p. 620-624, 1838.

POWIS, G. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, n. 1-2, p. 57-162, 1987.

PREADMET. Disponível em: <<https://preadmet.bmdrc.kr/>>. Acesso em: 06 de março de 2017a.

PREADMET. Disponível em: <<https://preadmet.bmdrc.kr/adme/>>. Acesso em: 13 de março de 2017b.

PREADMET. Disponível em:<<https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity/>>. Acesso em 20 de março de 2017c.

PRICE, P. M. et al. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 286, n. 2, p. F378-F384, 2004.

QUEIROZ, M. L. et al. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* bark extract and beta-lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 2, p. 228-235, 2008.

QI, Z. Who traditional medicine strategy 2014-2023. **Geneva: World Health Organization**, 2013.

RABE, P. et al. Quinine total synthesis. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 40, p. 3655–3662, 1907.

RAINSFORD, K. Side-effects of anti-inflammatory/analgesic drugs: epidemiology and gastrointestinal tract. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 5, p. 156-159, 1984.

RAMSEYER, V. D.; GARVIN, J. L. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : regulation of renal function and blood pressure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, n. 10, p. F1231-F1242, 2013.

RASLAN, D. S. **Constituintes químicos de *Tabebuia incana* A. Gentry: síntese de furanonaftoquinonas**. Tese de doutorado, ICEx, UFMG, Belo Horizonte, 1988.

REUS, T. L. et al. Dose-dependent cell necrosis induced by silica nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104723, 2020.

RIJPMA, S. R. et al. Atovaquone and quinine anti-malarials inhibit ATP binding cassette transport activity. **Malaria Journal**, v. 13, n. 359, 2014.

RONCAGLIONI, A. et al. *In silico* methods to predict drug toxicity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 802-806, 2013.

RONCAGLIONI, A.; BENFENATI, E. *In silico*-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 441-450, 2008.

ROPER, C. et al. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis, **Lancet**, v. 361, n. 9364, p. 1174-1181, 2003.

RUSSELL, P.F et al. Man's Mastery of Malaria. **Man's Mastery of Malaria.**, 1955.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen, 1959.

SANTANA, C. F. et al. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do liber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos (Recife)**, v. 8, n. 1, p. 89-94, 1968.

SANTOS, C. E. M. Toxicologia *in silico*: uma nova abordagem para análise do risco químico. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 1, 2015.

SANTOS, T. R. M. et al. Toxicopharmacological evaluations of the small-molecule LQFM166: Inducer of apoptosis and MDM2 antagonist. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, p. 20-27, 2018.

SCHETZ, M. et al. Drug-induced acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 11, n. 6, p. 555-565, 2005.

SCHMIDT, C. Q. et al. More than just immune evasion: Hijacking complement by *Plasmodium falciparum*. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 1, p. 71-84, 2015.

SCHUCK, D. C. et al. Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. **Malaria Journal**, v. 12, n. 234, p. 1-6, 2013.

SCHUMACHER, R. F.; SPINELLI, E. Malaria in Children. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 2012073, 2012.

SCHRAGE, A. et al. Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 39, n. 3, p. 273-295, 2011.

SCHWAIBLMAIR, M. et al. Drug induced interstitial lung disease. **The Open Respiratory Medicine Journal**, v.6, p. 63-74, 2012.

SEAR, J. W. Kidney dysfunction in the postoperative period. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, n. 1, p. 20-32, 2005.

SENIOR, J. R. Drug hepatotoxicity from a regulatory perspective. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 507-524, 2007.

SERVAIS, H. et al. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1213-1221, 2006.

SGRO, C. et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 451-455, 2002.

SHAHRBAF, F. G.; ASSADI, F. Drug-induced renal disorders. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 3, p. 57-60, 2015.

SHAPIRO, T. A. et al. Prophylactic activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum* in humans. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 831-836, 1999.

SHAPIRO, G. I. et al. Phase I trial of ARQ 501, an activated checkpoint therapy (ACT) agent, in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 16\_suppl, p. 3042-3042, 2005.

SHARMA, A. et al. Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl [1, 4] naphthoquinones and their activity against the human

malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 48-53, 2013.

SHEARER, T. W. et al. The role of *in vitro* ADME assays in antimalarial drug discovery and development. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 8, n. 1, p. 89-98, 2005.

SHERGIS, J. L. et al. Herbal medicine for adults with asthma: a systematic review. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 6, p. 650-659, 2016.

SHIN, N. N. et al. Fluorescent 1, 4-Naphthoquinones To Visualize Diffuse and Dense-Core Amyloid Plaques in APP/PS1 Transgenic Mouse Brains. **ACS Chemical Neuroscience**, 2019.

SHUBAR, H. M. et al. SDS-coated atovaquone nanosuspensions show improved therapeutic efficacy against experimental acquired and reactivated toxoplasmosis by improving passage of gastrointestinal and blood–brain barriers. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, n. 2, p. 114-124, 2011.

