

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO *in silico* DE ANÁLOGOS DE
LAPACHOL EM ENZIMA ALVO DE *Leishmania (Leishmania)*
amazonensis

Érica Patrícia dos Reis Ferreira

BELÉM - PA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO *in silico* DE ANÁLOGOS DE
LAPACHOL EM ENZIMA ALVO DE *Leishmania (Leishmania)*
amazonensis

Autor: Érica Patrícia dos Reis Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
Co-Orientador: Prof. Dra. Maria Fani Dolabela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Ensaios biológicos de produtos naturais e sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará

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

-
- F383p Ferreira, Érica Patrícia dos Reis Ferreira
 Planejamento e avaliação in sílica de análogos de lapachol em enzima alvo de
 Leishmania
(Leishmania) amazonensis / Érica Patrícia dos Reis Ferreira Ferreira. — 2017
 112 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
(PPGCF), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
 Orientação: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos Santos
1. Lapachol. 2. Análogos . 3. Docagem. I. Santos, Lourivaldo da Silva Santos, *orient.*
 II. Título
-

FOLHA DE APROVAÇÃO

Érica Patrícia dos Reis Ferreira

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO *in sílico* DE ANÁLOGOS DE
LAPACHOL EM ENZIMA ALVO DE *Leshmania (Leishmania)*
amazonensis.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Ensaio biológicos de produtos naturais e sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos (Orientador)
Instituição: Universidade Federal do Pará

Ass: _____

Prof. Dr. Marivaldo José Costa Côrrea
Instituição: Universidade Federal do Pará

Ass: _____

Prof. Dr. José Luiz Viera
Instituição: Universidade Federal do Pará

Ass: _____

Prof.Dr. (Suplente) Tais Vanessa Gabbay Alves
Instituição: Universidade Federal do Pará

Ass: _____

*Aos anjos amigos que eu encontrei p
caminhos da vida. Sem eles a caminhada
seria bem mais dolorida*

Agradecimentos

A Deus...

Por nunca desistir de mim.

RESUMO

Érica Patrícia dos Reis Ferreira. **Planejamento e avaliação *in silico* de análogos de Lapachol em enzima alvo de *Leshmania (Leishmania) amazonensis***. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

O estudo visa planejar e avaliar análogos do Lapachol com atividade leishmanicida *in silico*. Para a triagem dos análogos, foram realizados estudos preditivos de características farmacocinéticas, toxicológicas, de atividade biológica e *molecular docking* ou ancoragem molecular. Para as características farmacocinéticas e toxicológicas utilizou-se o programa on-line PreADMET, enquanto as atividades biológicas foram avaliadas pelo programa on-line *Prediction of Activity Spectra for Substances* (PASS). Na docagem o alvo terapêutico foi a Tripanotiona Redutase, sendo que a avaliação da interação entre as moléculas e a proteína alvo foi realizada pelo programa *Molegro virtual docker* (MVD). A extração e isolamento do Lapachol foram realizados e a sua identificação foi realizada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Todos os análogos e o Lapachol são bem absorvidos no intestino com a absorção variando entre 79,745% a 99,056%, além disso, inibem as enzimas do Citocromo P450 (CYP). Quase metade das moléculas testadas (42,1%) possuem uma distribuição moderada para o sistema nervoso central (SNC), incluindo o Lapachol, enquanto que o restante possui elevada distribuição. Os resultados da toxicidade das moléculas estudadas sugerem que 63,16% são mutagênicas e carcinogênicas, dentre elas o Lapachol, e 10,5% e 5,26% são carcinogênicas e mutagênicas, respectivamente, porém 21,05% demonstraram não apresentar citotoxicidade. Na docagem as substâncias estudadas apresentaram energia menor que a substância padrão, embora apresentem boa interação com energias entre 94,343 a 115,635 KJ/mol. O Lapachol foi isolado e identificado. De acordo com os resultados análogo que apresentou melhores características foi o 3,4-diidroxí-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O).

Palavras chaves: Lapachol, análogos, docagem.

ABSTRACT

Érica Patrícia dos Reis Ferreira. **Design and evaluation *in silico* of Lapachol analogs in enzyme of the *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 108 p. 2017. Qualification (Master). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2017.

The study aims to design and evaluate anti-mastigote activity of *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity Lapachol analogues. The studies predictive pharmacokinetic characteristics were performed, toxicological, biological activity and molecular docking or molecular docking. For pharmacokinetic and toxicological characteristics used the online program PreADMET while biological activities were assessed by online program Prediction Spectra of Activity of Substances (PASS). For the molecular docking analysis, the therapeutic target was selected Triponationa reductase, and the evaluation of interaction between the molecules and target this protein was performed by the virtual Molegro program docker (MVD). The extraction and isolation of Lapachol was performed and its identification was performed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). All analogs Lapachol and are well absorbed from the intestine with the absorption ranging from 79.745% to 99.056%, furthermore inhibit the cytochrome P450 (CYP). Almost half of the molecules tested (42.1%) had moderate distribution into the central nervous system (CNS), including Lapachol, while the remainder have high distribution. The results of the toxicity of the molecules studied suggest that 63.16% are mutagenic and carcinogenic, which includes Lapachol and 10.5% and 5.26% are carcinogenic and mutagenic, respectively, but showed 21.05% not exhibit cytotoxicity. In molecular docking the substances studied showed less energy than the standard substance, although they have good interaction with energies between 94.343 to 115.635 kJ / mol. The Lapachol was isolated and identified. According with to the analogo results show that with the best characteristics was the 3,4-dihydroxy-2- (2-hydroxy-3-methylbutil) naftaleno-1 (4H) -one.

Key words: Lapachol, analogues, virtual docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos de Leishmania cutânea no mundo, 2012.	23
Figura 2: Ciclo biológico da Leishmania spp.	24
Figura 3: Estibogluconato de sódio.	25
Figura 4: Antimoniato de Meglumina.	25
Figura 5: Estrutura química da Anfotericina B.	25
Figura 6.: Representação da participação da Tripanotiano Redutase na redução da Tripanotiona dissulfeto em tripanotiona ditiol.	27
Figura 7: Cascata de eventos que necessitam da TR para o controle de ROS.	28
Figura 8: Estrutura química do Lapachol.	29
Figura 9: Estrutura química da alfa-lapachona (α) e beta-lapachona (β).	29
Figura 10: Esquema dos principais metabólitos identificados e vias metabólicas propostas para o Lapachol em bile rato. Os retângulos tracejados indicam o local de ligação de metabolito.	35
Figura 13: Estrutura química das moléculas utilizadas no estudo de docagem.	53
Figura 14: Estrutura química das moléculas utilizadas no estudo de docagem.	54
Figura 15: Estrutura da 2-Hydroxy-1,4-naftoquinona (HNQ).	64
Figura 16: Ligação do FAD a tripanotiona redutase com os resíduos Ala 46; Ala 46; Ser 14; Ser 14; Arg 290; Lis 60; Lis 60; Tr 335; Tr 335; Tr 51; Tr 51; Met 333; Met 333; Asp 327; Asp 327; Asp 327; Asp 35; Asp 35; Cis 52; Thy 198.	71
Figura 17: Redocking do FAD com obtenção de RMSD de 1,844Å, apresentando boa sobreposição.	74
Figura 18: (A) Rendimento das frações obtidas a partir das serragens de <i>Tabebuia</i> spp.; (B) placas de cromatografia em camada delgada (CCD) das frações de 1 a 13; (C) placa de CCD com as amostras de β -lapachona [B], Lapachol [L] e frações 1 e 2.	86
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H de Fr3 - (CDCl_3 , 300 Hz)	89
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H de Fr3, expansão - (CDCl_3 , 300MHz)	90
Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C de Fr3 (CDCl_3 , 75MHz)	91
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C de Fr3, expansão (CDCl_3 , 75MHz)	92
Figura 23: Espectro de RMN de C de Fr3, DEPT (CDCl_3 , 75MHz)	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antipromastigota e citotoxicidade de análogos do Lapachol.	19
Tabela 2: Atividade antileishmania, citotoxicidade e seletividade de naftoquinonas.	31
Tabela 3: Propriedades farmacocinéticas do Lapachol e seus análogos.	60
Tabela 4: Rendimentos das Frações obtidas a partir do fracionamento da Fração 2 (coluna cromatográfica, solvente dicloro metano)	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Atividades biológicas descritas na literatura do Lapachol e seus análogos.	26
Quadro 2: Avaliação antibacteriana pelo método de difusão em ágar do Lapachol e alguns análogos.	29
Quadro 3: Classificação da ligação do análogo do Lapachol a proteína plasmática e probabilidade de interação medicamentosa.	40
Quadro 4: Características genéticas de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas no teste de ames.	43
Quadro 5: Predição da mutagenicidade e carcinogenicidade do Lapachol e análogos.	62
Quadro 6: Predição de atividade biológicas do Lapachol e seus análogos.	64
Quadro 7: Avaliação da energia e da distância das ligações das naftoquinonas análogos do Lapachol.	73
Quadro 8: Ligação do Lapachol e seus análogos a tripanotiona redutase, apresentando as ligações com os resíduos que interagiram.	76
Quadro 9: Associação de informações sobre ao Lapachol e seus análogos.	83
Quadro 10: Espectros de RMN 1H da fração Fr3 em comparação com a literatura.	91
Quadro 11: Espectros de RMN 13C da fração Fr3 em comparação com a literatura	92

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%- Porcentagem.

/ - por, símbolo de divisão.

± - mais ou menos

ΔG – variação de energia

α - alfa

β - beta

Å – Ângström

°C – graus Celsius

μg - Microgramas

μL - Microlitros

μM - Micromol

BHE – Barreira hemato-encefálica

bio- - mutação para biotina negativo

Caco2- Células do intestino

CDC- Centers for disease control and prevention

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

cm – centímetros

CTL - Linfócitos T

dK - diidrofiloquinona

DNA - ácido desoxirribonucleico

EBV - vírus de Epstein-Barr

F2 - Fração

FAD - Flavina adenina dinucleótido

FDA - Food and Drug Administration

Fr3 – Fração obtida por fracionamento da fração 2.

HIA – Absorção intestinal humana

his - mutação responsável pela síntese da histidina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HNQ - 2-Hidroxi-1,4-naftoquinona

Hz - Hetz

J - constantes de acoplamento

K1 - filoquinona

K2 - menaquinona

K3 – menadiona

mg - miligrama

min - minuto

mL – mililitro

mm - milímetro

mmol - milimol

MVD – Molegro virtual docker

NNN - Neal, Novy e Nicolle

NTP - National Toxicology Program

P.A. - Padrão analítico

PASS- Prediction of Activity Spectra for Substances

PLDR - componente rápido de reparação dos danos ao DNA

PP – Proteínas plasmáticas

RMN – ressonância magnética nuclear

ROS- espécies reativas de oxigênio

SIDA – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida

SNC – Sistema nervoso central

Sol. Inj. - solução de injeção

SPB – substituição de pares de basespp

T(S)₂ - tripanotona dissulfeto

T(SH)₂ - tripanotina ditiol

THF - Tetraidrofurano

TMS - tetrametilsilano

TR- Tripanotona redutase

TXN - triparedoxina

TXNPx - triparedoxina peroxidase

uvr β - deleção do gene uvr.

W2 – Plasmodium falciparum resistente a cloroquina.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Leishmanioses	21
2.2. Lapachol e análogos	29
3. OBJETIVOS	38
3.2. Objetivo geral	38
3.3. Objetivos específicos	38
4.1. Material	39
4.2.1. SELEÇÃO DAS MOLÉCULAS A SEREM INCLUÍDAS NESTE ESTUDO	41
4.2.2. ESTUDOS DE PREDIÇÃO DE ATIVIDADES	42
4.2.2.1. Predição da Absorção, Distribuição, metabolismo e toxicidade (ADME/Tox)	42
4.2.3. PREDIÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	47
4.2.3.1. Docagem molecular (Docking molecular)	47
4.2.3.1.1. Critérios utilizados para a seleção do alvo farmacológico	47
4.2.3.1.2. Docagem molecular	48
4.2.4. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DA MOLÉCULA PARA SÍNTESE	49
4.2.5. SÍNTESE DO LAPACHOL	50
4.2.5.1. Obtenção do Lapachol	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.2. Estudos de predição dos aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos	54
5.3. Predição de atividades biológicas	66

5.4. Seleção dos análogos para síntese	84
5.5. Planejamento da síntese	86
5.5.1. OBTENÇÃO DO LAPACHOL	86
5.5.1.1. Identificação do Lapachol	87
6. CONCLUSÃO	96
7. REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grave problema de saúde pública, ocorrendo, principalmente, em países em desenvolvimento (OMS, 2016¹). O maior número de casos é notificado por países situados na África, Ásia e América Latina, totalizando 98 países (ALVAR et al. 2012; OMS, 2016¹). Anualmente, cerca de 2 milhões de casos, sendo que 90% dos casos de Leishmaniose visceral são notificados por apenas seis países (Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão) e 9 países (Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República da Síria) são responsáveis pela maioria dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (OMS, 2016¹).

Atualmente, apenas dois grupos de medicamentos são utilizados para o tratamento desta afecção: os fármacos pertencentes ao grupo antimonial (Estibogluconato sódico e Antimoniato de *N*-metil-glucamina) e os não antimonials (Pentamidina e Anfotericina B). Estes fármacos apresentam vários efeitos tóxicos, além de serem onerosos para os sistemas de saúde pública (MONZONOTE, 2009). Esta situação se agrava ainda mais devido ao surgimento da resistência parasitária aos fármacos supracitados (DECUYPERE et al. 2005; THAKUR, 2001). Se tornando necessário a busca de alternativas terapêuticas, algumas substâncias de origens naturais mostraram-se promissoras como leishmanicidas, como, por exemplo, o Lapachol.

O Lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butanil)-1,4-naftoquinona], isolado de espécies da família *Bignoniaceae*, mostrou-se ativo contra formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*, porém *in vivo* não impediu o desenvolvimento de lesões (TEIXEIRA et al. 2001). Visando potencializar a atividade e reduzir a citotoxicidade estudos realizaram alterações estruturais no Lapachol, sendo obtidos análogos mais ativos contra as formas promastigota de *L. amazonenses* e *L. braziliensis*, isolapachol e acetilisolapachol. Na Tabela 1 observa-se que as alterações moleculares favoreceram a atividade, no entanto não interferiram significativamente na citotoxicidade (LIMA et al. 2004; SALUSTIANO et al. 2010).

Tabela 1: Atividade antipromastigota e citotoxicidade de análogos do Lapachol.

Análogo	Antipromastigota (CI ₅₀ ±DP, µg/mL)		Macrófagos	IS
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	CC ₅₀ ±DP, µg/mL	
Lapachol	5,2 ± 0,7	11,9 ± 6,9	3,8-6,2*	<2
Isolapachol	4,4 ± 2,9	9,3 ± 2,7	NA	NA
Sal de K+ Lapachol	7,7 ± 4,1	21,4 ± 2,9	NA	NA
Sal de K+ isolapachol	7,8 ± 0,2	15,8 ± 0,0	NA	NA
Acetilapachol	1,6 ± 0,0	3,4 ± 0,5	< 3,2	<2
Diidrolapachol	7,3 ± 0,3	54,0 ± 9,0	NA	NA

Fonte: Lima et al. 2004; Salustiano et al. 2010; NA (Não avaliado); IS< 2: não seletivo

Legenda: * várias linhagens celulares

Devido ao elevado potencial leishmanicida destas naftoquinonas, novos estudos que relacionam estrutura e atividade ou citotoxicidade precisam ser realizados. As mudanças estruturais de um composto químico podem influenciar diretamente na sua atividade biológica ou na sua toxicidade, diminuindo ou aumentando estas propriedades (DOLABELA, 1997; SALAS et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2013; JORQUEIRA et al. 2006), este fato pode colaborar na elaboração de compostos químicos mais eficazes e seguros. Entretanto, nem todas as modificações em uma molécula levam a moléculas mais ativas e, por isso, deve-se selecionar as moléculas mais promissoras para só então sintetizá-las, já que, a síntese de grande quantidade de moléculas é onerosa por gerar consumo de materiais e mão de obra especializada (GUIDO et al. 2008). Para essa triagem, a ciência detém uma gama de programas computacionais que podem agilizar a busca por novas terapias, um exemplo de teste computacional que pode ser empregado na triagem de moléculas é a predição de atividade pelo PASS, que prevê possíveis atividades para a estrutura química estudada, e o *molecular docking*, que vai analisar a interação entre o alvo e a molécula, importante na ação farmacológica (RAMA, KUMAR e BALAJI, 2015). Além disso, outras propriedades da substância podem ser avaliadas virtualmente, tais como: as propriedades farmacocinéticas e as propriedades toxicológicas (PANDEY et al. 2016).

Portanto, estudos de planejamento racional de análogos do Lapachol, por meio de programas computacionais, são importantes, pois corroboram para elaboração de moléculas que sejam menos mutagênicas e carcinogênicas e mais eficazes e seletivas, o que contribui, também, para uma menor toxicidade. Essas alterações benéficas podem ser comprovadas com a avaliação biológica destes

produtos. Com isso, esse estudo objetivou realizar o planejamento, síntese e avaliação anti-mastigota de *L. amazonensis* de análogos do Lapachol.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

As Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Este parasito, pertence ao Reino Protista (HAECKEL, 1866 apud LEVINE et al. 1980); Sub-reino Protozoa (GOLDFUSS, 1817 apud LEVINE et al. 1980); Filo Sarcomastigophora (HONIGBERG e BALAMUTH, 1963 apud LEVINE et al. 1980); Sub-filo Mastigophora (DESING, 1866 apud LEVINE et al. 1980); Classe Zoomastigophorea (CALKINS, 1909 apud LEVINE et al. 1980); Ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963 apud LEVINE et al. 1980); Sub-ordem Trypanosomatina (KENT, 1880 apud LEVINE et al. 1980); Família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901 apud LEVINE et al. 1980); Gênero *Leishmania* (ROSS, 1903 apud LEVINE et al. 1980).

A subdivisão do gênero *Leishmania* se dá de acordo com região geográfica em que a espécie é encontrada, sendo assim, as espécies que causam a doença na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e África, que são consideradas do “Velho mundo”, são do subgênero *Vianna* e as espécies encontradas nos países das Américas, ditos do “Novo mundo”, são do subgênero *Leishmania* (LAINSON et al. 1986; DAVID e CRAFT, 2009). Dentre as espécies do subgênero *Leishmania* há aquelas que causam a forma cutânea da doença como a *L. (L.) tropica* e os complexos *L. mexicana*, compreendido pelas espécies: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) venezuelensis*, e o *L. donovani*, no qual estão inseridas as espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Enquanto outras como a *L. (L.) chagasi* causam a Leishmaniose visceral (GRIMALDI JUNIOR, TESH, MCMAHON-PRATT, 1989). Já no subgênero *Viannia* têm-se as espécies do complexo *L. brasiliensis*: *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guayanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*, que causam a LTA (REY, 1991).

Esta doença pode ser dividida, segundo a sua forma clínica, em dois grupos principais: a forma tegumentar americana (LTA), a qual pode ser subdividida em cutânea e muco-cutânea, e a forma visceral (LV), forma mais grave da doença,

podendo levar a morte 90% dos casos. A Leishmaniose, entre outras doenças negligenciadas, se caracteriza, principalmente, por ocorrer em países em desenvolvimento (DAVIES et al. 2003; OMS, 2015), ela afeta cerca 1.3 milhões de pessoas todo ano e estima-se que ocorram 20.000 a 30.000 mortes anualmente (OMS, 2016²). As populações mais atingidas estão nos continentes da África, Ásia e América Latina (OMS, 2016³). Atualmente, mais de 98 países são endêmicos para leishmaniose, sendo que mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão e a maioria dos casos LTA ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Iran, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e da República Árabe Síria (Figura 1). Os países da América do Sul, portanto, têm grande participação nos números de casos e quase 90% dos casos de LTA ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (ALVAR et al. 2012; OMS, 2016⁴).

O Brasil tem alta influência nas taxas de Leishmaniose e, portanto, deve-se considerar essa doença como uma das prioridades para as políticas de saúde pública (ALVAR et al. 2012). No país, em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente de LV, o que significa 2,0 casos/100.000 habitantes, e a letalidade vem aumentando nos últimos anos, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012, a espécie mais frequentemente encontrada como causadora de LV no Brasil é a *Leishmania chagasi* (BRASIL, 2016¹). Enquanto que para a LTA são registrados cerca de 21.000 casos/ano, ou seja, 11,3 casos/100.000 habitantes, sendo a região Norte a mais afetada com 54,4 casos/habitantes. As principais espécies causadoras de LTA no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRASIL, 2016²).

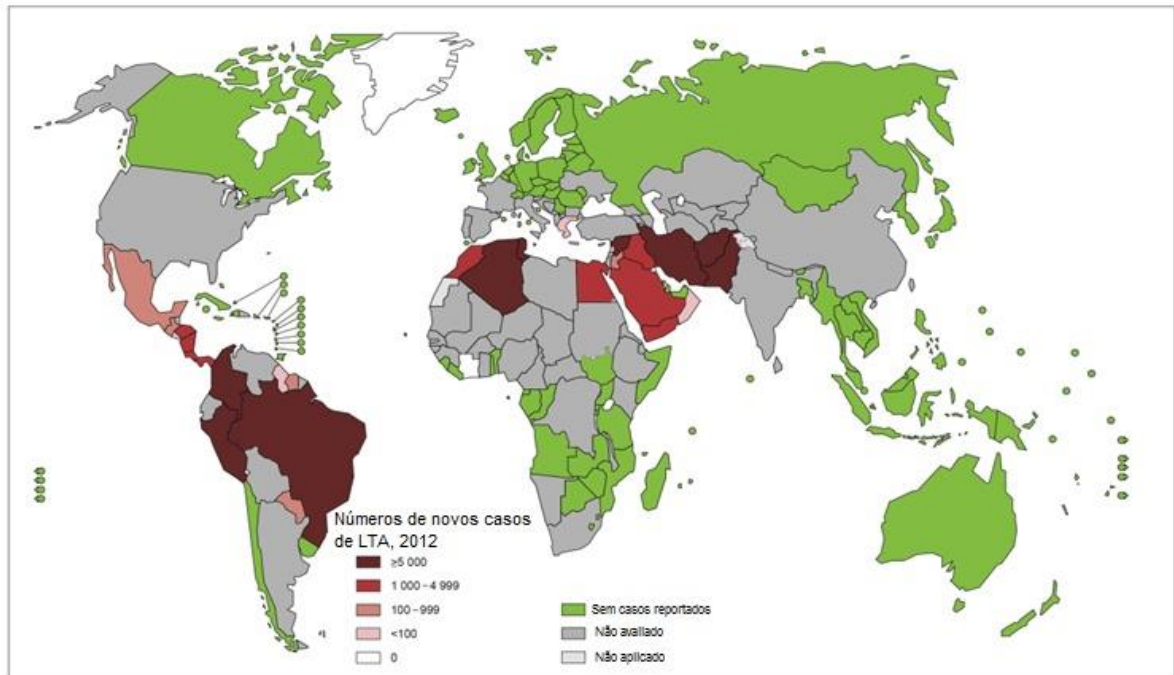


Figura 1: Número de casos de *Leishmania cutânea* no mundo, 2012.
Fonte: OMS, 2016³.

A transmissão se dá durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada de mosquitos flebotomíneos, da Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae e gênero *Lutzomyia* (RANGEL e LAINSON, 2009). O ciclo de vida de *Leishmania spp* possui dois estágios, na qual, se encontra na forma flagelada com vida extracelular, promastigota, e outra de forma ovoide ou esférica e sem flagelo, amastigota, que possui vida intracelular obrigatória. O vetor infectado ao se alimentar do sangue de um mamífero regurgita as promastigotas que estão em excesso em seu intestino, essas, então, chegam a corrente sanguínea através da lesão gerada na hora do repasto sanguíneo. Então, são fagocitadas por macrófagos, no interior dessas células as promastigotas se transformam em amastigotas que se reproduzem e rompem os macrófagos caindo na corrente sanguínea (ALEXANDER E RUSSELL, 1992). Quando houver um novo repasto sanguíneo com o Flebotomíneo, este será infectado pelas amastigotas e no seu intestino essa forma sofrerá mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e irá se transformar em promastigota (ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994; Figura 2).

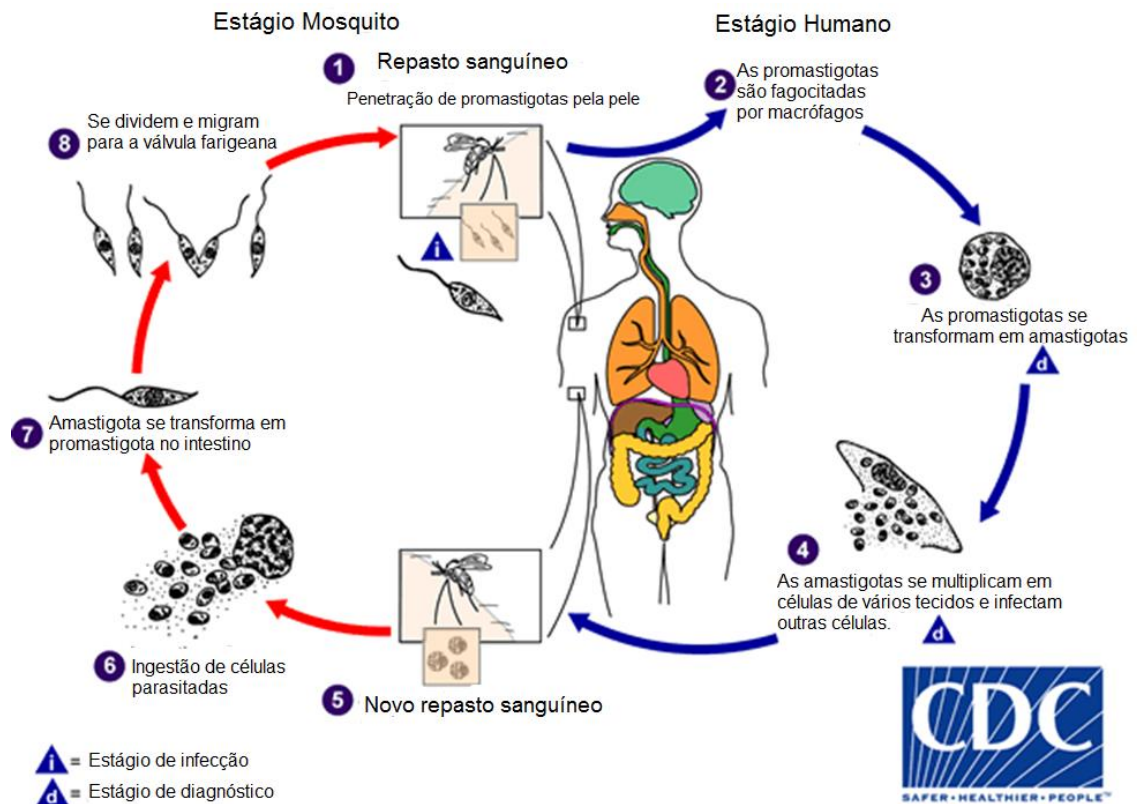


Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Legenda: A Leishmaniose é transmitida pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos. Os flebotomíneos injetam a forma infecciosa (isto é, promastigotas) de suas válvulas faringianas durante o repasto sanguíneo (1), as promastigotas que atingem o ferimento e são fagocitadas por macrófagos (2) e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Promastigotas se transformam nessas células para a forma amastigota (3), que se multiplicam por divisão simples e avançam para infectar outras células mononucleares fagocíticas (4). Flebotomíneos são infectados pela ingestão de células infetadas durante um novo repasto sanguíneo (5 e 6). Nos flebotomíneos, as amastigotas se transformam em promastigotas e se desenvolvem no intestino (7) e migram para a válvula faringiana (8)

Fonte: Adaptado de CDC, 2016.

Os fármacos utilizados hoje são os mesmos comercializados há décadas (MELO, 2009). São usados dois grupos de medicamentos os fármacos ditos de primeira linha são os antimoniais pentavalentes, Estibogluconato de sódio (Pentostam; Figura 3) e o Antimoniato de Meglumina (Glucantime; Figura 4) e o de segunda linha, Anfotericina B (Figura 5). No Brasil, apenas é comercializado o Glucantime.

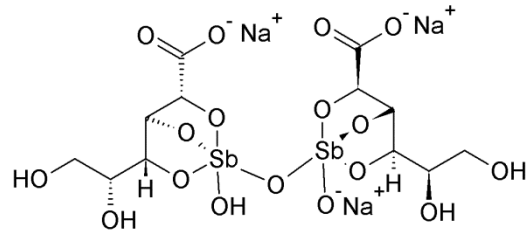


Figura 3: Estibogluconato de sódio.

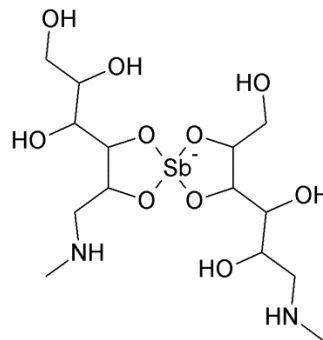


Figura 4: Antimoniato de Meglumina.

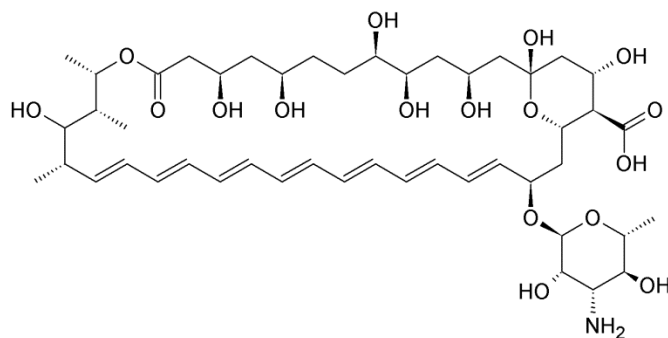


Figura 5: Estrutura química da Anfotericina B.

A terapia para Leishmaniose é difícil, pois todos os fármacos empregados possuem elevados efeitos tóxicos e a administração só pode ser realizada ambulatoriamente, aumentando o tempo de internação e, assim, levando-se os custos hospitalares, além disso, o uso dessa via é mais dolorosa para o paciente, pois a via de administração desses medicamentos é a intramuscular que gera incomodo e

sofrimento para o paciente (BRAGA et al., 2007). Outro problema na terapia da Leishmaniose é o crescente aumento da resistência parasitária.

Atualmente, parasitas resistentes aos fármacos supracitados vêm aparecendo, o que torna o contexto ainda mais grave. Essa resistência, é mais elevada em relação aos fármacos de primeira linha, cepas resistentes aos antimoniatos foram isoladas de pacientes no Nepal (DECUYPERE et al. 2005). Besselin e colaboradores (2002) sugerem que os possíveis mecanismos de resistência sejam devido à diminuição da concentração e efluxo dos fármacos. A manifestação mais notável deste problema é em Bihar, na Índia, por exemplo, praticamente, mais da metade da população não responde aos tratamentos (THAKUR, 2001). Além disso, esses medicamentos possuem alto potencial hepatotóxico, cardiotoxico, nefrotóxico, aliado a outros efeitos colaterais como dores musculares (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

A Anfotericina B é um antibiótico com atividade antifúngica, também possui os efeitos tóxicos como nefrotoxicidade e miocardite (SUNDAR e RAI, 2002), outros efeitos adversos são febres e calafrios relacionados a infusão e hipocalcemia, portanto sua utilização só deve ser realizada em ambiente hospitalar, elevando o custo do tratamento (BRAGA et al. 2007).

Devido ao elevado custo do tratamento, os efeitos tóxicos, a resistência crescente do parasito aos fármacos disponíveis e dificuldades enfrentadas durante a administração do medicamento, torna-se necessário à busca de alternativas terapêuticas. Nesta busca, deve-se priorizar o estudo de moléculas mais seletivas, isto é, atue em uma enzima presente apenas no protozoário, afim de, evitar uma possível toxicidade para as células humanas. Assim, os alvos de maior interesse são os da via biossíntese de esteróis, via glicolítica e a via tripanotiona que possuem uma diferença significativa em relação às vias das células humanas (CHAWLA e MADHUBALA, 2010).

A inibição da via da biossíntese de esteróis pode vim a ser um alvo de grande importância, uma vez que os tripanosomatideos sintetizam o ergosterol e outros esteróis para fazerem parte da composição da membrana celular, diferente dos seres humanos que possuem como maior constituinte da membrana o colesterol. A via de obtenção de energia desses parasitos é, também, outro alvo de interesse, pois sem energia não há vida, e distintamente das células humanas os protozoários dependem

do hospedeiro para fornecimento de carbono, para isso utilizam como única fonte de obtenção de energia a via glicólise, podendo ser alvo a gliceraldeído3-fosfato desidrogenase importante nesse processo (OPPERDOES, 1987). Outro importante alvo é a via Tripanotiona, pois é responsável pelo controle oxidativo das células do parasito, que são sensíveis ao aumento de radicais livres, portanto o controle desses elementos é importante para a integridade e viabilidade das células destes organismos, sendo Tripanotiona Redutase (TR) a enzima com maior atividade no controle do estresse oxidativo, sendo um excelente alvo (CHAWLA e MADHUBALA, 2010).

A TR é uma flavoproteína dissulfeto redutase que depende de NADPH e apenas é encontrada em parasitas da família Trypanosoma. Essa enzima tem função de antioxidante, sendo a principal forma de controle de espécies reativas de oxigênio (ROS) nesses parasitas, essa proteína substitui a glutatona redutase (GR) que é encontrada nos seres humanos (FAIRLAMB e CERANI, 1992; MÜLLER et al. 2003). A TR é responsável pela redução da tripanotiona em sua forma dissulfeto (T[S]2) para a forma dihidrotripanotiona (T[SH]2) que, por sua vez, irá reduzir a triparedoxina oxidada (TXN_{ox}) em triparedoxina reduzida (TXN_{red}) e, por fim, esta última, reduzirá a triparedoxina peroxidase oxidada (TXPN_{ox}) em triparedoxina peroxidase reduzida (TXPN_{red}) que é capaz de neutralizar as ROS, como pode-se ver na cascata apresentada na Figura 7. A ausência ou deficiência de TR faz com que a concentração de ROS dentro das células aumente matando ou impedindo o crescimento desses protozoários (FAIRLAMB, 2001).

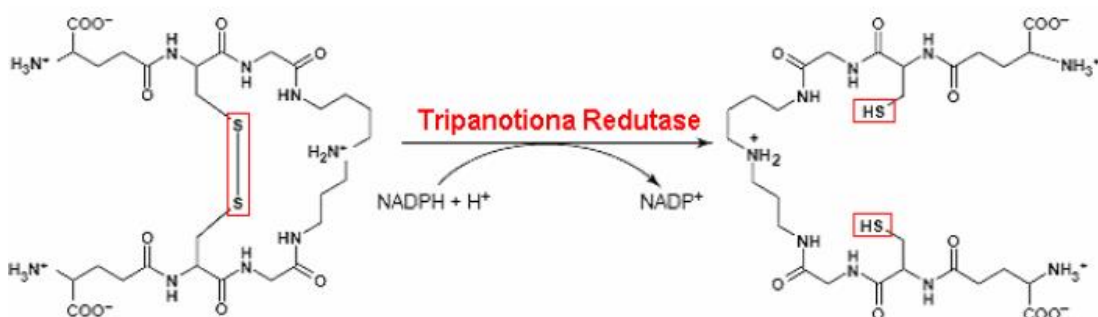


Figura 6: Representação da participação da Tripanotiano Redutase na redução da Tripanotiona dissulfeto em tripanotiona ditiol.

Fonte: Coracini, 2012.

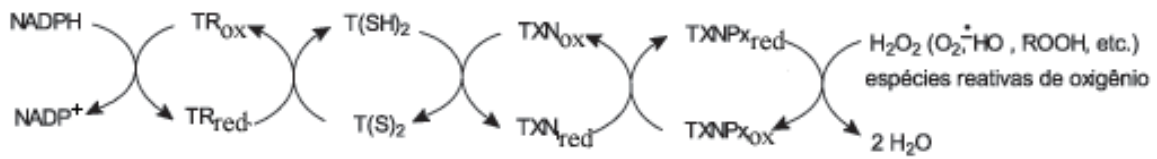


Figura 7: Cascata de eventos que necessitam da TR para o controle de ROS.

TXN= triparedoxina

TXNPx= triparedoxina peroxidase

Fonte: Coracini, 2012.

Esta proteína está presente nos Tripanossomatídeos que incluem protozoários de importância clínica, como, por exemplo, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* Um estudo anterior avaliou o pré-tratamento, de formas tripomastigotas *T. cruzi*, com naftoquinonas (β -lapachona e alil- β -lapachona), sendo observado a redução na percentagem de células infectadas em culturas de músculo liso (GONÇALVES et al. 1980). Na presença de oxigênio, estes compostos não inativaram a tripanotona redutase, mas produziram alterações em sua função protetora de regeneração de radicais livres. Estes resultados sugerem que naftoquinonas possam inibir esta enzima e constituir agentes antitripanossoma e antileishmania promissores (CASTRO, 1993; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007). Estes poucos estudos apresentados demonstram a carência de pesquisas que avaliam a atividade inibitória de naftoquinonas, em especial de origem natural e seus análogos, sobre a tripanotona redutase.

O Lapachol é uma naftoquinona isolada de diferentes espécies da flora brasileira, principalmente, naquelas que pertencem à família Bignoniaceae (FERREIRA, 1996). Além do Lapachol, α -lapachona e β -lapachona são isoladas de algumas espécies vegetais do gênero *Tabebuia* ou são obtidas a partir do Lapachol. Estas naftoquinonas podem ocasionar estresse oxidativo no parasito (TONHOLO et al. 1998; HILLARD et al. 2008), sendo que outras naftoquinonas demonstraram inibir *in vitro* a Tripanotona redutase (JOCKERS-SCHERUBL; SCHIRMER e KRAUTH-SIEGEL, 1989).

2.2. Lapachol e análogos

O Lapachol (Figura 8) é estudado extensamente por suas propriedades. As atividades biológicas relacionadas com o Lapachol, α -lapachola e β -lapachona (Figura 9) são: anti-helmíntica, anti-plasmódica, antineoplásica, anti-leishmaniose, anti-inflamatória, entre outras (ANTUNES et al. 2006; SACAU et al. 2003; ANDRADE-NETO et al. 2004; PÉREZ-SACAU et al. 2005; JORQUEIRA et al. 2006; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007; SALAS et al. 2008; TEIXEIRA et al. 2001; LIMA et al. 2004). A Quadro 1 apresenta alguns estudos já realizados com o Lapachol e seus análogos, em especial a α -lapachona e β -lapachona (Figura 9).