SICARDI, S. M.; FERRATO, E. Mutagenic activity of isoxazolylnaphthoquinoneimines assayed by micronucleus bone marrow test. **Mutation Research**, v. 343, n. 1, p. 61-66, 1995.

SIES, H.. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.

SILVA, M. N. et al. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinona, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SINDEN, R.E. *Plasmodium* differation in the mosquito. **Parassitologia**, v. 41, n. 1-3, p. 139-148, 1999.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. **Medicinal Research Reviews**, v. 13, n. 5, p. 569-621, 1993.

SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.

SMITH R. C. et al. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 644–661, 2014.

SNEADER, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. **Bmj**, v. 321, n. 7276, p. 1591-1594, 2000.

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214-217, 2005.

SODERO, A. C. et al. Insights into cytochrome bc1 complex binding mode of antimalarials 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones through molecular modelling. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.112, n. 4, p. 299-308, 2017.

SOUZA, N. B. et al. Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and in mice malaria studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 546-552, 2014.

SRIVASTAVA, I. K. et al. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 3961-3966, 1997.

STAMBERG, J. et al. Non-mutagenicity of the hair dye, henna, in the Ames Test. **Mutation Research**, v. 62, n. 2, p. 383-387, 1979.

STARLING, S. M. **Síntese de Furanonaftoquinonas Potencialmente Tripanosomicidas, Cálculos de Afinidade Eletrônica e Potencial de Redução de Benzoquinonas**. Tese de doutorado, ICEx, UFMG, Belo Horizonte, 1996.

STEINMASSL, D. et al. LLC-PK 1 epithelia as a model for *in vitro* assessment of proximal tubular nephrotoxicity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 31, n. 2, p. 94-106, 1995.

STEVES, J. L.; BAKER, T. K. The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3-4, p. 162-167, 2009.

STONE, E. XXXII. An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. In a letter to the Right Honourable George Earl of Macclesfield, President of RS from the Rev. Mr. Edward Stone, of Chipping-Norton in Oxfordshire. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, n. 53, p. 195-200, 1763.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SUMSAKUL, W.; NA-BANGCHANG, K.. Permeability of plumbagin across human intestinal cell *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 3, p. 380-389, 2016.

SUNG, K. L. et al. The PreADMET approach: web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. **Computer Aided Molecular Design Research Center**, p. 156-743, 2006.

SWARNKAR, S. et al. Rotenone-induced apoptosis and role of calcium: a study on Neuro-2a cells. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 9, p. 1387-1397, 2012.

SZAKÁCS, G. et al. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 379-393, 2008.

TABOSA, M. A. M. et al. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of lapachol. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1837-1846, 2018.

TAKALA-HARRISON, S. et al. Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 670-679, 2015.

TAKENATA, T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. **BJU International**, v. 88, n. Suppl 2, p. 7-10, 2001.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F. P. Metabolismo dos fármacos. **Universidade Federal do Piauí, S/A. Acedido a**, v. 5, 2009.

TARASIUK, A. ; FICHNA, J. Effectiveness and therapeutic value of phytochemicals in acute pancreatitis: A review. **Pancreatology**, 2019.

TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905-915, 2013.

THANACHARTWET, V. et al. Acute renal failure in patients with severe *falciparum* malaria: using the WHO 2006 and RIFLE criteria. **International Journal of Nephrology**, v. 2013, 2013.

THOMEER, M. J. et al. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. **The European Respiratory Journal. Supplement**, v. 32, p. 114s-118s, 2001.

TIKKANEN, L. et al. Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in the *Salmonella/microsome* test. **Mutation Research**, v. 124, n. 1, p. 25-34, 1983.

TONHOLO, D. R. et al. Preclinical toxicity of innovative molecules: *In vitro*, *in vivo* and metabolism prediction. **Chemico-biological Interactions**, v. 315, p. 108896, 2020.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 101, n. 712, p. 483-514, 1927.

TU, Y.. Artemisinin—a gift from traditional Chinese medicine to the world (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 35, p. 10210-10226, 2016.

VAIDYA, A. B.; MATHER, M. W. Atovaquone resistance in malaria parasites. Drug resistance updates: **Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 3, n. 5, p. 283-287, 2000.

VALERIO, L. G. *In silico* toxicology for the pharmaceutical sciences. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 241, n. 3, p. 356-370, 2009.

VAN DE WATERBEEEMD, H; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise? **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature: New Biology**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. (Ed.). Aspirin and other salicylates. Chapman & Hall Medical, 1992.

VAROTTI, F. P. et al. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3868-3874, 2008.

VERDRAGER, J. Localized permanent epidemics: the genesis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 26, n. 1, p. 23-28, 1995.

VERKMAN, A. S. Drug discovery in academia. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 286, n. 3, p. c465-474, 2004.

VIDIC, T. et al. Bioassays for evaluating the water-extractable genotoxic and toxic potential of soils polluted by metal smelters. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 5, p. 472-483, 2009.

VILLAMIL, S. F. et al. Redox cycling of  $\beta$ -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2004. p. 67-87.

VIRIYAVEJAKUL, P. et al. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 106, 2014.

VISWANADHAN, V. N. et al. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

VISWANADHAN, V. N. et al. An approach to rapid estimation of relative binding affinities of enzyme inhibitors: application to peptidomimetic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 protease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 705-712, 1996.

WADI, I. et al. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 3047-3089, 2019.

WAMAE, K. et al. No evidence of *P. falciparum* K13 artemisinin conferring mutations over a 24-year analysis in Coastal Kenya, but a near complete reversion to chloroquine wild type parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 01067-19, 2019.

WANG, M. S. et al. Pathogenesis of axonal degeneration: parallels between Wallerian degeneration and vincristine neuropathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 59, n. 7, p. 599-606, 2000.

WANG, J. Y. et al. Naphthoquine phosphate and its combination with artemisinin. **Acta Tropica**, v. 89, n. 3, p. 375-381, 2004.

WELLS, T. N. et al. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 145-151, 2010.

WELLS, T. et al. Malaria medicines: a glass half full?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 6, p. 424-442, 2015.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723-735, 2014.

WHITE, M. T. et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet. Infectious Diseases**, v.15, n. 12, p. 1450-1458, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. (Ed.).**Antimalarial Drug Combination Therapy: Report of a Who Technical Consultation: 4-5 April 2001**. World Health Organization, 2001.

WHO. 2016. World Malaria Report 2016. World Health Organization; Geneva

WHO. 2018. World Malaria Report 2018. World Health Organization; Geneva.

WHO. 2019. World Malaria Report 2019. World Health Organization; Geneva.

WISINTAINER, G. G. N de S. et al. O-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. induces selective cytotoxicity in tumor cell lines. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 17472-17481, 2015.

WIESE, M.; PAJEVA, I. K. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 685-713, 2001.

WILKENING, S. et al. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals**, v. 31, n. 8, p. 1035-1042, 2003.

WILMES, A. et al. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathways in human renal proximal tubule toxicity. *Toxicology in vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA*, v. 25, n. 3, p. 613-622, 2011.

WILSON, R. H. et al. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 7, p. 1767-1774, 2002.

WRIGHT, C. W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 67-71, 2005.

WYSOWSKI, D. K.; SWARTZ, L. Adverse drug event surveillance and drug withdrawals in the United States, 1969-2002: the importance of reporting suspected reactions. *Archives of Internal Medicine*, v. 165, n. 12, p. 1363-1369, 2005.

YAMASHITA, S. et al. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 3, p. 195-204, 2000.

YAZDANIAN, M. et al. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 9, p. 1490-1494, 1998.

YEBOAH-ANTWI, K. et al. Impact of prepackaging antimalarial drugs on cost to patients and compliance with treatment. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 79, n. 5, p. 394-399, 2001.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man- fact or myth. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clinics in Liver Disease*, v. 17, n. 4, p. 507-518, 2013.

ZANI, C.L, et al. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 7, p. 2379-2381, 1991.

ZHANG, Q. et al. Cytotoxicity of synthesized 1, 4-naphthoquinone oxime derivatives on selected human cancer cell lines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 66, n. 6, p. 612-619, 2018.

ZHAO, Y. H. et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, n. 6, p. 749-784, 2001.

ZUANG, V. The neutral red release assay: a review. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 29, n. 5, p. 575-599, 2001.



**Tabela A1- Resultados para predição das propriedades das HNQs (2-hidróxi-3-(1'-alquenil)-1,4-naftoquinonas) (série 1) de acordo com o programa PreADMET –Predição de ADME**

| Propriedades      | A     | B     | C      | D      | E      | F   | G   | H   | I     | J      | K       | L   | M   | N     | O      | P     | Q     | R      | S      |
|-------------------|-------|-------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-------|--------|---------|-----|-----|-------|--------|-------|-------|--------|--------|
| <b>Estruturas</b> |       |       |        |        |        |     |     |     |       |        |         |     |     |       |        |       |       |        |        |
| <b>1a</b>         | 0,852 | 0,303 | 20,950 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,434 | 153,462 | Non | 100 | 4,930 | -3,067 | 1,877 | 1,877 | -5,850 | -4,638 |
| <b>1b</b>         | 0,834 | 0,159 | 21,093 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,465 | 205,488 | Non | 100 | 2,152 | -2,902 | 2,331 | 2,331 | -6,158 | -5,026 |
| <b>1c</b>         | 0,149 | 0,082 | 20,452 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,499 | 209,408 | Non | 100 | 0,935 | -2,738 | 2,785 | 2,785 | -6,466 | -5,413 |
| <b>1d</b>         | 0,292 | 0,043 | 18,592 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,539 | 178,617 | Non | 100 | 0,405 | -2,570 | 3,239 | 3,239 | -6,773 | -5,801 |
| <b>1e</b>         | 0,823 | 0,153 | 21,376 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,498 | 227,034 | Non | 100 | 0,966 | -2,800 | 2,532 | 2,532 | -6,198 | -5,399 |
| <b>1f</b>         | 0,242 | 0,044 | 19,669 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Subs. | 96,047 | 176,102 | Non | 100 | 0,432 | -2,481 | 3,202 | 3,202 | -6,819 | -5,827 |
| <b>1g</b>         | 1,153 | 0,019 | 20,090 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 95,954 | 244,689 | Non | 100 | 0,240 | -2,679 | 2,916 | 2,916 | -7,168 | -6,061 |
| <b>1h</b>         | 0,112 | 0,011 | 20,875 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Non | Weak. | 96,401 | 53,584  | Non | 100 | 0,035 | -2,742 | 3,587 | 3,587 | -7,433 | -6,951 |