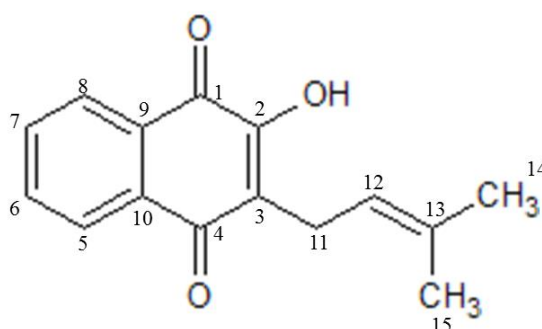


Figura 8: Estrutura química do Lapachol.

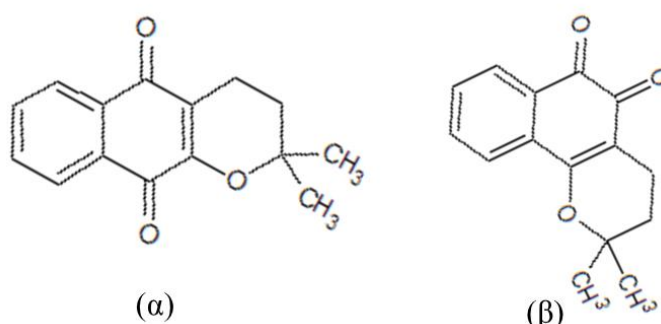


Figura 9: Estrutura química da alfa-lapachona (α) e beta-lapachona (β).

Quadro 1: Atividades biológicas descritas na literatura do Lapachol e seus análogos.

Atividades	Naftoquinonas	Referências
Antitumoral	β -Lapachona, orto-naftoquinona, α -naftoquinona, para-naftoquinona, Lapachol e hidroxilapachol	BOOTHMAN, TRASK, PARDEE, TRASK, PARDEE, 1989; DOLABELA, 1997; FRYDMAN et al. 1997; KRISHNAN e BASTOW, 2000; KATOH et al. 2014;
Antimicrobiana	Lapachol, α -Lapachona, β -Lapachona, β -nor-lapachona, α -nor-lapachona, β -l-lapachona, α -l-lapachona.	OLIVEIRA et al. 2001 ANTUNES et al. 2006
Antiviral		
Epstein-Barr Vírus	Lauroato de Lapachol, Diazomalonato de Lapachol, Acetato de 12-Bromo,13-hidroxi-lapachol, outros derivados do Lapachol,	SACAU et al. 2003
Antimalárica	W2: ácido sulfônico β -lapachona, 3-bromo- β -lapachona, 3-iodo- β -lapachona, β -lapachona F32: Lapachol, β -lapachona.	ANDRADE-NETO et al. 2004 PÉREZ-SACAU et al. 2005
Antitripanosoma	Epimastigota: piranoquinolonaquinona, β -lapachona, 3-4-Diidro-2'-2''-2H-nafto (1,2b) piran-5,6-diona), 3-alil- β -lapachona, plumbagina, Piranonaftoquinona, α -naftoquinona, Lapachol Tripomastigota: α -naftoquinona, β -lapachona, plumbagina, Piranonaftoquinona, Lapachol	DO CAMPO et al. 1978; GONÇALVES et al. 1980; JORQUEIRA et al. 2006; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007 SALAS et al. 2008
Antileishmania	Lapachol (amastigota) Acetilapachol, isolapachol, Lapachol, diidrolapachol	TEIXEIRA et al. 2001 LIMA et al. 2004

Diversos estudos realizados com o Lapachol e seus derivados estão relacionados à atividade antitumoral. O Lapachol na concentração de 0,783 μ m apresentou atividade significativa em linhagem de câncer de mama humano A549 (OLIVEIRA et al. 2002). A atividade antitumoral do Lapachol e seus análogos foi avaliada em diferentes linhagens celulares (Mewo, MDA, etc.), sendo observada melhor atividade dos derivados *orto* (β -lapachona e orto-naftoquinona), seguida dos

derivados *para* (α -lapachona e *para*-naftoquinona). O Lapachol e hidroxinaftoquinona apresentaram uma menor atividade. Fato interessante foi observado, a α -lapachona induzia maior fragmentação do DNA que a β -lapachona (Tabela 2; DOLABELA, 1997). Um estudo também analisou a β -lapachona em diferentes linhagens tumorais, sendo demonstrado que aparentemente este composto tem mais seletividade ao câncer de próstata [CI_{100} (PC-3) = 4 e (DU145) = 8 μ M], enquanto que para o câncer de mama e de ovário foi moderada (CI_{100} =16 μ M ; LI, WANG e PARDEE, 1995). Outros estudos demonstraram que a β -lapachona liga-se a topoisomerase I, causando sua inibição (FRYDMAN et al. 1997) e pode induzir a apoptose das células tumorais (LI et al. 2000).

Tabela 2: Atividade antileishmania, citotoxicidade e seletividade de naftoquinonas.

Substância	Parasito/ célula	Promastigota	Amastigota	Citotoxicidade	IS
		CI_{50} (μ M)	CI_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)	
Lapachol	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	34,72			1,71
	R.	99,98		59,30	0,59
	<i>L.amazonensis</i>				
	S	102,05	>1000		0,58
	R	63,28			0,94
nor-lapachol	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	>100			<0,15
	R.	>100	--	14,79	<0,15
	<i>L.amazonensis</i>				
	S	>100			<0,15
	R	>100			<0,15
α -lapachona	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	13,88			0,27
	R.	5,85		3,80	0,65
	<i>L.amazonensis</i>		--		
	S	16,08			0,24
	R	15,15			0,25
Nor- α -lapachona	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	1,54			1,14
	R.	1,28		0,77	0,70
	<i>L.amazonensis</i>		--		
	S	2,72			0,62
	R	1,54			0,97
β -lapachona	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	0,67			1,14
	R.	1,13			0,7
	<i>L.amazonensis</i>		--	0,79	
	S	2,90			0,27
	R	1,39			0,57
Nor- β -lapachona	<i>L. (infantum) chagasi</i>				
	S.	1,14			1,36
	R.	1,60			0,97
	<i>L.amazonensis</i>		--	1,55	
	S	2,42			0,27
	R	1,59			0,57

Legenda: S- isolado sensível aos antimoniais pentavalentes; R- isolado resistente aos antimoniais pentavalentes; CI_{50} - concentração inibitória 50%; CC_{50} - concentração citotóxica 50%; IS- índice de seletividade; IS= CI_{50} promastigota/ CC_{50} ; IS>2 = substância seletiva; IS< 2= não seletiva; -- não há dados.

Um estudo demonstrou que a α -lapachona e β -lapachona ligam-se ao complexo DNA-topoisomerase I acelerando o desenrolamento de DNA topoisomerase I, também inibe o componente rápido de reparação dos danos ao DNA (PLDR), dessa forma pode atuar de forma sinérgica a outros antineoplásicos (FRYDMAN et al. 1997). A β -lapachona não intercala no DNA, nem inibe a topoisomerase II. Seus análogos, α -lapachona e Lapachol, possuem mecanismo de ação semelhante a β -lapachona (BOOTHMAN, TRASK, PARDEE, TRASK, PARDEE, 1989). Em síntese, parece que estas alterações estruturais não interferem no mecanismo de ação, apesar da β -lapachona ser mais promissora como antitumoral.

O vírus de Epstein-Barr (EBV) tem sido associado com o crescente número de câncer, especialmente em pacientes com imunidade comprometida, como por exemplo, pessoas acometidas pelo HIV (THOMPSON e KURZROCK, 2004). Embora ele infecte cerca de 90% da população do mundo, quando o sistema imune está preservado o hospedeiro consegue controlar a infecção através dos efeitos citotóxicos específicos dos linfócitos T (CTL), que lizam células B infectadas EBV. Inicialmente, há o reconhecimento de fragmentos de proteínas virais, em seguida apresentada na superfície da célula por moléculas da classe I. Embora incapaz de eliminar o EBV a partir do corpo, de CTL parece ser essencial na manutenção do controle de forma latente células infectadas (ROONEY et al. 1995). No caso do portador do vírus HIV o controle da infecção por EBV não ocorre de forma adequada, logo a utilização de fármacos que atuam sobre o vírus Epstein-Barr pode ter papel protetor (THOMPSON e KURZROCK, 2004). Derivados do Lapachol apresentaram atividade sobre o EBV (Tabela 2; SACAU et al. 2003).

A avaliação de doenças infecciosas também é amplamente estudada, sendo que o Lapachol mostrou atividade inibitória sobre Bacilos gram-negativos, *Klebsiella* sp e *Proteus mirabilis*, numa concentração de 5mg/mL (OLIVEIRA et al. 2001). Antunes e colaboradores (2006) avaliaram também a atividade antibacteriana pelo método de difusão em placas do Lapachol e alguns análogos (α -Lapachona, β -Lapachona, β -nor-lapachona, α -nor-lapachona, β -l-lapachona, α -l-lapachona), foram testados frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Saccharomices cerevisiae* (achados

clínicos). O Lapachol e todos seus análogos apresentaram halo de inibição para *S. aureus* ATCC 25923 e para *P. aeruginosa* ATCC 27853, com exceção da α -Lapachona que não apresentou halo de inibição para esta última cepa, e apenas a β -Lapachona e β -nor-lapachona apresentaram halo de inibição para *Saccharomices cerevisae*. A β -Lapachona e a β -nor-lapachona obtiveram os melhores resultados como pode-se visualizar no Quadro 2.

Quadro 2: Avaliação antibacteriana pelo método de difusão em ágar do Lapachol e alguns análogos.

Compostos (Concentração 200 μ g/mL)	Cepas			
	(Zona de inibição mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. cerevisae</i>
Lapachol	11	11	-	-
α -Lapachona	18	16	-	-
β -Lapachona	20	14	-	10
β -nor-lapachona	20	19	-	13
α - nor-lapachona	13	-	-	-
β -l-lapachona	20	12	-	-
α - l-lapachona	16	13	-	-

Legenda: - Não houve formação de halos.

Fonte: Adaptado de Antunes et al. 2006.

A atividade antiparasitária do Lapachol e de alguns análogos já foi avaliada mostrando-se promissora, na maioria dos casos (Tabela 2). Em um estudo o Lapachol e a β -lapachona, investigados através da inoculação de *Toxocara canis* em ratos

BALB/, o determinado estudo, observou o potencial larvicida destes compostos na concentração 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente (MATA-SANTOS et al. 2015).

Derivados do Lapachol e β -lapachona mostraram-se ativos contra o clone de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (W2). A adição de halogênios ou ácido sulfônico na β -lapachona favorece a atividade antimalárica (Tabela 2; ANDRADE-NETO et al. 2004). Em outro estudo, o Lapachol e a β -lapachona, entre outros análogos, foram testados, também contra cepas de *P. falciparum* (cepa F32). Além disso, observaram atividade com IC₅₀= 24,4 e 4,1 μ M para o Lapachol e β -lapachona, respectivamente (PÉREZ-SACAU et al. 2005; Quadro 2).

Alguns estudos avaliaram a atividade de naftoquinonas contra o *Trypanosoma cruzi* (JORQUEIRA et al. 2006; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007; SALAS et al. 2008). A β -lapachona inibiu em 100% a forma epimastigota *Tripanossoma cruzi* na concentração que foi de 3,1 μ M, sendo que α -lapachona foi inativa, mesmo na maior concentração, a qual foi de 50 μ M (JORQUEIRA et al. 2006). Outros estudos avaliaram a atividade de naftoquinonas em formas epimastigota e tripomastigota, sendo o observado que, na maioria dos casos, a β -lapachona foi mais promissora (Quadro 2; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007; SALAS et al. 2008).

O Lapachol é ativado, *in vivo*, pelas enzimas hepáticas do citocromo P450 NADPH-redutase (P450 redutase), então as espécies reativas promovem a fragmentação do DNA através da geração do redox ciclismo (KUMAGAI et al. 1997). No metabolismo de fase I do Lapachol são obtidos metabolitos hidroxilados, com hidrogenação na posição de oxigênio ou um rearranjo de cadeia lateral (BAI et al. 2014). Os metabolitos da fase II são produtos da conjugação com o ácido glicurônico (BAI et al. 2014). A figura 10 sumariza o metabolismo do Lapachol. O metabolismo da α -lapachona, β -lapachona e seus análogos carecem de estudos.

A atividade de muitos fármacos antiparasitários tem sido relacionada ao estresse oxidativo (MAYA et al. 2003; BELINDA e SHANE, 2012). Avaliar a atividade *in vivo* destas naftoquinonas é extremamente importante, pois o metabolismo pode interferir na atividade. Estudo preliminar do Lapachol demonstrou que, *in vitro*, houve efeito inibitório em amastigota. Porém *in vivo*, o Lapachol não impediu o desenvolvimento de lesões induzidas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB ;

dose oral= 300 mg / kg / dia durante 42 dias). A observação de que Lapachol exerce atividade leishmanicida *in vitro* sem oferecer proteção significativa contra as lesões sugerem talvez ocorra a inibição da atividade microbicida nos macrófagos. Alternativamente, o Lapachol pode ter sido metabolizado em metabolito inativo. Outra alternativa é a concentração plasmática do Lapachol que pode estar abaixo da concentração terapêutica, por isso, não houve regressão da lesão (TEIXEIRA et al. 2001).

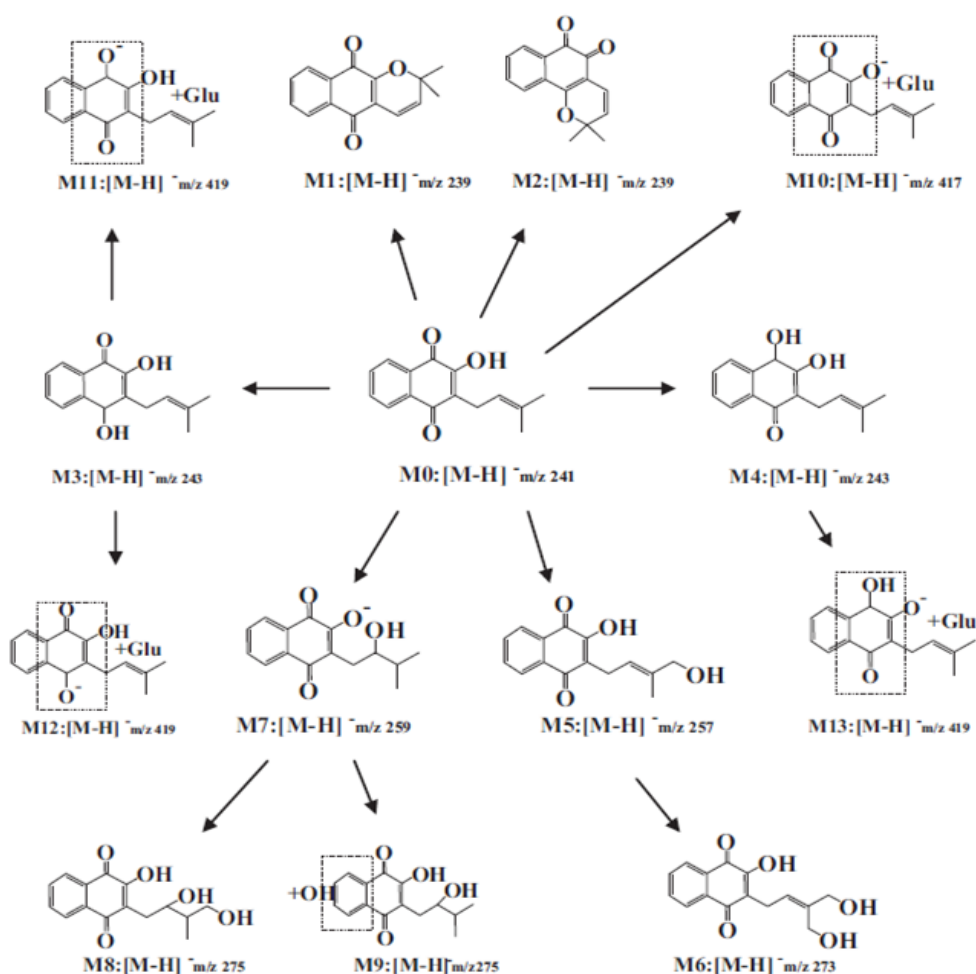


Figura 10: Esquema dos principais metabólitos identificados e vias metabólicas propostas para o Lapachol em bile rato. Os retângulos tracejados indicam o local de ligação de metabolito.

Legenda: M2: identificado como sendo um dehidro- β -lapachona (2,2-dimethyl-napto [1,2-b] pyran-5,6-dione); M3 e M4: foram como sendo diferentes isómeros hidrogenados do Lapachol e que eram os compostos semiquinona; M5: foi identificado como um hidroxilapachol, com a hidroxilação ocorrendo na porção de cadeia lateral de prenil do Lapachol; M6: foi sugerido que este composto foi formado a partir da hidroxilação de M5; M7: foi identificado como 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-hydroxy-butyl)-1,4-naftoquinona; M8 e M9: foram caracterizados como os metabólitos hidroxilados do Lapachol; M10: identificado como o produto resultante da reação de conjugação de Lapachol com ácido glicurônico no grupo 2-hidroxilo do Lapachol; M11, M12 e M13: foram caracterizados como os conjugados glicuronídeos de M3 e M4.

Fonte: BAI et al. 2014.

Várias questões em relação à atividade antileishmania do Lapachol e seus análogos precisam ser melhor avaliadas, como: quais alterações estruturais podem contribuir para o mecanismo de ação? Quais alterações podem contribuir para a redução da toxicidade e aumentar a seletividade? Mudanças estruturais interferem nos aspectos farmacocinéticos? Qual o mecanismo envolvido na atividade antileishmania?

O custo sintetizar e realizar os ensaios para comprovar a atividade leishmanicida, toxicidade (citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e pré-clínica) e aspectos farmacocinéticos é muito elevado. A indústria farmacêutica norte-americana estima que os investimentos na descoberta de novos fármacos giram em torno de 400 milhões de dólares (DIMASI, HANSEN, GRABOWSKI, 2003). No entanto, têm-se mecanismos que podem ajudar na diminuição dos custos, um destes mecanismos é o chamado virtual screening ou triagem virtual, no qual, através de programas, pode-se prever possíveis atividades biológicas, características farmacocinéticas e toxicológicas de determinada substância (KARTISASMATI et al. 2014). Isto, diminui os custos, como por exemplo, os da síntese de substâncias que possuem pouca atividade ou são extremamente tóxicas, uma vez que é possível fazer uma triagem das moléculas mais promissoras, aumentam-se as chances de se obter sucesso, além disso, esse planejamento racional de fármacos, também, diminui o número de animais que seriam utilizados primordialmente, ajudando na diminuição do uso indiscriminado de animais (DIMASI, HANSEN, GRABOWSKI, 2003).