**Legenda:** **A**-BBB; **B**-Buffer\_solubility\_mg\_L; **C**-Caco2, **D**-CYP\_2C19\_inhibition; **E**-CYP\_2C9\_inhibition; **F**-CYP\_2D6\_inhibition; **G**-CYP\_2D6\_substrate; **H**-CYP\_3A4\_inhibition; **I**-CYP\_3A4\_substrate; **J**-HIA; **K**-MDCK; **L**-Pgp\_inhibition; **M**-Plasma\_Protein\_Binding; **N**-Pure\_water\_solubility\_mg\_L; **O**-Skin\_Permeability; **P** -SKlogD\_value; **Q**-SKlogP\_value; **R**- SKlogS\_buffer; **S**- SKlogS\_pure; **Inhib**- inhibitor; **Subs**- substrate; **Weak**- weakly

**Tabela A2 - Resultados para predição das propriedades das orto-FNQs (orto-furanonaftoquinonas) (série 2) de acordo com o programa PreADMET –Predição de ADME**

| Propriedades      | A     | B      | C      | D      | E      | F   | G   | H      | I     | J      | K       | L      | M   | N     | O          | P     | Q     | R      | S      |
|-------------------|-------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|--------|-------|--------|---------|--------|-----|-------|------------|-------|-------|--------|--------|
| <b>Estruturas</b> |       |        |        |        |        |     |     |        |       |        |         |        |     |       |            |       |       |        |        |
| <b>2a</b>         | 2,264 | 83,684 | 23,129 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,778 | 256,176 | Non    | 100 | 1,819 | -<br>3,534 | 2,558 | 2,558 | -3,404 | -5,067 |
| <b>2b</b>         | 3,178 | 39,165 | 31,231 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,681 | 224,335 | Non    | 100 | 0,462 | -<br>3,327 | 3,128 | 3,128 | -3,762 | -5,690 |
| <b>2c</b>         | 3,636 | 20,470 | 30,920 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,596 | 210,089 | Non    | 100 | 0,200 | -<br>3,172 | 3,582 | 3,582 | -4,070 | -6,078 |
| <b>2d</b>         | 0,034 | 10,663 | 36,918 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,528 | 169,545 | Inhib. | 100 | 0,087 | -<br>3,012 | 4,036 | 4,036 | -4,377 | -6,465 |
| <b>2e</b>         | 3,640 | 18,259 | 35,459 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,596 | 172,923 | Inhib. | 100 | 0,117 | -<br>3,172 | 3,697 | 3,697 | -4,119 | -6,313 |
| <b>2f</b>         | 3,674 | 3,488  | 39,895 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Subs. | 97,498 | 153,648 | Inhib. | 100 | 0,054 | -<br>2,886 | 3,882 | 3,882 | -4,917 | -6,725 |
| <b>2g</b>         | 4,827 | 14,468 | 33,967 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,465 | 170,335 | Non    | 100 | 0,024 | -<br>2,981 | 4,233 | 4,233 | -4,278 | -7,059 |
| <b>2h</b>         | 3,139 | 5,281  | 24,811 | Inhib. | Inhib. | Non | Non | Inhib. | Weak. | 97,671 | 119,735 | Inhib. | 100 | 0,003 | -<br>3,038 | 4,943 | 4,943 | -4,767 | -7,926 |

**Legenda:** A-BBB; B-Buffer\_solubility\_mg\_L; C-Caco2; D-CYP\_2C19\_inhibition; E-CYP\_2C9\_inhibition; F-CYP\_2D6\_inhibition; G-CYP\_2D6\_substrate; H-CYP\_3A4\_inhibition; I-CYP\_3A4\_substrate; J-HIA; K-MDCK; L-Pgp\_inhibition; M-Plasma\_Protein\_Binding; N-Pure\_water\_solubility\_mg\_L; O-Skin\_Permeability; P -SKlogD\_value; Q-SKlogP\_value; R- SKlogS\_buffer; S- SKlogS\_pure; **Inhib-** inhibitor; **Subs-** substrate; **Weak-** weakly