O estudo das características toxicológicas é extremamente importante, já que a segurança de um fármaco é indispensável, devendo, estas, serem rigorosamente avaliadas (DIMASI, HANSEN, GRABOWSKI, 2003). Algumas substâncias possuem atividade biológica elevada, porém a sua toxicidade as tornam inapropriadas para a terapia farmacológica (LIMA et al. 2004). Outras características importantes são as farmacocinéticas que apenas são estudadas a partir dos ensaios clínicos de Fase 1, dando margens para que algumas substâncias venham a serem excluídas apenas nessa fase, deixando gastos que não terão retorno. Para otimizar as buscas por um novo fármaco e poupar recursos têm-se programas como o PreADMET que é um

aplicativo baseado na web para a predição de dados farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), através de cálculos e comparação com drogas semelhantes, sendo uma ferramenta excelente para uma rápida previsão das características de ADME. O PreADMET também prediz de forma semelhante dados toxicológicos (ADME/Tox; PreADMET, 2016). Kovačević e colaboradores (2014) pesquisando as propriedades farmacocinéticas *in silico* da 1,2-O-Isopropylidene Aldohexose e seus derivados concluíram que o PreADMET pode ser utilizados com sucesso para predição dessas propriedades. A fim de avaliar se os derivados de Quercetina propostos teriam uma maior absorção pelo intestino delgado humano outro estudo também utilizou este programa como método de triagem das moléculas (KARTASASMITA, HEROWATI E GUSDINAR, 2010). Kartasasmita e colaboradores (2014) também demonstraram que tal programa é útil para a predição de moléculas menos tóxicas ao avaliarem compostos derivados do Ácido asiático.

A atividade biológica de um composto químico depende da interação deste com o alvo farmacológico. Os programas como o *Prediction of Activity Spectra for Substances* (PASS) podem prever uma possível atividade através da comparação dos compostos químicos estudados com o seu possível receptor, em outras palavras a similaridade química dos compostos é relacionada com receptores de alvos terapêuticos (PASS, 2016). O PASS nada mais é do que um programa online que prevê, por meio de cálculos, centenas de atividades biológicas de forma virtual e simultaneamente. Caldas e colaboradores (2016) utilizaram o PASS *online* e obtendo o resultado positivo para atividade antimicrobiana fizeram uma avaliação *in vitro*, utilizando várias cepas de *Cladosporium*, e concluíram que este monoterpene apresenta uma promissora atividade antimicrobiana, em especial antifúngica contra espécies de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*. A predição de atividade biológica é, portanto, importante, pois acelera o processo de busca por novas terapias, já que, pode direcionar o estudo para aquelas atividades biológicas com mais possibilidade de sucesso. Aliado, também, na busca por novos fármacos está o chamado *molecular Docking* ou ancoragem molecular que simula a interação das moléculas estudadas a um alvo, ou seja, simula a interação proteína-ligante. Este ensaio *in silico* pode ser realizado quando a estrutura alvo é conhecida e pode prever o modo que o composto químico se liga ao sítio ativo (VENKATESAN e DUBEY, 2012).

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade e a atividade *in silico* de novos análogos do Lapachol em enzima de *Leishmania amazonensis*.

3.3. Objetivos específicos

- ✓ Realizar um estudo de Modelagem Molecular, tendo como molécula de partida o Lapachol;
- ✓ Desenvolver a triagem virtual com todos os análogos do Lapachol e compará-los;
- ✓ Realizar o isolamento do Lapachol;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS

- NaHCO₃ (Sigma-Aldrich)
- HCl (Isofar®)
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) para coluna cromatográfica (Merck)
- Hexano (Isofar®)
- Diclorometano (Isofar®);
- Clorofórmio- D₄ deuterado (Merck®);
- Água deionizada (filtrada em sistema Milli-Qplus);
- Fitas de pH (Kasvi)
- Papel filtro MN 618
- Algodão
- Placa industrial de cromatografia em camada delgada- sílica gel 60 (MACHEREY-NAGEL)

4.1.2. MATERIAIS PLÁSTICOS, DE METAL E DE VIDRO

- Cuba cromatográfica;
- Espátulas de metal;
- Espalhador;
- Estantes plásticas;
- Frascos Eppendorf (Sigma Chemical Company);
- Suporte de ferro.
- Vasilhame de plástico 20L
- Espátula de plástico

- Dessecador de vidro
- Coluna cromatográfica
- Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
- Pipetas de Pasteur de vidro;
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL (Vidrolabor);
- Provetas 15, 25, 50, 100, 500 e 1000 mL (Vidrolex);
- Bastão de vidro;
- Becker de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL (Satelit);

4.1.3. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica - Bioprecisa, modelo FA2104 N Eletronic Balance;
- Sistema de filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm- TPP-Switzerland.
- Computador Notebook Dell Inspiron 14, série 5000, processador Intel Core i5 com 8GB de memória.

4.1.5. PROGRAMAS UTILIZADOS NAS PREDIÇÕES

- PreADMET versão 2.0, COPYRIGHT © 2005.
- PASS online (Prediction of activity spectra for substances; Previsão de espectros de atividade para substâncias), Way2Drug.com © 2011 Version 2.0 - 2016.
- MVD (Molegro Virtual Docker; Molegro Ancoragem virtual) versão 5.5, CLC bio® 2015.
- Sistema operacional Windows 2010
- ChemStech versão 11.02, 2008.
-

4.2. Metodologia

4.2.1. SELEÇÃO DAS MOLÉCULAS A SEREM INCLUÍDAS NESTE ESTUDO

Na modelagem molecular levou-se em consideração os seguintes referências teóricas para serem desenhadas:

a)- Hidroxilação: (TARANTO et al. 2012).

b)- Halogenação: (AUFFIRGER et al. 2004).

c)- Mudança de posições *para* e *orto*: (VECHIA, GNOATTO, GOSMANN, 2009;

GUIMARÃES et al. 2013)

d)- Alcanos: (VIANNA et al. 2011)

e)- Ácido carboxílico: (FERREIRA et al. 2010)

As estruturas das substâncias planejadas foram desenhadas no programa ChemStech versão 11.02 de 2008 no sistema operacional Windows 2010 e salvas no formato MOL. Posteriormente, usou-se o programa Avogadro para a conversão deste formato para MOL.2, já que, o programa para Docagem molecular exige o formato MOL.2.

4.2.2. ESTUDOS DE PREDIÇÃO DE ATIVIDADES

Para selecionar a(s) molécula(s) para síntese considerou-se os aspectos farmacocinéticos, toxicológicos e docking. Desta forma, utilizou-se os programas abaixo:

4.2.2.1. Predição da Absorção, Distribuição, metabolismo e toxicidade (ADME/Tox)

Para o cálculo dos descritores molecular, o ADME/Tox se fundamentou em propriedades físico-químicas, tais como a lipofilicidade (log P), o peso molecular, a área de superfície polar, e solubilidade em água.

Em geral, todo o cálculo é realizado por comparação com substância semelhante, seguindo a regra de Lipinski ou "regra dos cinco" e de líder-similar, onde estabelece que uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: log P maior ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. (lipinski, 2004).

Nos estudos farmacocinéticos avalia-se a absorção em nível do intestino delgado (Human intestinal absorption = HIA) e intestino grosso (Caco-2 cell permeability). Como o principal local de absorção dos fármacos é o intestino delgado, a taxa dessa absorção foi utilizada com referência principal para a classificação da absorção oral dos análogos do Lapachol: HIA

0-20% baixa absorção

20-70%: moderada absorção

>70%: elevada absorção (YEE, 1997).

Ainda se avaliou a permeabilidade dos análogos do Lapachol em células do intestino grosso (Caco-2), sendo classificada esta permeabilidade como: baixa < 4%; moderada entre 2-70% e elevada > 70% (YAZDANIN et al. 1998).

Após a absorção, a substância pode se ligar a proteína plasmática e ser distribuída pelos órgãos e tecidos. No caso do SNC, a substância precisa ter lipossolubilidade suficiente para atravessar a barreira hematoencefálica. Então, calculou-se a porcentagem da fração ligada a proteína plasmática e relacionou esta informação a probabilidade de ocorrer interação farmacocinética (competição pela ligação a proteína plasmática com outro fármaco que liga-se fortemente a albumina; Quadro 3).

Quadro 3: Classificação da ligação do análogo do Lapachol a proteína plasmática e probabilidade de interação medicamentosa.

% ligado a proteína plasmática	Classificação	Interação medicamentosa
> 90	Forte	Alta probabilidade
< 90	Moderada a fraca	Menor probabilidade

Fonte: Adaptado de YEE, 1997.

Muitas patologias acometem o SNC, tornando-se essencial que o fármaco seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), dessa forma, pode ligar-se aos receptores e produzir a resposta. Neste estudo avaliou-se esta distribuição pelo método *in vivo* sangue- penetração da barreira do cérebro (Concentração cerebral/Concentração sanguínea). Para a interpretação dos resultados obtidos utilizou-se os seguintes critérios (AJAY, 1999):

>2,0: atravessa livremente a BHE

2,0-0,1: atravessa de forma moderada a BHE

<0,1: atravessa de forma reduzida a BHE

Em relação a avaliação do metabolismo considerou-se os seguintes critérios:

- Inibição das seguintes isoformas de CYP: CYP_2C19, CYP_2C9, CYP_2D6, CYP_3A4.

- Indução das seguintes isoformas de CYP: CYP_2C19, CYP_2C9, CYP_2D6, CYP_3A4.

- Cyp envolvida no metabolismo da substância isoformas de CYP: CYP_2D6, CYP_3A4.

Para a interpretação destes resultados considerou-se os seguintes critérios:

a)- Substância que inibi 2 ou mais CYP, em especial CYP3A4 e CYP2C9, pode interferir no metabolismo de um grande número, pode contribuir para elevação de sua toxicidade

b)- Substancia que inibi apenas 1 CYP: pode ocorrer redução do número de fármacos que possuem interação farmacocinética com esta.

c)- Não inibidora e não indutora de CYP: substância ideal, pois não interfere no metabolismo de outros fármacos.

Além da avaliação dos aspectos farmacocinéticos, avaliou-se os aspectos toxicológicos (mutagenicidade e carinogenicidade). Na avaliação da mutagenicidade utilizou-se o Teste de Ames, sendo usando várias estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 e TA1535) com mutações nos genes envolvidos na síntese de histidina, a fim de que eles requeiram histidina para o crescimento. A variável a ser testado é a capacidade do agente mutagénico para provocar a reversão para o crescimento em meio isento de histidina (AMES, DURSTON, YAMASAKI, 1973). As características genéticas das bactérias utilizadas estão representadas no Quadro 4.

Para interpretação dos resultados do teste Ames considerou: positivo quando houve reversão da mutação em 1 ou mais bactéria; negativo quando não foi observada

reversão da mutação nas bactérias. Quando houve falso +, isto é, não houve reversão da mutação em nenhum clone da bactéria e mesmo assim o programa classificou como mutagênico, este resultado não foi considerado.

Quadro 4: Características genéticas de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste de Ames.

	TA1535	TA98	TA100
Mutação his	hisG46	hisD3052	hisG46
Tipo de mutação	SPB	DQL	SPB
Alvo da mutação	GC	GC	GC
TER	20-35	25-75	75-225
Reparo	uvr β	Uvr β	Uvr β
Mutação para Biotina	bio ⁻	bio ⁻	bio ⁻
Plasmídio	-	PKM101	PKM101

Legenda: his – mutação responsável pela síntese da histidina; SPB – substituição de pares de base; DQL – Deslocamento do quadro de leitura; bio⁻ - mutação para biotina negativo; TRE – taxa de reversão espontânea (número de colônias; uvr β – deleção do gene uvr.

Fonte: Adaptado de MORTELSMANS e ZEIGER 2000.

Teoricamente, uma substância mutagênica pode ser carcinogênica, então realizou-se a predição do potencial carcinogênico dos análogos do Lapachol em roedores (*Rodent Carcinogenicity*). Este estudo prediz a carcinogenicidade a partir dos dados de *National Toxicology Program* (NTP) e FDA (*Food and Drug Administration*), que são os resultados dos testes in vivo de carcinogenicidade de ratos e camundongos por 2 anos. Os resultados são expressos em + (carcinogênico) e –

(não carcinogênico). Os resultados da mutagenicidade e carcinogenicidade foram relacionados e inferidos os possíveis mecanismos envolvidos:

- Teste de Ames + e Carcinogênese +: provavelmente a carcinogênese está relacionada aos danos ao DNA (MARON E AMES, 1983).

- Teste de Ames – e Carcinogênese +: outros mecanismos podem estar envolvidos na carcinogenicidade, como por exemplos: os mecanismos envolvidos citotoxicidade com regeneração acompanhada de aumento na síntese de DNA, imunossupressores e promotores de expressão de oncogênese (AMES e GOLD, 1991).

4.2.3. PREDIÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A atividade biológica dos análogos do Lapachol foi avaliada por similaridade com mais de 250.000 substâncias biologicamente ativas, incluindo fármacos e compostos tóxicos. Como critério de avaliação adotou-se o Pa (Probabilidade de acontecer) de 0.7, ou seja, 70% (PreADMET, 2016).

4.2.3.1. Docagem molecular (*Docking* molecular)

4.2.3.1.1. Critérios utilizados para a seleção do alvo farmacológico

- Proteína presente no mínimo no Gênero Leishmania (FAIRLAMB e CERANI, 1992)
- Estar cristalografada (MOLFETTA et al. 2009)
- Seletividade para o parasito (MÜLLER et al. 2003)

- Estar envolvido na prevenção do estresse oxidativo do parasito (FAIRLAMB, 2001)

Critérios relacionados ao programa: Busca em base de dados confiável (Protein Data Bank= PDB- Banco de dados de Proteínas); proteína com maior qualidade de resolução.

4.2.3.1.2. Docagem molecular

A Seleção e a validação de um protocolo de Docagem molecular (critério de seleção RMSD foi de valor menor que 2,0Å). Para validar o protocolo de docking, usamos as coordenadas cristalográficas da TR disponíveis no PDB, através do código selecionado 2JK6 de resolução 2.95 Å, ou seja, o sitio de ligação do FAD. O protocolo escolhido para função score foi MolDock score [GRID] e algoritmo de busca MolDock Optimizer a partir do raio da esfera de docking de 10 Å e coordenadas (x= 26,29, y= 52,29 e z= -3,83) Å, no dímero B. Esse protocolo revelou melhores valores de RMSD. Depois que um protocolo de docking é escolhido, seleciona-se um banco de dados de com os análogos. Os ligantes em mol.2 file (tipo de arquivo) para iniciam-se as simulações de docking para cada ligante presente no banco de dados selecionado. Durante as simulações, diversas orientações ou poses podem ser obtidas para cada ligante. Assim, selecionamos os menores scores obtidos, ou seja, menor energia livre (Formula da energia na equação 1). O critério de seleção escolhido foi Moldock Score. A função escore utilizada pelo MOLDOCK melhora a precisão de funções escores com as ligações de hidrogênio e novos sistemas de carga. Avaliou-se também as interações dos ligantes e dos resíduos de aminoácidos da pelo MVD. Foi considerado a distância de 1,5 a 2,6Å boas (BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2014). O MVD foi utilizado, pois ele possui várias vantagens como a identificação automaticamente de cavidades ou sites ativos, usando seu algoritmo de detecção de cavidade o GRID (KUSUMANINGRUM et al. 2014).

$$(1) \quad \Delta G^o = - RT \ln(K_{eq})$$

Equação 1: Formula da energia livre.

Legenda: ΔG^o = Padrão Livre mudança de energia; R = constante de gás Universal; K_{eq} = Equilíbrio constante; AT = temperatura.

Quanto maior for o ΔG menos estável é tal conformação da molécula, ou seja, será exigido mais energia para estabiliza-la, com isso a ligação no sitio se torna mais difícil ou menos favorável, e quanto menor for à energia mais estável e espontânea é esta conformação. Por isso, seleciona-se a molécula com menor energia livre.

4.2.4. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DA MOLÉCULA PARA SÍNTESE

Inicialmente avaliou-se os critérios da farmacocinética, sendo considerado ideal:

- Absorção: ampla absorção no intestino delgado
- Ligar de forma moderada a fraca as proteínas plasmáticas, em especial a albumina.
- Não ser inibidor ou indutor do metabolismo de outros fármacos.

Como nenhum análogo do Lapachol cumpriu o critério 3 (não inibiu metabolismo), buscou-se uma substância com menor capacidade inibitória (inibição de somente uma enzima).

Após a avaliação dos aspectos farmacocinéticos, avaliou-se as características toxicológicas, sendo considerada a molécula ideal a que não causa mutação e nem

carcinogênese. Nos estudos de docagem molecular foi considerado aquela molécula que:

- Possui a conformação mais estável, ou seja, que apresentar menor energia.
- Se liga ao sítio catalítico presente no domínio de ligação do co-fator FAD que conta com resíduos como Tr51, Ser14, Gli127, Asp327, Tr335, Lis60, Ile 199, Gli56 e Tr198 (BAIOCCO et al. 2009)
- E que se liga os resíduos catalíticos que é Cis 52 e 57 (BAIOCCO et al. 2009).

4.2.5. SÍNTESE DO LAPACHOL

4.2.5.1. Obtenção do Lapachol

A serragem da madeira do Ipê (1,859 g) foi adicionado a 10 L de uma solução 1% de NaHCO₃. A mistura foi deixada em repouso por 45 min., seguida de filtragem. O pH da solução extrativa foi ajustado para pH 3 com solução de HCl 6M, e a solução vermelha tornou-se amarela, havendo formação de um precipitado amarelo. Após a filtração em papel filtro, o material retido no filtro foi levado ao dessecador para a retirada da umidade (FERREIRA, 1996). Para a obtenção do Lapachol, o resíduo que ficou no papel de filtro foi raspado e acondicionado em frascos. A partir desse material utilizou-se o seguinte método: 5,540g do raspado do papel filtro foi fracionado em coluna cromatográfica (utilizando-se 125g sílica gel MERK 70-230 mm, com altura de 38 cm e largura de 4 cm), utilizando-se diclorometano como fase móvel. As frações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluente o sistema de solventes diclorometano:hexano(8:2). A fração F2 (2,0g) rica em Lapachol foi fracionada novamente, utilizando agora apenas aproximadamente 2g de fração F2. A fração com maior rendimento foi levada para análise. O Lapachol foi

identificado pela análise de seus dados de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 e de Carbono-13, e comparação com a literatura (MOREIRA et al. 2006).

A determinação estrutural do Lapachol da Fr3 foi realizada através do método instrumental de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono 13 (RMN de ^{13}C). Os espectros de RMN de ^1H e de RMN ^{13}C foram obtidos pelo aparelho Varian Unity Plus 300 utilizando solução de clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores dos deslocamentos químicos foram aferidos em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que, em geral, a orientação alfa e beta favorecem as atividades biológicas e citotoxicidade dos análogos do Lapachol (VECHIA, GNOATTO, GOSMANN, 2009), por isso inclui-se neste estudo, além do lapachol (A; Figura 11), a α -lapachona (B; Figura 11) e β -lapachona (C; Figura 11). A presença de OH favorece a formação da ligação de hidrogênio, dessa forma pode contribuir para ligação fármaco–receptor (TARANTO et al. 2012), então acredita-se que as moléculas que possuem maior número de hidroxilas (OH) serão mais ativas que o Lapachol: 2-Hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E; Figura 11); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)naftalen-1(4H)-ona (H; Figura 11); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftalen-1(4H)-ona (I; Figura 11); 3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dihidronaftaleno-1,2,4-triol (J; Figura 11); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M; Figura 11); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N; Figura 11); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O; Figura 11); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P; Figura 11).

Outra alteração estrutural que contribui para atividades biológicas é a adição de halogênio, geralmente esta ligação se dá entre um halogênio e o oxigênio, criando um efeito eletrostático (AUFFIRGER et al. 2004). Dessa forma, inclui-se neste as moléculas: 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona (G; Figura 11); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S; Figura 12); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-dihidronaftaleno-1,2,4-triol (T; Figura 12).

Em um estudo, Ferreira e colaboradores (2010) demonstraram que uma molécula com ácido apresentava boa atividade leishmanicida, então adicionou-se ao estudo as moléculas ácido (3-Hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftalenil) (F; Figura 11); ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il) (Q; Figura 12); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; R; Figura 12).