**Tabela A3- Resultados para predição das propriedades das *para*-FNQs (*para*-furanonaftoquinonas) (série 3) de acordo com o programa PreADMET –Predição de ADME**

| Propriedades      | A         | B          | C          | D          | E          | F   | G   | H      | I         | J          | K           | L     | M          | N          | O          | P     | Q     | R      | S          |
|-------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|--------|-----------|------------|-------------|-------|------------|------------|------------|-------|-------|--------|------------|
| <b>Estruturas</b> |           |            |            |            |            |     |     |        |           |            |             |       |            |            |            |       |       |        |            |
| <b>3a</b>         | 2,26<br>4 | 83,68<br>4 | 23,12<br>9 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,77<br>8 | 256,17<br>6 | Non   | 100        | 1,819<br>- | -<br>3,536 | 2,558 | 2,558 | -3,404 | -<br>5,067 |
| <b>3b</b>         | 3,17<br>8 | 39,16<br>5 | 31,23<br>1 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,68<br>1 | 224,33<br>5 | Inhib | 100        | 0,462<br>- | -<br>3,330 | 3,128 | 3,128 | -3,762 | -<br>5,690 |
| <b>3c</b>         | 3,63<br>6 | 20,47<br>0 | 37,82<br>5 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,59<br>6 | 210,08<br>9 | Inhib | 100        | 0,201<br>- | -<br>3,173 | 3,582 | 3,582 | -4,070 | -<br>6,078 |
| <b>3d</b>         | 0,03<br>4 | 10,66<br>2 | 36,91<br>8 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,52<br>8 | 155,46<br>7 | Inhib | 100        | 0,087<br>- | -<br>3,015 | 4,036 | 4,036 | -4,377 | -<br>6,465 |
| <b>3e</b>         | 3,64<br>0 | 18,25<br>9 | 35,45<br>9 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,59<br>6 | 172,92<br>3 | Inhib | 100        | 0,117<br>- | -<br>3,174 | 3,697 | 3,697 | -4,119 | -<br>6,313 |
| <b>3f</b>         | 4,76<br>9 | 3,488      | 39,32<br>8 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Subs.     | 97,49<br>8 | 172,85<br>3 | Inhib | 99,91<br>3 | 0,054<br>- | -<br>2,885 | 3,882 | 3,882 | -4,917 | -<br>6,725 |
| <b>3g</b>         | 4,82<br>7 | 14,46<br>8 | 36,52<br>7 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,46<br>5 | 169,36<br>7 | Inhib | 100        | 0,024<br>- | -<br>2,980 | 4,233 | 4,233 | -4,278 | -<br>7,059 |
| <b>3h</b>         | 0,04<br>3 | 8,851      | 24,65<br>6 | Inhib<br>. | Inhib<br>. | Non | Non | Inhib. | Weak<br>. | 97,67<br>1 | 91,330      | Inhib | 100        | 0,003<br>- | -<br>3,038 | 4,905 | 4,905 | -4,543 | -<br>7,949 |

**Legenda:** A-BBB; B-Buffer\_solubility\_mg\_L; C-Caco2, D-CYP\_2C19\_inhibition; E-CYP\_2C9\_inhibition; F-CYP\_2D6\_inhibition; G-CYP\_2D6\_substrate; H-CYP\_3A4\_inhibition; I-CYP\_3A4\_substrate; J-HIA; K-MDCK; L-Pgp\_inhibition; M-Plasma\_Protein\_Binding; N-Pure\_water\_solubility\_mg\_L; O-Skin\_Permability; P -SKlogD\_value; Q-SKlogP\_value; R- SKlogS\_buffer; S- SKlogS\_pure; **Inhib-** inhibitor; **Subs-** substrate; **Weak-** weakly

**Tabela A4- Resultados para predição das propriedades dos AMQs (aminopropoxinaftoquinonas) (série 4),  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol, atovacona de acordo com o programa PreADMET –Predição de ADME**

| Propriedades                         | A     | B      | C      | D      | E      | F      | G     | H      | I     | J      | K       | L      | M      | N      | O      | P      | Q     | R     | S     |
|--------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| <b>Estruturas</b>                    |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       |       |       |
| <b>4a</b>                            | 0,677 | 24,929 | 17,244 | Inhib. | Inhib. | Non    | Non   | Inhib. | Subs. | 98,252 | 105,094 | Non    | 69,745 | 13,754 | -3,950 | 1,344  | 1,344 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 3,965 | 4,224 |
| <b>4b</b>                            | 0,044 | 12,993 | 15,290 | Non    | Non    | Non    | Subs. | Non    | Non   | 93,707 | 42,386  | Non    | 32,085 | 46,611 | -3,768 | -0,081 | 1,263 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 4,348 | 3,793 |
| <b>4c</b>                            | 0,020 | 5,847  | 14,397 | Non    | Inhib. | Inhib. | Subs. | Non    | Weak. | 94,632 | 41,376  | Non    | 56,603 | 2,534  | -3,282 | 0,788  | 2,132 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 4,761 | 5,124 |
| <b>4d</b>                            | 0,033 | 25,846 | 12,153 | Non    | Non    | Non    | Subs. | Non    | Non   | 93,462 | 80,385  | Non    | 25,917 | 74,253 | -3,896 | -0,452 | 0,891 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 4,027 | 3,569 |
| <b><math>\alpha</math>-lapachona</b> | 2,437 | 0,332  | 44,093 | Inhib. | Inhib. | Non    | Non   | Inhib. | Subs. | 97,945 | 241,345 | Non    | 89,617 | 2,905  | -2,920 | 2,787  | 2,787 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 5,863 | 4,921 |
| <b><math>\beta</math>-lapachona</b>  | 2,289 | 3,089  | 39,580 | Inhib. | Inhib. | Non    | Non   | Inhib. | Subs. | 97,944 | 223,403 | Non    | 98,284 | 8,192  | -2,964 | 2,804  | 2,804 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 4,894 | 4,471 |
| <b>Lapachol</b>                      | 0,802 | 3,699  | 21,348 | Inhib. | Inhib. | Non    | Non   | Non    | Weak. | 95,377 | 227,077 | Non    | 92,040 | 15,833 | -2,799 | 3,108  | 3,108 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 4,816 | 4,185 |
| <b>Atovacona</b>                     | 2,090 | 0,543  | 22,463 | Inhib. | Inhib. | Non    | Non   | Non    | Non   | 96,369 | 7,202   | Inhib. | 100    | 0,056  | -2,637 | 5,121  | 5,121 | -     | -     |
|                                      |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |         |        |        |        |        |        |       | 5,830 | 6,813 |