Apesar da retirada do grupo hidroxila poder causar uma diminuição da atividade biológica, um fato que pode tornar a síntese desses análogos atrativa é a redução na toxicidade (VIANNA et al. 2011). Afim de, sintetizar análogos menos tóxicos decidiu-se incluir a molécula 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L; Figura 11).

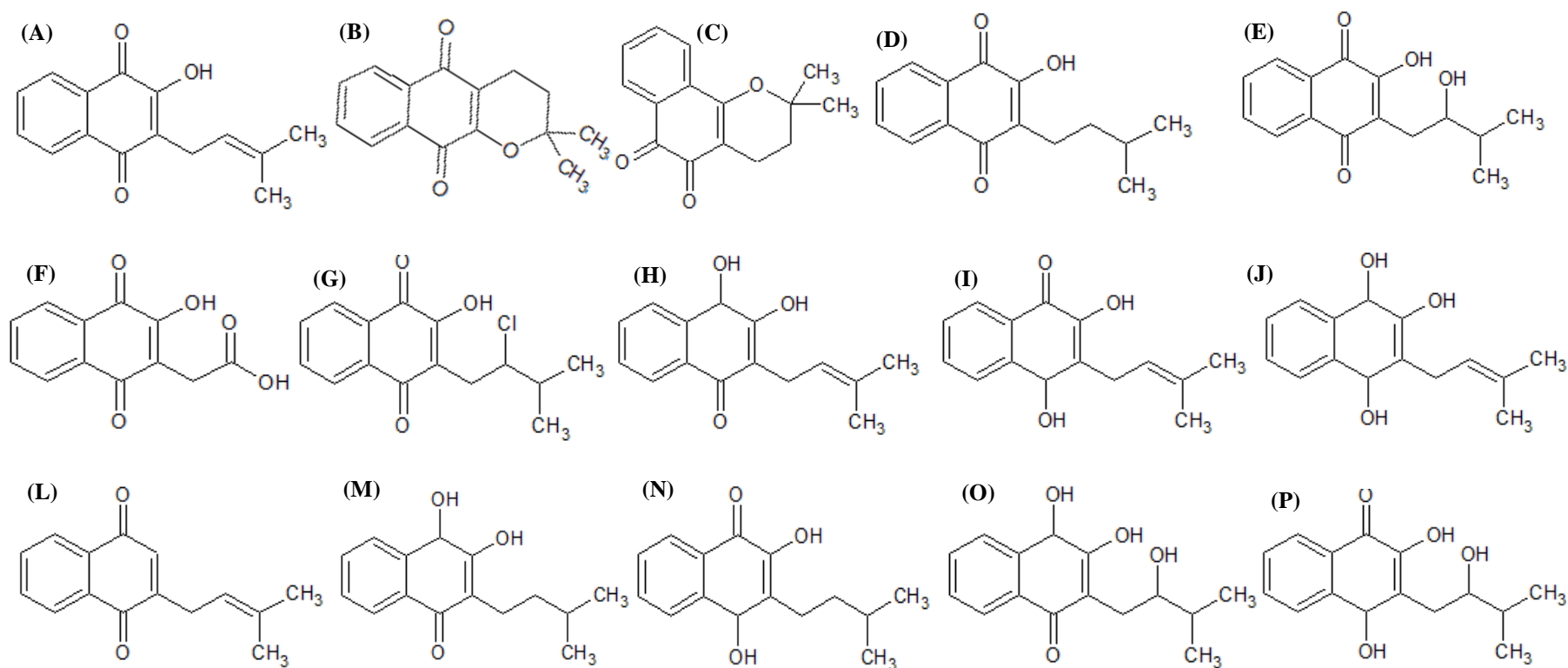


Figura 11: Estrutura química das moléculas utilizadas no estudo de docagem.

Legenda: (A) Lapachol; α -lapachona (B); β -lapachona (C); 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metil-butil)-1,4-naftoquinona (E); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno) (F); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (G); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftalen-1(4H)-one (I); 3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidro-naftaleno-1,2,4-triol (J); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(3H)-ona (O); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P).

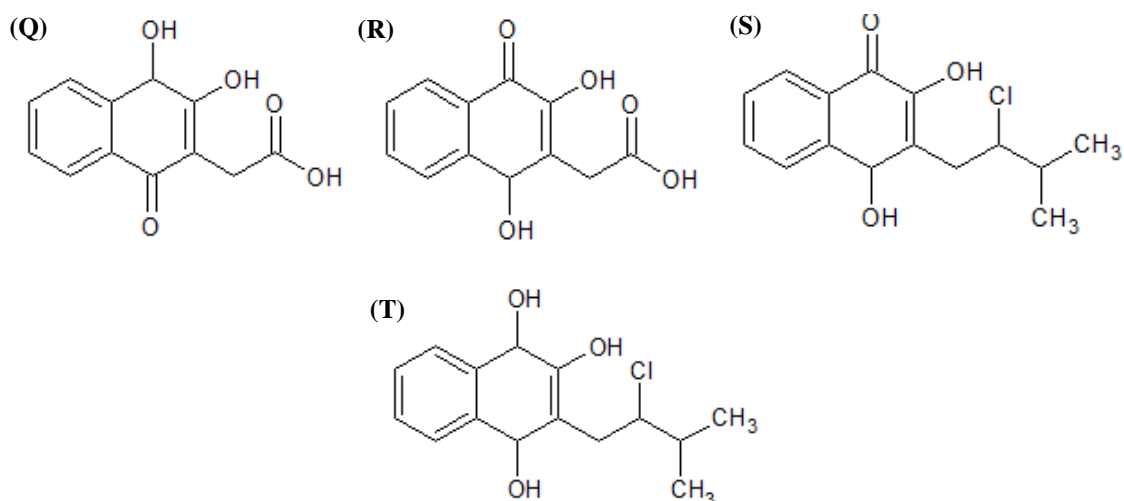


Figura 12: Estrutura química das moléculas utilizadas no estudo de docagem.

Legenda: (Q) ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il); (R) ácido acético (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il); (S) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona; (T) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol.

5.2. Estudos de predição dos aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos

O primeiro parâmetro avaliado foi o aspecto farmacocinético. O Lapachol apresenta as seguintes características farmacocinéticas: alta absorção intestinal (95,50%), baixa absorção pelas células Caco2 (21,35%), alta afinidade pelas proteínas plasmáticas (98,28%), atravessa de forma moderada a barreira hematoencefálica, sofre metabolismo de fase 1 pela CYP3A4, e provavelmente inibe várias CYP (2C9, 2C19 e 3A4; Tabela 3). Todos os análogos são bem absorvidos pelo intestino com absorção entre 79,745% a 99,036%, podendo ser administrados por via oral. As vantagens de administrar fármacos por essa via é há a diminuição do incômodo, já que é menos dolorida para o paciente do que a intramuscular e intravenosa, porém os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são administrados por via intravenosa e intramuscular e, por isso, devem ser utilizados apenas em ambiente hospitalar, o que aumenta o tempo de permanência destes pacientes e assim elevam-se os custos hospitalares (MONZONOTE, 2009).

A infecção do SNC pelos parasitos do gênero *Leishmania* é raro e ocorre em pacientes imunocomprometidos (ALBRECHT et al. 1996), como os pacientes com SIDA (Síndrome da Imuno Deficiência adquirida), por isso, a distribuição de fármacos torna-se importante para o tratamento desses casos. As análises dessa propriedade farmacocinética demonstraram um análogo com baixa distribuição e análogos com moderada ou elevada distribuição para o SNC.

O aumento da distribuição no SNC aparentemente está relacionado com a presença das carbonilas nos carbonos C1 e C4 e da cadeia lateral de alceno ou alcanos, como pode-se visualizar comparando o Lapachol que possui moderada distribuição com os análogos 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-naftalen-1(4H)-ona (H) e 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M) que possuem elevada distribuição. Entretanto, algumas alterações diminuem a distribuição para este sistema como a presença de grupo carboxílico, hidratação e o número de carbonilas, entre outras.

A entrada de grupo carboxílico tornou a distribuição baixa da molécula (3-Hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro-2-naftalenil) ácido acético em comparação com o Lapachol que possui moderada distribuição. A hidratação e a halogenação do alceno parece reduzir a distribuição no SNC, e pode-se visualizar isto comparando-se a moderada distribuição da molécula 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P) com a distribuição elevada da molécula 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N) ou da destruição moderada da molécula 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S) e a elevada distribuição da molécula 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I).

Todas as alterações que possivelmente provocam diminuição da distribuição no SNC parecem ser compensadas ou revertidas pelo número de redução das carbonilas, por exemplo, a molécula ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-dihidronaftalen-2-il) (R) que apresenta ácido carboxílico melhorou a sua distribuição em comparação com a ácido (3-Hidroxi-1,4-dioxo-1,4-dihidro-2-naftalenil) (Q) reduzindo uma das carbonilas e a molécula 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-dihidronaftaleno-1,2,4-triol (T) mesmo com um halogênio chegou a uma distribuição elevada reduzindo todas as suas carbonilas.

Muitas vezes, os fármacos são utilizados de forma associada podendo ocorrer interações medicamentosas, sendo a mais frequente a farmacocinética (MARCOLIN et al. 2004; ALMEIDA, GAMA, AKAMINE, 2007). Em relação à farmacocinética,

alterações no metabolismo (indução ou inibição de CYP) são responsáveis pela maioria das interações. Quando se avalia quimicamente a cimetidina, inibidor de CYP-450, percebe-se que ela possui 4 grupos aceptores de hidrogênio, os quais são passíveis de fazer ligações de hidrogênio com os resíduos protonados da enzima, ela também apresenta 3 grupos doadores de H. Na molécula do Lapachol estão presentes dois grupos de carbonilas que são aceptores de hidrogênio e na cadeia lateral uma dupla ligação que se comporta como um doador de elétrons. Neste estudo observou-se que a redução da carbonila e a hidratação da cadeia lateral diminuiu a inibição das CYPs, como pode-se verificar comparando o Lapachol e a molécula 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M).

Os mecanismos envolvidos na inibição do CYP são: inibição reversível ou competitiva, inibição não-competitiva e inibição irreversível. Entre estas, a inibição reversível é, provavelmente, o mecanismo mais comum resulta da competição pelo sítio ativo da enzima. Por outro lado, agentes que atuam durante a ligação do oxigênio ou em etapas subsequentes levam a inibições não-competitivas ou inibições irreversíveis (HALPERT, 1995). Muitos dos inibidores reversíveis potentes do CYP são substâncias que contêm o nitrogênio, ligam-se ao ferro do grupo prostético heme e/ou também a região lipofílica da proteína no CYP. As substâncias que se ligam simultaneamente a estas duas regiões são inibidores mais potentes. A potência de um inibidor pode ser determinada por seu caráter lipofílico e pela força de ligação entre o par de elétrons do nitrogênio e o ferro (LIN e LU, 1994). Por mais que as moléculas deste estudo não tenham nitrogênio em sua estrutura à maioria delas apresenta uma cadeia lateral mais lipofílica, o que pode estar contribuindo para a inibição das CYPs, como pode ser o caso das moléculas estudadas. Bai e colaboradores (2014) investigando o metabolismo do Lapachol em ratos sugeriram que as principais regiões reativas são a cadeia lateral e as carbonilas do C1 e C4, além do anel aromática quando fala-se de metabolismo de fase II.

No caso específico, o Lapachol pode inibir o metabolismo de diferentes classes de fármacos, e isto pode ocasionar alteração da concentração plasmática deste fármaco e elevação do risco de efeitos tóxicos (SIMONS 2004; CRIADO et al. 2010;). Visando verificar se a orientação orto e para interfere nesta inibição da CYP avaliou-se a α e β - lapachonas. Estas mudanças não interferiram na inibição da CYP, no entanto favoreceram a passagem pela barreira hematoencefálica (Tabela 3).

Outra tentativa para minimizar esta inibição da CYP ocasionada pelo Lapachol foi a adição de OH ou redução da carbonila gerando as moléculas 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); [6] 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)ona (I); 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-dihidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P). Mas estas mudanças estruturais não alteraram totalmente o efeito inibitório sobre a CYP totalmente, porém pode-se verificar uma redução no número de inibição de CYPs quando a dupla ligação da cadeia lateral é hidratada e com redução de uma carbonila (Tabela 3).

A fim de verificar se apenas a retirada da dupla ligação da cadeia lateral tem papel fundamental na inibição das CYPs, essa dupla ligação foi hidrogenada, porém a alteração não demonstrou ter nenhum efeito na diminuição da inibição, como pode-se verificar analisando a molécula 2-hidroxi-3-(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D; Tabela 3). A presença de halogênio nas moléculas 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (G); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-dihidronaftaleno-1,2,4-triol (T) também não resultou em melhorias nesse parâmetro, bem como a presença de carboxila (COOH) na cadeia lateral, como pode-se averiguar avaliando as moléculas ácido (3-Hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftalenil) (F); ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidro-naftalen-2-il) (Q); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidro-naftalen-2-il) (R; Tabela 3). Com base nesses dados, o número de inibição das CYPs parece diminuir com a redução da carbonila, concomitantemente com a hidratação da cadeia lateral quando comparamos o Lapachol e a molécula 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O).

Outra interação medicamentosa do tipo farmacocinética que pode ocorrer entre as naftoquinonas e outros fármacos é a competição pela ligação a proteína plasmática (albumina). De modo semelhante à atovacona (naftoquinona utilizada para o tratamento da malária), muitos análogos do Lapachol ligam-se, provavelmente, fortemente à proteína plasmática (Tabela 3). Quando associado a outro fármaco que também se ligue fortemente à albumina pode ocorrer competição, gerando uma alteração da relação fração livre e fração ligado. Neste caso, não haverá, provavelmente, aumento do metabolismo da fração livre, visto as enzimas hepáticas

estarem inibidas. O aumento da fração livre pode propiciar a elevação em sua distribuição para tecidos e órgãos, talvez, aumento da toxicidade.

Vale ressaltar que sempre existe um equilíbrio entre a % do fármaco ligado à proteína plasmática e a fração livre, este equilíbrio pode ser estabelecido com a quase totalidade do fármaco ligado (99,9 ligado e 0,1 livre), mais não 100% ligado e 0% livre. Logo, acredita-se que o 100% de 2-hidroxi-3-(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D) e de 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L) deve estar relacionado às limitações do programa.

Visando reduzir o risco deste tipo de interação medicamentosa foram realizadas alterações estruturais no Lapachol, sendo obtidas moléculas que se ligam, de forma moderada, a albumina (50 a 89%). Estas moléculas apresentam as seguintes alterações estruturais:

- Adição de grupamento ácido: ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno) (F); ácido (1,3-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il) (Q); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il) (R).
- A presença de hidroxila na cadeia lateral e nos carbonos C1 e C4: 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O); 3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J), 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H), 2,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)naftalen-1(4H)-ona (I).

Dentre as proteínas plasmáticas a Albumina é considerada a principal, essa proteína apresenta grande afinidade com moléculas ácidas (KRAGH-HANSEN, CHUANG, OTAGIRI, 2002), indo de encontro com os resultados obtidos que mostra diminuição da porcentagem de ligação. Porém uma justificativa para tal fato pode estar relacionado com o fato de que a Albumina tem a capacidade para se ligar a muitos produtos farmacêuticos hidrófobos (HE E CARTER, 1992) e em todas as moléculas, mesmo aquelas com grupo ácido (com exceção da ácido (3-Hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftalenil; F), houve a redução de pelo menos uma carbonila e adição de OH e Cl na cadeia lateral. Outra explicação seria a diminuição de ligação em outra proteína plasmática.

Alguns estudos avaliaram o mecanismo envolvido na atividade antitumoral da β -lapachona e menandiona. A β -lapachona não induz fragmentação do DNA mediada pela topoisomerase. A menandiona e a β lapachona induzem quebra do DNA mediada

pela Topoisomerase II. Ambas as quinonas formam adutos com mercaptoetanol, e β -lapachona foi 10 vezes mais reativa que a menandiona. Há uma correlação entre as taxas de o aduto e o efeito sobre a topoisomerase (FRYDMAN et al. 1997).

A atividade tripanocida da β -lapachona foi estudada extensivamente, sendo relacionado este efeito relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio que danificavam o DNA do parasito (DOCAMPO et al. 1979; BOVERIS et al. 1978; CRUZ, DOCAMPO, SOUZA, 1978; FRYDMAN et al. 1997). Do mesmo modo, a atividade antibacteriana e citotoxicidade têm sido associadas à formação de espécies reativas de oxigênio (DOCAMPO et al. 1979; CRUZ, DOCAMPO, BOREVIS, 1978). Estas informações sugerem que talvez o Lapachol e seus análogos possam ser genotóxicos e mutagênicos. Estudos preditivos demonstraram que derivados do Lapachol geravam estresse oxidativo: α -Lapachona, β -lapachona e alil- β -lapachona (TONHOLO et al. 1998; SAÚDE-GUIMARAES e FARIA, 2007; HILLARD et al. 2008). Em virtude disso, foram avaliados os resultados obtidos na predição de mutagenicidade (Tabela 3).

Tabela 3: Propriedades farmacocinéticas do Lapachol e seus análogos.

Substâncias	Absorção % HIA	Caco2	Distribuição %PP	SNC*	Metabolismo CYP
(A) Lapachol	95,50	21,35	98,28	M	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Inibe CYP3A4 Substrato da CYP3A4
(B) α -lapachona	97,94	44,09	89,62	E	Inibe CYP2C9 Inibe CYP3A4 Substrato da CYP3A4
(C) β -lapachona	97,94	39,58	98,28	E	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Inibe CYP3A4 Substrato da CYP3A4
(D) 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	95,29	21,41	100%	M	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19
(E) 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	92,91	20,20	99,36	M	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Inibe CYP3A4 Substrato da CYP3A4
(F) Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)	89,82	0,39	79,65	B	Inibe CYP2C9 Substrato fraco da CYP3A4
(G) 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona	95,68	20,47	98,95	M	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Inibe CYP3A4 Substrato da CYP3A4
(H) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	92,07	21,07	85,52	E	Inibe CYP2C9 Substrato fraco da CYP3A4
	92,05	21,07	87,95%	E	Inibe CYP2C9

(I) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona					Substrato fraco da CYP3A4
(J) 3-(30metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	87,86	20,93	80,61%	E	Inibe CYP2C9 Substrato da CYP3A4
(L) 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona		29,27	100%	E	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Substrato da CYP3A4
(M) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	91,71	21,10	95,66%	E	Inibe CYP2C9
(N) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	91,68	21,10	97,54%	E	Inibe CYP2C9
(O) 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	86,46	20,19	87,84%	M	Inibe CYP2C9
(P) 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	86,43	20,19	86,43%	M	Inibe CYP2C9
(Q) Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	79,75	0,39	66,85%	M	Inibe CYP2C9
(R) Ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	79,74	0,38	65,64%	M	Inibe CYP2C9
(S) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona	88,80	18,67	63,14%	M	Inibe CYP2C9 Inibe CYP2C19 Substrato da CYP3A4
(T) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftalen-1,2,4-triol	89,70	20,02	81,88	E	Inibe CYP2C9 Substrato da CYP3A4

Legenda: Absorção intestinal humana HIA; Absorção avaliada em células CACO; SNC* – E: atravessa a barreira hematoencefálica de forma elevada >2; M: moderadamente 0,3-2; B: não atravessa de forma significativa a barreira hematoencefálica < 0,3

O teste Ames utiliza várias estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* com mutações nos genes envolvidos na síntese de histidina. Estas estirpes são mutantes auxotróficos, isto é, que necessitam de histidina para o crescimento. O método testa a capacidade de uma substância reverter a mutação, de modo que as células podem crescer em meio isento de histidina. As cepas utilizadas detectam qualquer desvio de enquadramento (estirpes TA-1537 e TA-1538) mutações (estirpe TA-1531). Alguns compostos revertem apenas uma ou duas estirpes (BRUCE e AMES, 1973), como por exemplos o próprio Lapachol e os análogos 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (G); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L); 3,4-diidroxi-2(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P) e ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; Q). Com isso, observa-se que a adição de ácido carboxílico, a permanência da carbonila do C1 e a dupla ligação da cadeia lateral (Quadro 5).