**Legenda:** **A**-BBB; **B**-Buffer\_solubility\_mg\_L; **C**-Caco2; **D**-CYP\_2C19\_inhibition; **E**-CYP\_2C9\_inhibition; **F**-CYP\_2D6\_inhibition; **G**-CYP\_2D6\_substrate; **H**-CYP\_3A4\_inhibition; **I**-CYP\_3A4\_substrate; **J**-HIA; **K**-MDCK; **L**-Pgp\_inhibition; **M**-Plasma\_Protein\_Binding; **N**-Pure\_water\_solubility\_mg\_L; **O**-Skin\_Permeability; **P** -SKlogD\_value; **Q**-SKlogP\_value; **R**- SKlogS\_buffer; **S**- SKlogS\_pure; **Inhib**- inhibitor; **Subs**- substrate; **Weak**- weakly

**Tabela A5- Resultados para predição das propriedades das HNQs (2-hidróxi-3-(1'-alquenil)-1,4-naftoquinonas) (série 1) de acordo com o programa PreADMET –Predição de Toxicologia**

| Propriedades      | A       | B        | C        | D           | E        | F        | G        | H        |
|-------------------|---------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Estruturas</b> |         |          |          |             |          |          |          |          |
| <b>1a</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>1b</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>1c</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>1d</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>1e</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>1f</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>1g</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>1h</b>         | mutagen | Positive | Negative | medium_risk | positive | positive | negative | negative |

**Legenda:** A-Ames\_test; B-Carcino\_Mouse, C-Carcino\_Rat; D-hERG\_inhibition; E-TA100\_10RLI; F-TA100\_NA; G-TA1535\_10RLI; H-TA1535\_NA

**Tabela A6- Resultados para predição das propriedades das orto-FNQs (orto-furanonaftoquinonas) (série 2) de acordo com o programa PreADMET –Predição de Toxicologia**

| Propriedades      | A       | B        | C        | D           | E        | F        | G        | H        |
|-------------------|---------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Estruturas</b> |         |          |          |             |          |          |          |          |
| <b>2a</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | negative |
| <b>2b</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>2c</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>2d</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>2e</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | negative |
| <b>2f</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>2g</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>2h</b>         | mutagen | Positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | negative |

**Legenda:** A-Ames\_test; B-Carcino\_Mouse, C-Carcino\_Rat; D-hERG\_inhibition; E-TA100\_10RLI; F-TA100\_NA; G-TA1535\_10RLI; H-TA1535\_NA

**Tabela A7- Resultados para predição das propriedades das *para*-FNQs (*para*-furanonaftoquinonas) (série 3) de acordo com o programa PreADMET – Predição de Toxicologia**

| Propriedades      | A       | B        | C        | D           | E        | F        | G        | H        |
|-------------------|---------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Estruturas</b> |         |          |          |             |          |          |          |          |
| <b>3a</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | negative |
| <b>3b</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | positive |
| <b>3c</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>3d</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | positive |
| <b>3e</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | negative |
| <b>3f</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | negative |
| <b>3g</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | positive | negative |
| <b>3h</b>         | Mutagen | positive | positive | medium_risk | positive | positive | negative | negative |

**Legenda:** A-Ames\_test; B-Carcino\_Mouse, C-Carcino\_Rat; D-hERG\_inhibition; E-TA100\_10RLI; F-TA100\_NA; G-TA1535\_10RLI; H-TA1535\_NA