A α -lapachona e β -lapachona, nos estudos preditivos, reverteram a mutação em 3 linhagens de *S. typhimurium*, enquanto que 3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)ona (N); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O), 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (T) não reverteram as mutações. Estas últimas moléculas possuem mudanças estruturais tais como presença de OH no C4 e OH ou Cl na cadeia lateral, o que pareceu desfavorecer a atividade mutagênica, segundo alguns autores a mutagenicidade está relacionada, entre outros fatores, com a presença de heterocíclicos e grupos mais eletronegativos (KELLER-SEITZ et al. 2004; APTULA e ROBERTS, 2006), justificando a maior mutagenicidade da α -lapachona e β -lapachona (Quadro 5).

Os compostos 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (S); 3,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (T) não reverteram as mutações, porém foram

classificados como mutagênicos (Quadro 5). Esta divergência de resultado pode estar relacionada a limitações analíticas do programa utilizado neste estudo (PreADMET).

O teste de mutagênese é considerado um ensaio de triagem para prever o potencial carcinogênico das substâncias; mas eles apenas avaliam as substâncias que produzem câncer por mecanismos genotóxicos (MARON e AMES, 1983). Existe substância que produz câncer por mecanismo não genotóxico, sendo os mecanismos envolvidos citotoxicidade com regeneração acompanhada de aumento na síntese de DNA, imunossupressores e promotores de expressão de oncogênese (AMES e GOLD, 1991). Estas substâncias apresentam os testes de mutagênese negativos.

No presente estudo, observou-se que a maioria das substâncias carcinogênicas, provavelmente, se deve a eventos genotóxicos (Quadro 5). Este fato pode estar relacionado ao estresse oxidativo ocasionado pelas moléculas α -lapachona; β -lapachona; 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno 1,4-diona (S); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); 2,4-diidroxi-3(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P); ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; Q); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; R). As substâncias envolvidas no estresse oxidativo aumentam as ROS que danificam o DNA, gerando assim a genotoxicidade (KUMAGAI et al. 1997).

Os compostos 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J) e 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P) não revertem a mutação das bactérias, porém foram carcinogênicos. Estes resultados sugerem que estas substâncias podem produzir câncer por mecanismo não genotóxico, sendo os mecanismos envolvidos citotoxicidade com regeneração acompanhada de aumento na síntese de DNA, imunossupressores ou como promotores de expressão de oncogênese. A 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I) possui redução da carbonila da posição 4, enquanto que 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P) possui além da redução dessa carbonila tem a adição de OH na cadeia lateral.

Kirkland e Marzin (2003) avaliaram a genotoxicidade de uma naftoquinona, a 2-Hydroxy-1,4-naftoquinona (HNQ), segundo os autores esta substancia foi não-mutagênico nos testes bacterianos (teste de Ames) ou ensaios de mamíferos (V79 HPRT), porém houve evidência de hematotoxicidade em hamster, com aumento da incidência de microtubulo na medula às 72 h em concentração de 110 e 250 mg/kg. Em 2004 os mesmos autores confirmaram que a HNQ não possui característica de agente genotóxico (MARZIN e KIRKLAND, 2004). Esses estudos evidenciam que algumas naftoquinonas podem produzir efeito citotóxico por mecanismos não genotóxicos, porém não se sabe ao certo o mecanismo dessa citotoxicidade. Apesar das características toxicológicas serem semelhantes a HNQ e as moléculas 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J) e 2,4-diidroxi-3(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P) não possuem características estruturais extremamente semelhantes, pois a HNQ não possui cadeia lateral como pode-se ver na Figura 13. Por tanto, mais estudos devem ser realizados, afim de elucidar os mecanismos citotóxicos de algumas naftoquinonas.

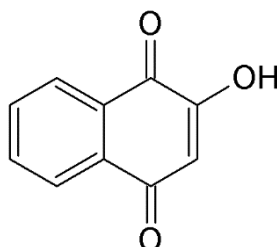


Figura 13: Estrutura da 2-Hydroxy-1,4-naftoquinona (HNQ).

Quadro 5: Predição da mutagenicidade e carcinogenicidade do Lapachol e análogos.

Compostos	Mutagenicidade: teste de Ames				Resultados	Carcinogenicidade	
	TA100-10RLI	TA100-NA	TA1535-10RLI	TA1535_NA		Camundongo	Rato
(A) Lapachol	+	+	-	-	Mut	+	-
(B) α -lapachona	+	+	+	-	Mut	+	-
(C) β -lapachona	+	+	+	-	Mut	+	+
(D) 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	+	+	-	-	Mut	+	-
(E) 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	+	-	-	-	Mut	+	-
(F) Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)	+	-	-	+	Mut	-	+
(G) 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	+	-	-	-	Mut	+	-
(H) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	+	+	-	-	Mut	+	-
(I) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	-	+	-	-	Mut	+	+
(j) 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	-	-	-	-	Mut	+	-
(L) 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona	+	+	-	-	Mut	+	-
(M) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	+	-	-	-	Mut	-	-
(N) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	-	Mut	-	-
(O) 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	-	Mut	-	-
(P) 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	-	Mut	-	+
(Q) Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il) ácido acético	+	-	-	-	Mut	-	+
(R) Ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il) ácido acético	-	-	-	+	Mut	-	+
(S) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	-	Mut	-	-
(T) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	-	-	-	-	Mut	-	-

Legenda: Mut (Mutagênico), -:Negativo, +: Positivo, Bactéria com TA1535 (LI e NA) e TA100 (10RLI e NA): mutação no aminoácido His G-46 no caso TA100 possui um plasmídeo pKM101

5.3. Predição de atividades biológicas

As expectativas iniciais na predição de atividade biológicas eram que alterações na estrutura do Lapachol como, por exemplo, a adição de halogênio e a conversão para forma orto fosse contribuir para atividade leishmanicida. No entanto, todas as alterações realizadas retiraram esta atividade do Lapachol (Quadro 6). Quando se compara os resultados aos dados de estudos de avaliação de atividade leishmanicida fica clara a limitação do PreADMET para triar moléculas com potencial na Leishmanicida. Fatos que sustentam essa ideia são os estudos com β -lapachona que demonstram que esse análogo do Lapachol, em conversão orto, possui alta atividade leishmanicida (LIMA et al. 2004), o que contraria o resultado do PreADMET. Em síntese, quando o objetivo for avaliar as possíveis moléculas com atividade sobre a Leishmania recomenda-se utilizar outro programa ou realizar estudos de docking, pois no caso deste último há a avaliação da interação da molécula com o alvo, ao contrário do PreADMET que relaciona a estrutura química da molécula com substâncias biologicamente ativas já conhecidas do seu banco de dados (MOLFETTA et al. 2009; PREADMET, 2016).

A atividade antitumoral do Lapachol e seus análogos têm sido extensivamente relatada na literatura (LI, WANG e PARDEE, 1995; FRYDMAN et al. 1997; OLIVEIRA et al. 2002). No entanto, sabe-se que a β -lapachona, negativa para esta atividade neste estudo (Quadro 6), é a mais promissora como antitumoral. A atividade sobre a topoisomerase, indução de apoptose e dano em consequência do estresse oxidativo tem sido relacionado à atividade antitumoral da β -lapachona (FRYDMAN et al. 1997; KATOH et al. 2014), demonstrando, mais uma vez, a fragilidade do programa na predição de atividades biológicas.

Quadro 6: Predição de atividade biológicas do Lapachol e seus análogos.

Substâncias	Leishmanicida	Antitumoral	Tônico cardiovascular	Antiseborréico	Outros
(A) Lapachol	+	+	+	+	Coagulante; Hemostático
(B) α -lapachona	-	-	-	+	-
(C) β -lapachona	-	-	-	+	Anti-isquêmico cerebral
(D) 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	-	-	-	+	transtorno fóbico
(E) 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	-	-	-	+	-
(F) Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)	-	-	-	+	transtorno fóbico
(G) 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	-	-	-	+	-
(H) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	-	+	-	-	Carminativo
(I) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	-	+	+	+	Tônico respiratório; Carminativo
(J) 3-(30metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	-	+	+	-	Carminativo
(L) 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona	-	+	+	-	Coagulante
(M) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	+	-	+	-
(N) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	+	transtorno fóbico
(O) 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	+	-	+	-
(P) 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	+	-
(Q) Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	-	+	-	+	-
(R) Ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	-	-	-	+	Alopecia
(S) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona	-	-	-	+	-
(T) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftalen-1,2,4-triol	-	-	-	+	-

As seguintes alterações estruturais realizadas no Lapachol para as moléculas 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno) (F); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (G); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (T) contribuíram negativamente para a atividade antitumoral. Krishnam e Bastow (2000) associam a inibição da Topoisomerase I e II a piranonaftoquinonas, demonstrando a importância do grupo pirano e de sua posição para a inibição dessas proteínas, por consequência os análogos estudados não o possuem, o que comprometer a ligação destes com a Topoisomerase I ou II.

Os seguintes análogos do Lapachol, nos estudos preditivos, mostraram atividade antitumoral: 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 3-(3-metilbut-2-enil)1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M) e ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; Q). As características que parecem favorecer essa atividade é a presença da carbonila no C4 e a da dupla na cadeia lateral. A atividade tônica vascular não tem sido relacionada na literatura com as naftoquinonas, no PreADMET as moléculas 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L) e o Lapachol foram relacionadas para tal atividade (Quadro 6).

A atividade tônica cardiovascular pode estar relacionada com a bomba de Na⁺/K⁺-ATPase que participam do processo de hiperpolarização de células excitáveis, como por exemplo do músculo cardíaco (HAUPTMAN, 1999). De acordo com Laursen e colaboradores (2014) OH e grupo lipofílico na posição beta são importantes nas interações de esteroides cardiotônicos como a digoxina com este alvo.

A principal atividade biológica atribuída as naftoquinonas foi antiseborréica, e as seguintes moléculas mostraram-se ativas: Lapachol; α -lapachona; β -lapachona; 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-

naftoquinona (E); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona (G); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P); ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; Q); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; R); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (T; Quadro 7). Essa atividade está associada a agentes antiproliferativos, antiinflamatórios, corticosteroides e antifúngicos, podendo esse caso ser associado a alterações hormonais ou ao sistema imunitário, pois há grande incidência em pacientes com HIV (MICHELIM et al. 2004), porém alguns agentes antiseborréicos não possuem mecanismos de ação definidos (GUPTA e BLUHM, 2004; NALDI e REBORA, 2009; SCHWARTZ, 2006). Sabe-se que o Lapachol possui grande atividade fungicida (ANTUNES et al. 2006), possivelmente os seus análogos também, com isso talvez essa atividade esteja atribuída a essa característica.

A vitamina K é lipossolúvel e pode ser encontrada em três formas: filoquinona (K1, predominante), diidrofiloquinona (dK), menaquinona (K2) e menadiona (K3). A vitamina K atua como co-fator para a carboxilação de resíduos do ácido glutâmico formando o ácido gama carboxiglutâmico, aminoácido presente nos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X; DORES, PAIVA, CAMPANA, 2001; ELDER et al. 2006, KLACK e CARVALHO, 2006). Quando se compara essas quinonas- vitamina K, Lapachol e 2-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona observa-se que todas possuem duas carbonilas na posição para e uma cadeia lateral de alcenos.

Outra atividade atribuídas a estas naftoquinona [2-hidroxi-3-(3-metilbutil)1,4-naftoquinona (D); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N)] é para o tratamento do Transtorno fóbico. Dessas o ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F) possui uma baixa distribuição para o SNC e isso dificultaria a chegada ao local de ação, já a 2-hidroxi-3-(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D) e a 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N) possuem moderada e alta distribuição no SNC, respectivamente. No tratamento do Transtorno fóbico são utilizados, frequentemente, os inibidores da monoaminoxidase (IMAO;

Fenelzina, Tranilcipromina, Selegilina, etc.). Os IMAOs aumentam a concentração de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e dopamina na fenda sináptica, já que essa enzima, esta, envolvida no metabolismo desses neurotransmissores, com isso se tem o efeito antidepressivo (LIVINGSTON e LIVINGSTON, 1996). Cerqueira e colaboradores (2011) avaliaram o potencial de umas naftoquinonas (Menadione ou Vitamina K3 da 2,3,6-trimethyl-1,4-naftoquinona ou TMN e da 1,4-naftoquinona, que são estruturalmente semelhantes ao Lapachol, e propuseram que estas naftoquinonas inibiam a MAO. Os análogos estudados que apresentaram a atividade de tratamento de transtorno fóbico possuem, assim como, a menadione, uma cadeia lateral de alcanos em um sistema de ressonância, com exceção do ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F).

Substâncias carminativas possuem atividade anti-gases, geralmente atuam diminuindo a tensão superficial dos fluidos digestivos, rompendo ou dificultando a formação de bolhas gasosas que retêm os gases e que provocam flatulência e dores abdominais. O estudo preditivo apresentou as moléculas 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H); 2,4-diidroxi-3(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I); 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J) como carminativas. Sabe-se que moléculas que diminuem a tensão superficial geralmente possuem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998), o que pode justificar essa atividade para as moléculas citadas.

Visando avaliar se estes análogos do lapachol possuem potencial leishmanicida realizou-se o docking. A primeira etapa deste estudo foi a seleção do alvo, tendo encontrada a limitação de poucas proteínas de Leishmania ter sido cristalografada até o presente. Os principais alvos cristalografados encontrados para o gênero foram: *Arginase*, *Dihydroorotate dehydrogenase*, *Tryparedoxin peroxidase*, *UDP-glucose pyrophosphorylase*, *Trypanothione reductase*, *Malate dehydrogenase*, *Pyruvate kinase*, *Topoisomerase I* e *Glucose-6-phosphate isomerase*. Destes, há indícios que as naftoquinonas inibam a Topoisomerase e desencadeiam o estresse oxidativo (JOCKERS-SCHERUBL; SCHIRMER e KRAUTH-SIEGEL, 1989)

A Topoisomerase I apesar de aparentar ser um bom alvo para design de novos fármacos leishmanicida tem como problemática: a inespecificidade, uma vez que essa enzima também é encontrada em células humanas (MÜLLER et al. 2003). Em

contrapartida, a Tripanotiona reductase, maior responsável pela regulação do estresse oxidativo em parasitos da Tripanossomídeos não está presente em células humanas (FAIRLAMB e CERANI, 1992). Tripanotiona reductase é um homodímero (Cadeias A e B) com três domínios estruturais ou seja, domínio de ligação FAD, NADPH e tripanotiona. A Tripanotiona reductase (TR) é uma flavoproteína dissulfeto reductase que FAD-dependente de NADPH encontrada somente em parasitas da família Trypanosoma, sua função é controlar a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nesses parasitas, pois estes são desprovidos glutathione reductase (GR) que é encontrada nos seres humanos (FAIRLAMB e CERANI, 1992; MÜLLER et al. 2003). A TR é importante na redução da tripanotiona dissulfeto [T(S)₂], forma oxidada, em tripanotina ditiol [T(SH)₂], forma reduzida, pois catalisa esse processo, conseqüentemente desencadeia uma cascata de eventos que ao final neutralizam ROS (FAIRLAMB e CERANI, 1992).

Conforme dito anteriormente, a tripanotiona reductase liga-se ao FAD, sendo que o grupo catalítico da enzima pode realizar duas ligações importantes com o FAD: ligação de hidrogênio ligação hidrogênio com as cisteínas 52 e 57. Além disso, outras ligações hidrogênio importantes são: tirosina 51, serina 14, glicina 127, asparagina 35, glicina 15, aspartato 327, tirosina 335, lisina 60, Isoleucina 199, glicina 56, tirosina 199. A Figura 14 encontra a cristalografia do FAD ligado à enzima. Devido as várias ligações FAD e proteína este complexo apresenta alta estabilidade (energia de ligação=-248,31 KJ/mol).

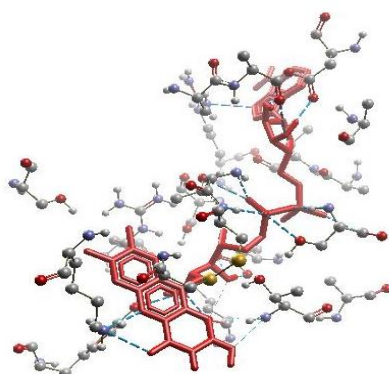


Figura 14: Ligação do FAD a tripanotiona reductase com os resíduos Ala 46; Ala 46; Ser 14; Ser 14; Arg 290; Lis 60; Lis 60; Tr 335; Tr 335; Tr 51; Tr 51; Met 333; Met 333; Asp 327; Asp 327; Asp 327; Asp 35; Asp 35; Cis 52; Thy 198.

Acredita-se que este pode ser um alvo potencial devido à ligação de uma substância no sítio catalítico ou na região de ligação do FAD possa ocasionar impedimento para a ligação do FAD (antagonismo competitivo). Dessa forma pode ocorrer uma elevação na concentração de espécies reativas de oxigênio como o peróxido. Esta elevação pode ocasionar dano no DNA do parasito e sua morte (FAIRLAMB, 2001; EVANS, DIZDAROGLU, COOKE, 2004). Um derivado de naftoquinona, o *2,3-bis[3-(2-amidinohidrazono)-butil],4-naftoquinona dihydrochloride*, demonstrou inibir a TR com IC₅₀ = 1 µM, enquanto que a droga controle (Nifurtimox) a IC₅₀ = 200 µM, o mesmo não aconteceu frente a GR, indicando que tal naftoquinona é mais seletiva (JOCKERS-SCHERUBL; SCHIRMER e KRAUTH-SIEGEL, 1989). Infelizmente, este alvo tem sido pouco explorado para a busca de novos fármacos leishmanicida.

Embora o Lapachol e os seu análogos α e β -lapachona tenham sido estudados como possíveis inibidores da TR em um estudo de docking, utilizando o programa AutoDocking, demonstrando que estes compostos possuem boa interação (MOLFETTA et al. 2009), uma limitação para esse estudo foi não ter sido descrito nenhum estudo de docking utilizando o MVD. Então, adotou-se como controle positivo (substância de referência) a Quinacrase mustard que é uma mustard nitrogenada derivada de mepacrina, na qual é uma substância inibidora da TR (BONSE et al. 1999). Foi cristalografada junto a enzima TR de *Trypanosoma cruzi* para demonstrar a sua interação e reafirmar sua inibição (SARAVANAMUTHU et al. 2004). Esta substância forma um complexo com a enzima (energia da ligação = -149,664 KJ/mol), sendo estabelecida 2 ligações de hidrogênio Tr 335 e Lis 60, estas distancias da ligação (Å) ligações estão acima da faixa considerada ideal (BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2014).