**Tabela A8- Resultados para predição das propriedades dos AMQs (aminopropoxinaftoquinonas) (série 4),  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, lapachol e atovacona de acordo com o programa PreADMET –Predição de Toxicologia**

| Propriedades                         | A       | B        | C        | D           | E        | F        | G        | H        |
|--------------------------------------|---------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Estruturas</b>                    |         |          |          |             |          |          |          |          |
| <b>4a</b>                            | mutagen | negativo | negativo | medium_risk | positive | positive | negativo | negativo |
| <b>4b</b>                            | mutagen | positive | negativo | medium_risk | negativo | positive | negativo | positive |
| <b>4c</b>                            | mutagen | negativo | negativo | medium_risk | negativo | positive | negativo | positive |
| <b>4d</b>                            | mutagen | positive | negativo | medium_risk | negativo | positive | negativo | positive |
| <b><math>\alpha</math>-lapachona</b> | mutagen | positive | negativo | low_risk    | positive | positive | positive | negativo |
| <b><math>\beta</math>-lapachona</b>  | mutagen | positive | negativo | medium_risk | positive | positive | positive | negativo |
| <b>Lapachol</b>                      | mutagen | positive | positive | medium_risk | negativo | positive | negativo | negativo |
| <b>Atovacona</b>                     | mutagen | positive | negativo | medium_risk | negativo | negativo | negativo | negativo |

**Legenda:** A-Ames\_test; B-Carcino\_Mouse, C-Carcino\_Rat; D-hERG\_inhibition; E-TA100\_10RLI; F-TA100\_NA; G-TA1535\_10RLI; H-TA1535\_NA



**Tabela A10 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância 1a**

|                             | <b>Dia 1</b> | <b>Dia 2</b> | <b>Dia 3</b> | <b>Dia 4</b> |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>CTL - (g)</b>            | 18,96        | 16,6         | 17,8         | 13,88        |
| <b>CTL - (g/animal)</b>     | 6,32         | 5,55         | 5,93         | 4,63         |
| <b>Grupo I (g)</b>          | 16,29        | 12,88        | 15,95        | 14,21        |
| <b>Grupo I (g/animal)</b>   | 5,43         | 4,29         | 5,32         | 4,74         |
| <b>Grupo II (g)</b>         | 16,25        | 12,28        | 13,78        | 14,57        |
| <b>Grupo II (g/animal)</b>  | 5,42         | 4,09         | 4,59         | 4,86         |
| <b>Grupo III (g)</b>        | 15,45        | 13,86        | 11,74        | 12,63        |
| <b>Grupo III (g/animal)</b> | 5,15         | 4,62         | 3,92         | 4,21         |

**Tabela A11- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda da substância 1a**

|                  | <b>Peso dos animais<br/>(g)</b> | <b>Peso do fígado<br/>(g)</b> | <b>(%)<br/>fígado</b> | <b>Peso dos<br/>rins (g)</b> | <b>(%)<br/>rins</b> |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| <b>CTL -</b>     |                                 |                               |                       |                              |                     |
| <b>1</b>         | 37,96                           | 2,22                          | 5,85                  | 0,49                         | 1,29                |
| <b>2</b>         | 34,51                           | 1,82                          | 5,27                  | 0,45                         | 1,30                |
| <b>3</b>         | 35,80                           | 2,21                          | 6,17                  | 0,44                         | 1,23                |
| <b>Grupo I</b>   |                                 |                               |                       |                              |                     |
| <b>1</b>         | 35,62                           | 1,81                          | 5,08                  | 0,35                         | 0,98                |
| <b>2</b>         | 37,94                           | 1,78                          | 4,69                  | 0,37                         | 0,97                |
| <b>3</b>         | 35,62                           | 1,63                          | 4,58                  | 0,34                         | 0,95                |
| <b>Grupo II</b>  |                                 |                               |                       |                              |                     |
| <b>1</b>         | 36,62                           | 1,55                          | 4,23                  | 0,42                         | 1,15                |
| <b>2</b>         | 38,29                           | 1,72                          | 4,49                  | 0,36                         | 0,94                |
| <b>3</b>         | 36,03                           | 1,19                          | 3,30                  | 0,29                         | 0,80                |
| <b>Grupo III</b> |                                 |                               |                       |                              |                     |
| <b>1</b>         | 37,41                           | 1,71                          | 4,57                  | 0,40                         | 1,07                |
| <b>2</b>         | 35,73                           | 1,72                          | 4,81                  | 0,36                         | 1,01                |
| <b>3</b>         | 38,14                           | 1,74                          | 4,56                  | 0,37                         | 0,97                |



**Tabela A13 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda da substância 1g**

|                             | <b>Dia 1</b> | <b>Dia 2</b> | <b>Dia 3</b> | <b>Dia 4</b> |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>CTL - (g)</b>            | 18,96        | 16,6         | 17,8         | 13,88        |
| <b>CTL - (g/animal)</b>     | 6,32         | 5,55         | 5,93         | 4,63         |
| <b>Grupo I (g)</b>          | 19,35        | 15,05        | 16,98        | 17,93        |
| <b>Grupo I (g/animal)</b>   | 6,45         | 5,02         | 5,66         | 5,98         |
| <b>Grupo II (g)</b>         | 15,70        | 14,78        | 13,93        | 15,49        |
| <b>Grupo II (g/animal)</b>  | 5,23         | 4,93         | 4,64         | 5,16         |
| <b>Grupo III (g)</b>        | 8,64         | 9,42         | 10,09        | 9,43         |
| <b>Grupo III (g/animal)</b> | 4,32         | 4,71         | 5,04         | 4,71         |

**Tabela A14- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda da substância 1g**

|                  | <b>Peso dos animais<br/>(g)</b> | <b>Peso do fígado<br/>(g)</b> | <b>(%)<br/>fígado</b> | <b>Peso dos<br/>rins (g)</b> | <b>(%)<br/>rins</b> |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| <b>CTL -</b>     |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 37,96                           | 2,22                          | 5,85                  | 0,49                         | 1,29                |
| 2                | 34,51                           | 1,82                          | 5,27                  | 0,45                         | 1,30                |
| 3                | 35,80                           | 2,21                          | 6,17                  | 0,44                         | 1,23                |
| <b>Grupo I</b>   |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 36,65                           | 1,62                          | 4,42                  | 0,41                         | 1,12                |
| 2                | 37,71                           | 1,90                          | 5,04                  | 0,41                         | 1,09                |
| 3                | 34,09                           | 1,69                          | 4,96                  | 0,37                         | 1,08                |
| <b>Grupo II</b>  |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 36,58                           | 1,52                          | 4,15                  | 0,37                         | 1,01                |
| 2                | 37,29                           | 1,64                          | 4,40                  | 0,39                         | 1,04                |
| 3                | 36,67                           | 1,49                          | 4,06                  | 0,35                         | 0,95                |
| <b>Grupo III</b> |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 41,72                           | 1,96                          | 4,69                  | 0,40                         | 0,96                |
| 2                | -                               |                               |                       |                              |                     |
| 3                | 40,93                           | 1,95                          | 4,76                  | 0,42                         | 1,03                |



**Tabela A16 - Consumo de ração dos camundongos durante o experimento de toxicidade aguda do lapachol**

|                             | <b>Dia 1</b> | <b>Dia 2</b> | <b>Dia 3</b> | <b>Dia 4</b> |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>CTL - (g)</b>            | 18,96        | 16,6         | 17,8         | 13,88        |
| <b>CTL - (g/animal)</b>     | 6,32         | 5,55         | 5,93         | 4,63         |
|                             |              |              |              |              |
| <b>Grupo I (g)</b>          | 20,35        | 17,73        | 16,44        | 14,23        |
| <b>Grupo I (g/animal)</b>   | 6,78         | 5,91         | 5,48         | 4,74         |
|                             |              |              |              |              |
| <b>Grupo II (g)</b>         | 19,72        | 17,86        | 16,19        | 17,84        |
| <b>Grupo II (g/animal)</b>  | 6,57         | 5,95         | 5,4          | 5,95         |
|                             |              |              |              |              |
| <b>Grupo III (g)</b>        | 15,55        | 16,69        | 18,23        | 17,43        |
| <b>Grupo III (g/animal)</b> | 5,18         | 5,56         | 6,08         | 5,81         |

**Tabela A17- Dados dos camundongos no dia da Eutanásia: peso dos animais (g), peso do fígado (g), peso do rim (g), porcentagem do peso do fígado e do rim em relação ao peso total – teste de toxicidade aguda do lapachol**

|                  | <b>Peso dos animais<br/>(g)</b> | <b>Peso do fígado<br/>(g)</b> | <b>(%)<br/>fígado</b> | <b>Peso dos<br/>rins (g)</b> | <b>(%)<br/>rins</b> |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| <b>CTL -</b>     |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 37,96                           | 2,22                          | 5,85                  | 0,49                         | 1,29                |
| 2                | 34,51                           | 1,82                          | 5,27                  | 0,45                         | 1,30                |
| 3                | 35,80                           | 2,21                          | 6,17                  | 0,44                         | 1,23                |
| <b>Grupo I</b>   |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 37,54                           | 1,95                          | 5,19                  | 0,43                         | 1,14                |
| 2                | 36,7                            | 1,73                          | 4,71                  | 0,39                         | 1,06                |
| 3                | 36,17                           | 1,81                          | 5,00                  | 0,40                         | 1,10                |
| <b>Grupo II</b>  |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 36,21                           | 2,01                          | 5,55                  | 0,35                         | 0,97                |
| 2                | 38,99                           | 2,01                          | 5,15                  | 0,41                         | 1,05                |
| 3                | 34,60                           | 1,79                          | 5,17                  | 0,42                         | 1,21                |
| <b>Grupo III</b> |                                 |                               |                       |                              |                     |
| 1                | 34,34                           | 1,71                          | 4,98                  | 0,41                         | 1,19                |
| 2                | 35,89                           | 1,64                          | 4,57                  | 0,38                         | 1,06                |
| 3                | 36,18                           | 1,87                          | 5,17                  | 0,41                         | 1,13                |