A energia livre (ΔG) é um método de medição do trabalho máximo realizado durante um processo e acompanha a maioria dos processos reacionais. Analisando a energia livre pode-se prever se uma reação é espontânea caso a temperatura e a pressão sejam constantes. Para que um processo ocorra espontaneamente ΔG° deve ser negativa. Logo, a ligação do Lapachol e seus análogos ocorrem espontaneamente (ΔG negativo). Sendo que ao se comparar a quinacrase mustard e as naftoquinonas,

nenhuma naftoquinona ligou-se a enzima de forma mais estável que o controle positivo. Mais alguns fatos interessantes merecem ser destacados:

1. Algumas naftoquinonas se ligam a um resíduo de aminoácido presente no sítio catalítico, possuindo uma energia de ligação próximas (103 a 110 KJ/mol) e distancia de ligação fora da faixa ideal (1,5 a 2,6; BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2014): 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I; energia da ligação= -103,769 KJ/mol); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O; energia da ligação= 109,235 kJ/mol); ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; Q; energia de ligação= -107,631 KJ/mol); 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S; energia de ligação= -109,577 KJ/mol; Quadro 7; Quadro 8).
2. Muitas moléculas podem se ligar ao resíduo de tirosina 51 (1 ou 2 ligações): Lapachol (energia da ligação= -109,643 KJ/mol); α -lapachona (energia da ligação= -100,507 KJ/mol); β -lapachona (energia da ligação= -94,343 KJ/mol); 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D; energia da ligação= -102,216 KJ/mol); 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (E; energia da ligação= -105,161 KJ/mol); ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno; F; energia da ligação= 100,777 KJ/mol); 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona (G; energia da ligação= -107,494 KJ/mol); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (H; energia da ligação= -108,248 KJ/mol); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona (I; energia da ligação= -103,769 KJ/mol); 3-(3-metilbut-2-enil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (J; energia da ligação=-103,51 KJ/mol); 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona (L; energia da ligação= -108,01 KJ/mol); 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N; energia da ligação= -115,635 KJ/mol); 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O; energia da ligação= 109,235 KJ/mol); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P; energia da ligação= -114,082 KJ/mol); ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il; R; energia da ligação= -98,269 KJ/mol) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol (T; energia da ligação= -114,314 KJ/mol; Quadro 7; Quadro 8)

3. Outra ligação observada foi com resíduo de serina 14: 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona (D; energia da ligação=-102,216 KJ/mol); 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (M; energia da ligação=-101,281 KJ/mol); 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (P; energia da ligação=-114,082 KJ/mol; Tabela Quadro 7; Quadro 8).

Modificações estruturais não alteraram, de forma significativa, a distância das ligações. As energias de ligações oscilaram entre -98 a 115 KJ/mol. O número de interação oscilou de 3 a 7 ligações. Também foram observadas ligações em alguns resíduos de forma mais frequente, no entanto, acredita-se que os bloqueios nos resíduos de cisteína 52 e 57 sejam mais significativas. Baseado neste estudo, as substância mais promissoras, provavelmente são: 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O; energia da ligação= 109,235 KJ/mol) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona (S; energia de ligação= -109,577 KJ/mol; Quadro 7; Quadro 8).

O redocking do Substrato NAD apresentou energia de interação (Figura 16) e RMSD (Figura 15) de -248,31 e 1,844 Å, respectivamente. Baixos valores de RMSD (*Root-mean-square deviation*) indicam que as estruturas são esteroquimicamente semelhantes, ou seja, demonstram que com a metodologia empregada alcança-se a sobreposição das estruturas que é importante para obtenção da posição inicial cristalografada. Por isso, o ideal são valores de RMSD (menores que 2,0 Å, o que demonstra uma boa reprodutibilidade deste estudo, visto que o RMSD foi menor que este valor (FRIESNER et al. 2004).

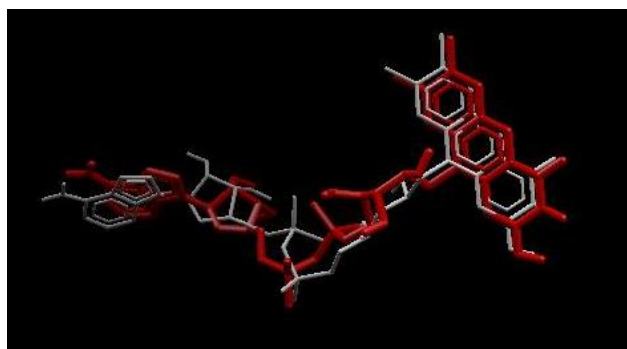


Figura 15: Redocking do FAD com obtenção de RMSD de 1,844Å, apresentando boa sobreposição.

Quadro 7: Avaliação da energia e da distância das ligações das naftoquinonas análogos do Lapachol.

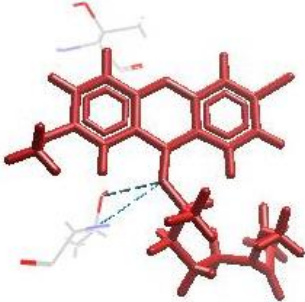
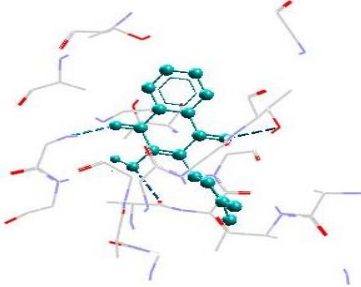
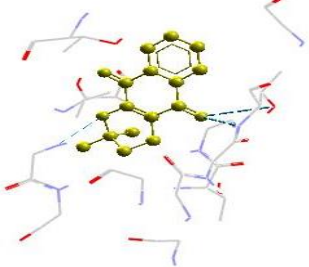
Composto	Energia de interação (KJ/mol)	Resíduos de ligação	Distancia da ligação Å
FAD	-248,31	Ala 46; Ala 46	3,223; 2,948
		Ser 14; Ser 14	2,694; 2,782
		Arg 290	3,051
		Lis 60; Lis 60	3,03; 2,962
		Tr 335; Tr 335	3,521; 3,282
		Tr 51; Tr 51	2,839; 2,965
		Met 333; Met 333	3,124; 2,785
		Asp 327; Asp 327; Asp 327	2,917; 2,926; 2,773
		Asp 35; Asp 35	3,099; 2,442
		Cis 52	2,888
Thy 198	2,969		
QUM- Quinacrase mustard	-149,664	Tr 335; Lis 60	3,467; 2,981
(A) Lapachol	-109,643	Gli 15; Ala 159	2,744; 2,653
		Tr 51; Tr 51	3,512; 2,974
(B) a-lapachona	-100,507	Tr 51; Tr 51	3,222; 2,927
		Gli 16	3,472
(C) b-lapachona	-94,343	Tr 51; Tr 51	3,193; 2,820
		Gli 16	3,264
(D) 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	-102,216	Asp 327; Ser 162; Ser 14	2,983; 3,031; 3,137
		Tr 51	2,577
(E) 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	-105,161	Tr 51; Tr 51	2,534; 3,207
		Ala 159	2,460
(F) Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)	-100,777	Ala 159; Gli 15	2,465; 2,607
		Tr 51; Tr 51	2,630; 3,401
		Gli13	3,562
(G) 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	-107,494	Tr 51	2,671
		Ala 159; Gli 15; Asp 272	2,367; 2,866; 2,671
(H) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	-108,248	Tr 51	3,038
		Tr 335; Asp 327; Asp 327; Asp 327	3,297; 3,515; 3,472; 2,932
		Ser 14; Ser 14; Tr 335	3,218; 3,063,096
(I) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	-103,769	Tr 51	2,123
		Asp 327	3,045
		Cis 57	2,794

			Leu 334	3,105
(J)	3-(30metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	-103,51	Tr 335; Leu 334 Tr 51; Tr 51 Asp 327; Gli 15	3,143; 3,066 3,181; 3,226 2,508; 2,895
(L)	2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona	-108,01	Tr 51; Tr 51 Gli 15	3,093; 2,825 2,895
(M)	3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-101,281	Ser 14; Ser 14; Ser 14 Tr 335; Ser 162	2,77; 3,089; 2,731 2,613; 3,069
(N)	2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-115,635	Tr 51 Gli 15; Ala 159	3,094 3,001; 2,42
(O)	3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-109,235	Cis 52 Tr 335 Asp 327; Asp 327; Asp 327 Tr 51; Tr 51 Asp 327	3,236 3,27 3,534; 3,35; 3,115 3,236; 3,530 2,350
(P)	2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	-114,082	Tr 51 Ala 159 Ser 14; Ser 14 Arg 287 Ser 162; Ser 162; Ser 162 Gli 15; Tr 335	3,28 3,037 3,039; 3,138 3,34 3,126; 2,986; 3,123 3,032; 3,28
(Q)	Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	-107,631	Ser 14 Cis 52 Gli 326; Gli 161; Ala 159	2,93 2,704 3,097; 3,255; 3,015
(R)	Ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	-98,269	Ser 162 Tr 160; Tr 160 Tr 51 Ala 159; Gli 15; Arg 287	3,034 3,212; 3,56 2,776 2,54; 3,266; 3,156
(S)	3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxi-naftalen-1(4H)-ona	-109,577	Ser 14 Asp 327; Asp 327 Cis 52	3,022 3,066; 3,296 2,768
(T)	3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	-114,314	Tr 51 Gli 15; Ala 159	2,659 2,892; 2,862

Legenda: Distância da ligação ideal < 2,0 Å

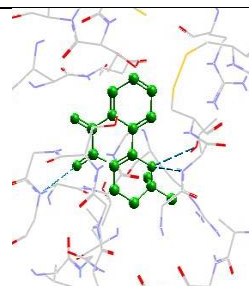
No campo de modelagem molecular, o docking (ancoragem) é um método que permite prever a orientação preferida de uma molécula ligada ao receptor formando um complexo estável (LENGAUER e RAREY, 1996). O conhecimento dessa orientação é importante para avaliar a resistência ou afinidade dessa associação. As demais ligações são avaliadas utilizando alguma função de pontuação, sendo que a pose indica a probabilidade de que a postura represente uma interação de ligação favorável. A maioria das funções de pontuação são campos de mecânica molecular em que estimam a energia da pose dentro do sítio de ligação. No Quadro 8 estão as poses de menor energia, isto é, a forma mais favorável da ligação naftoquinona e proteína. O grupamento farmacofórico me parece que é o c=O ou c-OH e cadeia lateral.

Quadro 8: Ligação do Lapachol e seus análogos a tripanotiona redutase, apresentando as ligações com os resíduos que interagiram.

	Composto	Figura	Observação
I	Quinacrase mustard		Tr 335; Lis 60
II	(A) Lapachol		Gli 15; Ala 159; Tr 51; Tr 51
III	(B) α -lapachona		Tr 51; Tr 51; Gli 16

IV

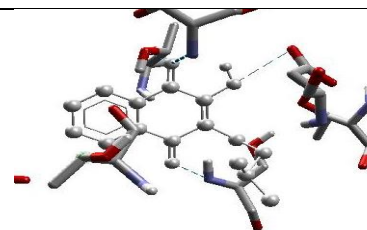
(C) β -lapachona



Tr 51;Tr 51; Gli 16

V

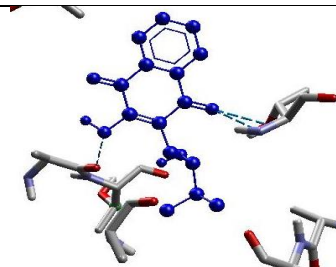
(D) 2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona



Asp 327; Ser 162; Ser 14; Tr
51

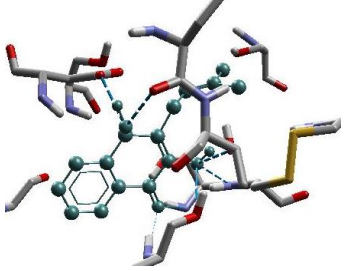
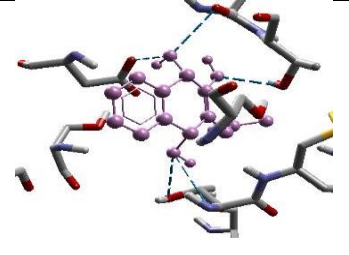
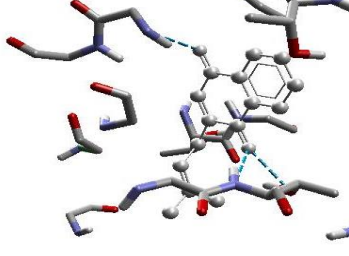
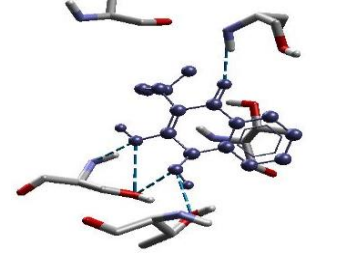
VI

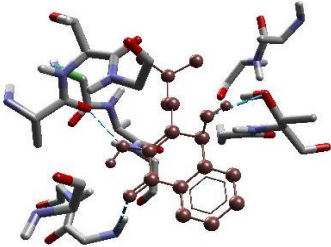
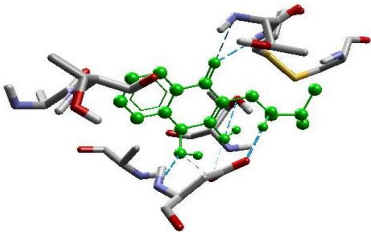
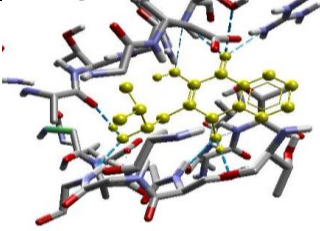
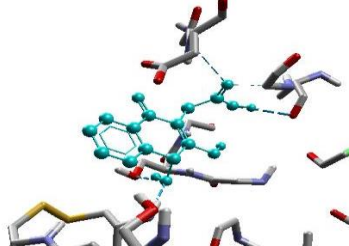
(E) 2-hidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona



Tr 51; Tr 51; Ala 159

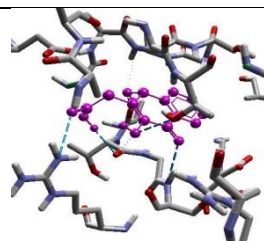
VII	(F) Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)		Ala 159; Gli 15 Tr 51; Tr 51; Gli13
VII	(G) 2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona		Tr 51; Ala 159; Gli 15; Asp 272
IX	(H) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1(4H)-ona		Tr 51; Tr 335; Asp 327; Asp 327; Asp 327

X	(I) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona		Ser 14; Ser 14; Tr 335; Tr 51; Asp 327; Cis 57; Leu 334
XI	(J) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)naftalen-1(4H)-ona		Tr 335; Leu 334; Tr 51; Tr 51; Asp 327; Gli 15
XII	(L) 2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona		Tr 51; Tr 51; Gli 15
XIII	(M) 3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-one		Ser 14; Ser 14; Ser 14; Tr 335; Ser 162

XIV	(N) 2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona		Tr 51; Gli 15; Ala 159
XV	(O) 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona		Cis 52; Tr 335; Asp 327; Asp 327; Asp 327; Tr 51; Tr 51; Asp 327
XVI	(P) 2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-one		Tr 51; Ala 159; Ser 14; Ser 14; Arg 287; Ser 162; Ser 162; Ser 162; Gli 15; Tr 335
XVII	(Q) Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)		Ser 14; Cis 52; Gli 326; Gli 161; Ala 159

XVIII

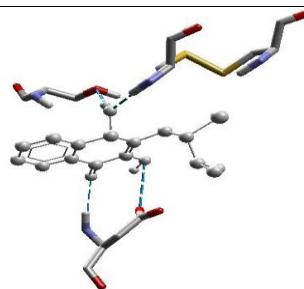
(R) Ácido (1,3-dihidroxi-4-oxo-1,4-
dihidronaftalen-2-il)



Ser 162; Tr 160; Tr 160; Tr 51
Ala 159; Gli 15; Arg 287

XIX

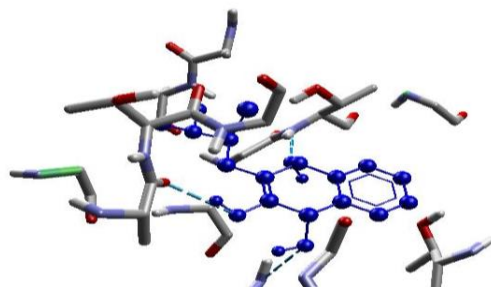
(S) 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-dihidroinaftalen-
1(4H)-ona



Ser 14; Asp 327; Asp 327; Cis
52

XX

(T)3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-dihidronaftqleno-
1,2,4-triol



Tr 51; Gli 15; Ala 159

5.4. Seleção dos análogos para síntese

Após a análise de todos estes parâmetros teóricos (farmacocinética, mutagenicidade, carcinogenicidade, predição de atividade e docking) observa-se que vários parâmetros não foram alterados para a maioria dos compostos. Conforme dito anteriormente, todas as moléculas inibem o CYP (metabolismo), podendo ocorrer interação medicamentosa do tipo farmacocinética. O Lapachol inibe três classes de CYP, alterações estruturais levaram a obtenção de compostos que inibem somente uma classe de CYP cuja principal característica química destes compostos é a redução de pelo menos uma das carbonilas e a hidrogenação da cadeia lateral (Quadro 9). O Lapachol apresentou potencial mutagênico e carcinogênico. As alterações estruturais como a redução das carbonilas e a hidrogenação ou halogenação da cadeia lateral levaram a obtenção de compostos que parecem não ser mutagênico e carcinogênico (2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (N), 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O), 3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxinaftalen-1(4H)-ona (S) e 3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftqleno-1,2,4-triol (T); Quadro 9). O candidato a fármaco ideal precisa ser bem absorvido no trato gastrintestinal, não ligar fortemente a proteína plasmática, não interferir no metabolismo de outros fármacos e de preferência não induza/ iniba a CYP 3A4 e CYP2C9. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo da maioria dos fármacos disponíveis. As alterações estruturais apenas reduziram o número de enzimas inibidas (Quadro 9). Outros critérios importantes são não ser mutagênico (Teste Ames -) e carcinogênico. Por último, ligar ao sítio receptor de forma espontânea (ΔG negativo), sendo que o análogo mais promissor o 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O).

Quadro 9: Associação de informações sobre ao Lapachol e seus análogos.

Compostos	Farmacocinética					Energia	Docking	
	LPP	Inibição de CYP	Mutagen	Carcino	Leish		Distancia	Pose
Lapachol	Sim	3	+	+	+	-109,643	4 >ideal	-
α-lapachona	Não	2	+	+	-	-100,507	3 >ideal	-
β-lapachona	Sim	3	+	+	-	-94,343	3 >ideal	-
2-hidroxi-3(3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	Sim	2	+	+	-	-102,216	4 >ideal	-
2-hidroxi-3(2-hidroxi-3-metilbutil)-1,4-naftoquinona	Sim	3	+	+	-	-105,161	3 >ideal	-
Ácido (3-hidroxi-1,4-dioxo-1,4-diidro-2-naftaleno)	Não	1	+	+	-	-100,777	5 >ideal	-
2-(2-cloro-3-metilbutil)-3-hidroxinaftaleno-1,4-diona	Sim	3	+	+	-	-107,494	4 >ideal	-
3,4-diidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	Não	1	+	+	-	-108,248	5 >ideal	-
2,4-diidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftalen-1(4H)-ona	Não	1	+	+	-	-103,769	7 >ideal	Cis 57
3-(30metilbut-2-en-1-il)-1,4-diidronaftaleno-1,2,4-triol	Não	2	-	+	-	-103,51	6 >ideal	-
2-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona	Sim	2	+	+	-	-108,01	3 >ideal	-
3,4-diidroxi-2-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	Sim	1	+	-	-	-101,281	5 >ideal	-
2,4-diidroxi-3-(3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	Sim	1	-	-	-	-115,635	3 >ideal	-
3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	Não	1	-	-	-	-109,235	8 >ideal	Cis 52
2,4-diidroxi-3-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona	Não	1	-	+	-	-114,082	10 >ideal	-
Ácido (3,4-diidroxi-1-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	Não	1	+	+	-	-107,631	5 >ideal	-
Ácido (1,3-diidroxi-4-oxo-1,4-diidronaftalen-2-il)	Não	1	+	+	-	-98,269	7 >ideal	-
3-(2-cloro-3-metilbutil)-2,4-diidroxinaftalen-1(4H)-ona	Não	2	-	-	-	-109,577	4 >ideal	Cis 52
3-(2-cloro-3-metilbutil)-1,4-diidronaftalen-1,2,4-triol	Não	2	-	-	-	-114,314	3 >ideal	-

Legenda: LPP- ligação elevada a proteína plasmática > 90%; Inibição de CYP: número de isoformas inibidas; Mutagen= mutagenicidade; Carcino= carcinogenicidade; leish= Leishmanicida; distancia: é a distância da ligação em Å, sendo exposto o número de ligação e considerado < 2,0Å a ideal

** apenas em rato

5.5. Planejamento da síntese

5.5.1. OBTENÇÃO DO LAPACHOL

O Lapachol foi obtido a partir da extração de serragens da madeira adquirida em uma serraria de Belém-PA. O rendimento do extrato foi de 0,88% (16,348g), e esse baixo rendimento possivelmente foi devido ao uso de solução de NaHCO₃ (pKa= 6.37), em vez de solução de Na₂CO₃ (pKa=10,32); outros autores conseguiram um rendimento maior utilizando o Na₂CO₃ (FERREIRA, 1996). Posteriormente, fez-se uma coluna cromatográfica com 5,540g para a obtenção das frações. Os rendimentos das frações podem ser observados no Figura 16A que conta apenas com aquelas frações que a corrida na placa CCD é semelhante ao Lapachol (Figura 16B), sendo que a fração 2 foi a que apresentou maior rendimento com 63,18% e possuía bandas semelhante ao Lapachol utilizado (Figura 16C).

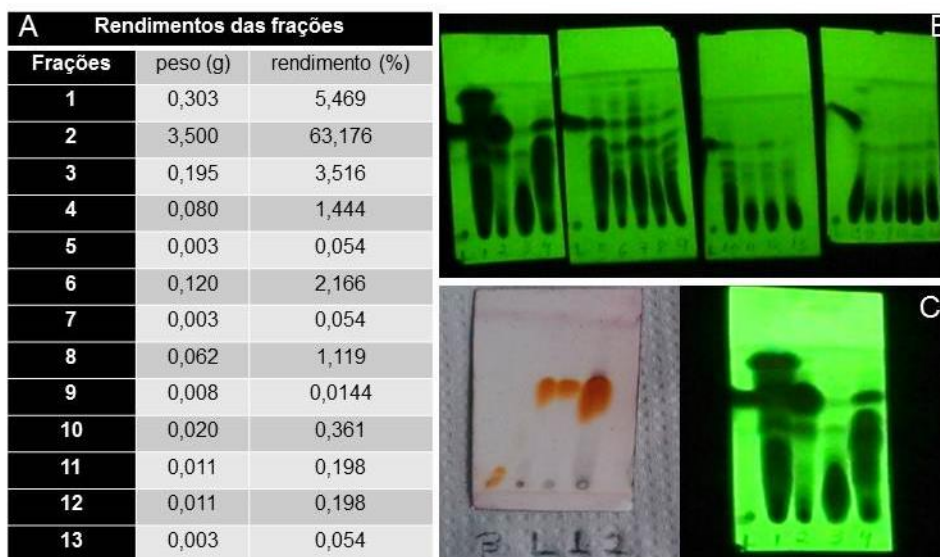


Figura 16: (A) Rendimento das frações obtidas a partir das serragens de *Tabebuia spp.*; (B) placas de cromatografia em camada delgada (CCD) das frações de 1 a 13; (C) placa de CCD com as amostras de β -lapachona [B], Lapachol [L] e frações 1 e 2.

Após a análise dos rendimentos e dos cromatogramas decidiu-se fazer um novo fracionamento da Fração 2 para obter-se um produto mais puro. Nesse novo

fracionamento utilizou-se 2,2g da Fração 2 e foram coletadas nove frações. A Fr3 apresentou maior pureza e rendimento e, portanto, foi utilizada para as análises de RMN (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimentos das Frações obtidas a partir do fracionamento da Fração 2 (coluna cromatográfica, solvente dicloro metano)

Frações	Peso (g)	Rendimento (%)
Fr1	0	0
Fr2	0,09	3,5
Fr3	1,2	46,79
Fr4	0,029	1,12
Fr5	0,1	3,89
Fr6	0	0
Fr7	1,03	40,07
Fr8	0	0
Fr9	0	0

5.5.1.1. Identificação do Lapachol

O Lapachol foi obtido como um sólido amarelo cristalino e seu espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 , Figura 17, apresenta dois sinais simpletos em δ_{H} 1,67 (s; 3H) e δ_{H} 1,78 (s; 3H) referentes aos hidrogênios dos grupos metilas CH_3 -14 e CH_3 -15,

respectivamente; um sinal duplo tripleto em δ_H 3,31 (dt; 2H; $J=7,5$ Hz e $J=0,9$ Hz) devido aos hidrogênios H-11; um sinal multipeto em δ_H 5,20 (m; 1H) referente ao hidrogênio olefínico H-12; um sinal simpleto em δ_H 7,35 (s; 1H) devido ao hidrogênio da hidroxila ligada a carbono sp^2 ; um sinal tripleto de dupeto em δ_H 7,66 (td; $J=7,5$ Hz e $J=1,8$ Hz; 1H) devido ao hidrogênio aromático H-7; um sinal tripleto de dupeto em δ_H 7,74 (td; $J=7,5$ Hz e $J=1,5$ Hz; 1H) devido ao hidrogênio aromático H-6; um sinal duplo duplo dupeto de dupeto em δ_H 8,05 (dddd; $J=7,5$ Hz; $J=1,8$ Hz e $J=0,6$ Hz; 1H) devido ao hidrogênio aromático H-8 e um sinal duplo duplo dupeto de dupeto em δ_H 8,11 (dddd; $J=7,5$ Hz; $J=1,8$ Hz e $J=0,6$ Hz; 1H) devido ao hidrogênio aromático H-5. A Figura 18 apresenta a expansão de sinais do espectro de RMN de 1H .

O Lapachol possui 15 átomos de carbono (FIGURA 19), porém seu espectro de RMN de ^{13}C (em $CDCl_3$) apresenta apenas 14 sinais, porque o sinal em δ_C 132,84 é devido aos carbonos C-7 e C-10. Os sinais em δ_C 17,87; δ_C 22,59 e δ_C 25,73 são devidos, respectivamente, aos carbonos C-15, C-11 e C-14; os sinais em δ_C 119,62; δ_C 126,02; δ_C 126,73; δ_C 132,84 e δ_C 134,82 são devidos, respectivamente, aos carbonos hidrogenados (CH) C-12, C-5, C-8, C-7 e C-6; os sinais em δ_C 123,44; δ_C 129,41; δ_C 132,84; δ_C 133,82 e δ_C 152,67 são devidos, respectivamente, aos carbonos não hidrogenados C-3, C-9, C-10, C-13 e C-2; e os sinais em δ_C 181,67 e δ_C 184,54 são devidos, respectivamente, aos carbonos carbonílicos C-4 e C-1. A Figura 20 mostra a expansão de sinais do ^{13}C . O espectro de DEPT do Lapachol (figura 21), confirma a presença de cinco carbonos CH, um carbono CH_2 e dois carbonos de grupo metila. Os dados espectrométricos do Lapachol estão de acordo com os dados da literatura (Quadro 10 e 11; MOREIRA, 2006).

rmn009h16
operador: elinaldo
24/02/16
20mg
Pulse Sequence: s2pul

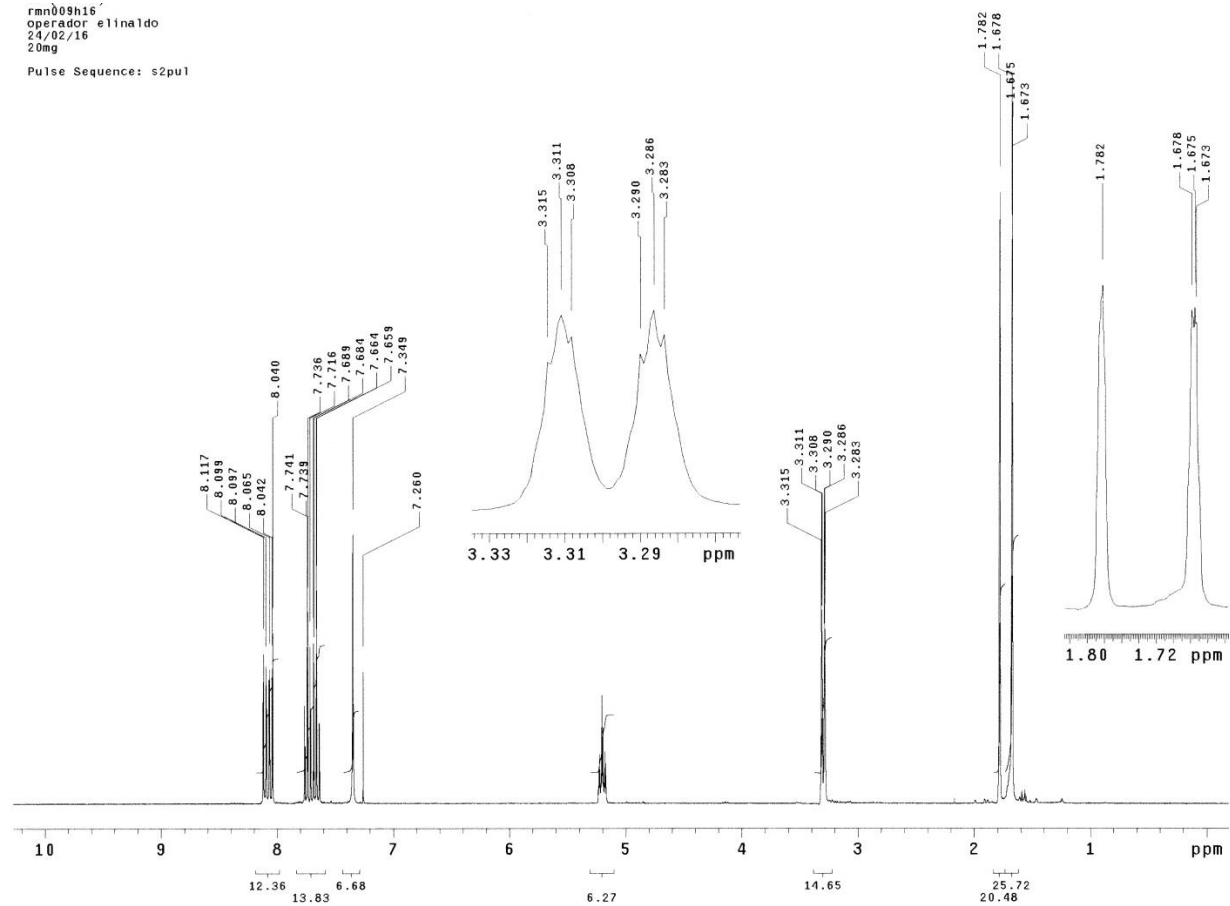


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H de Fr3 - (CDCl₃, 300 Hz)

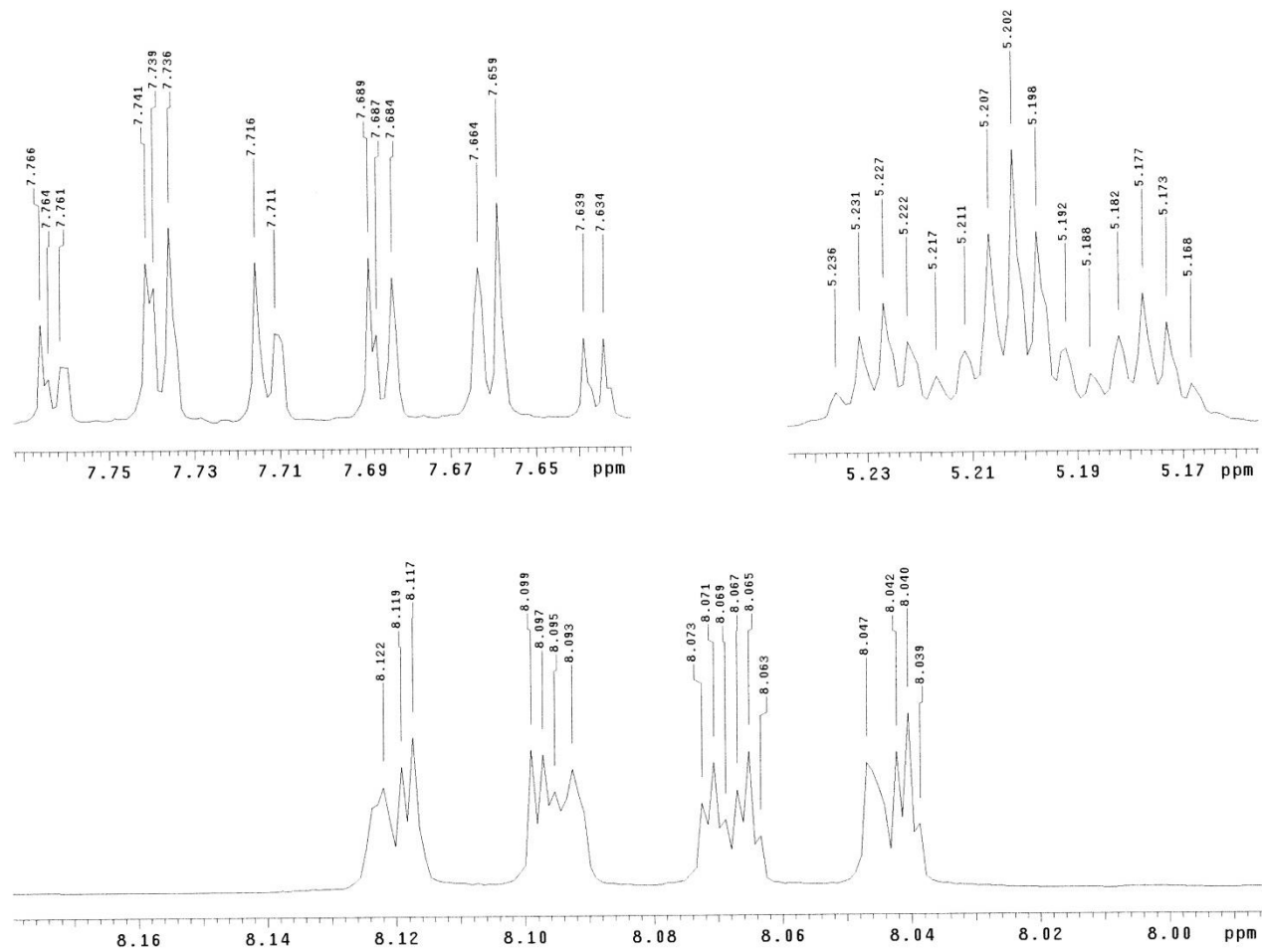


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H de Fr_3 , expansão - (CDCl_3 , 300MHz)

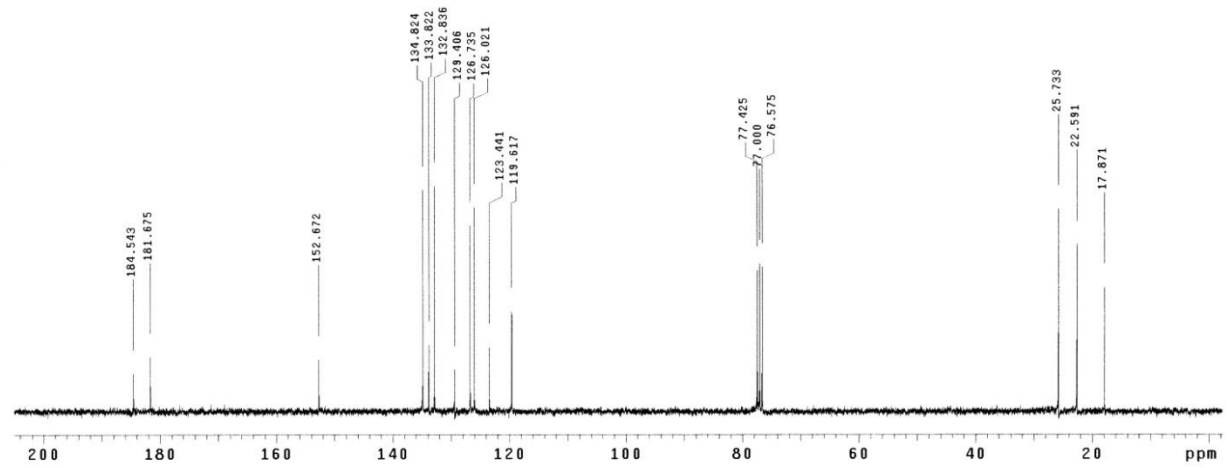


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C de Fr3 (CDCl_3 , 75MHz)

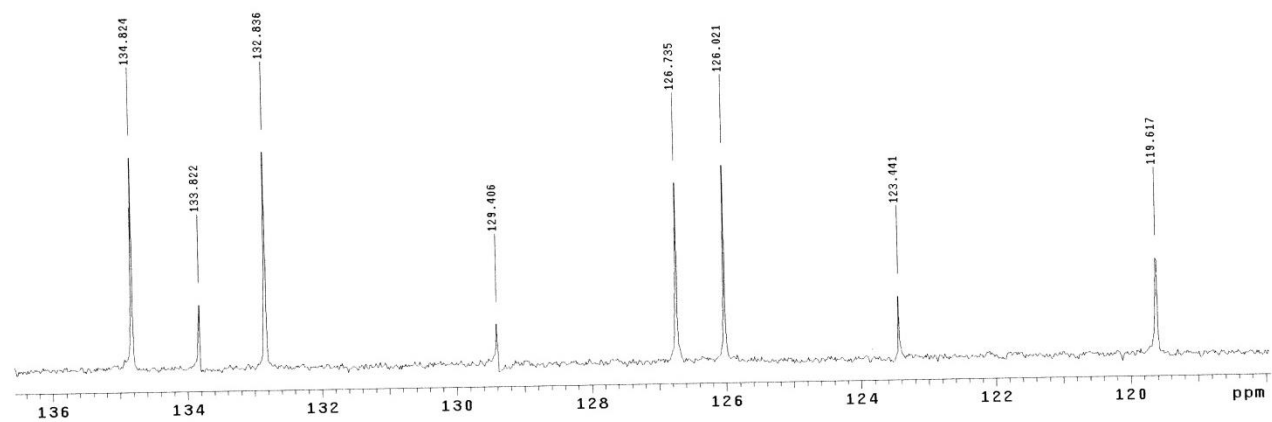


Figura 20: Espectro de RMN ¹³C de Fr3, expansão (CDCl₃, 75MHz)

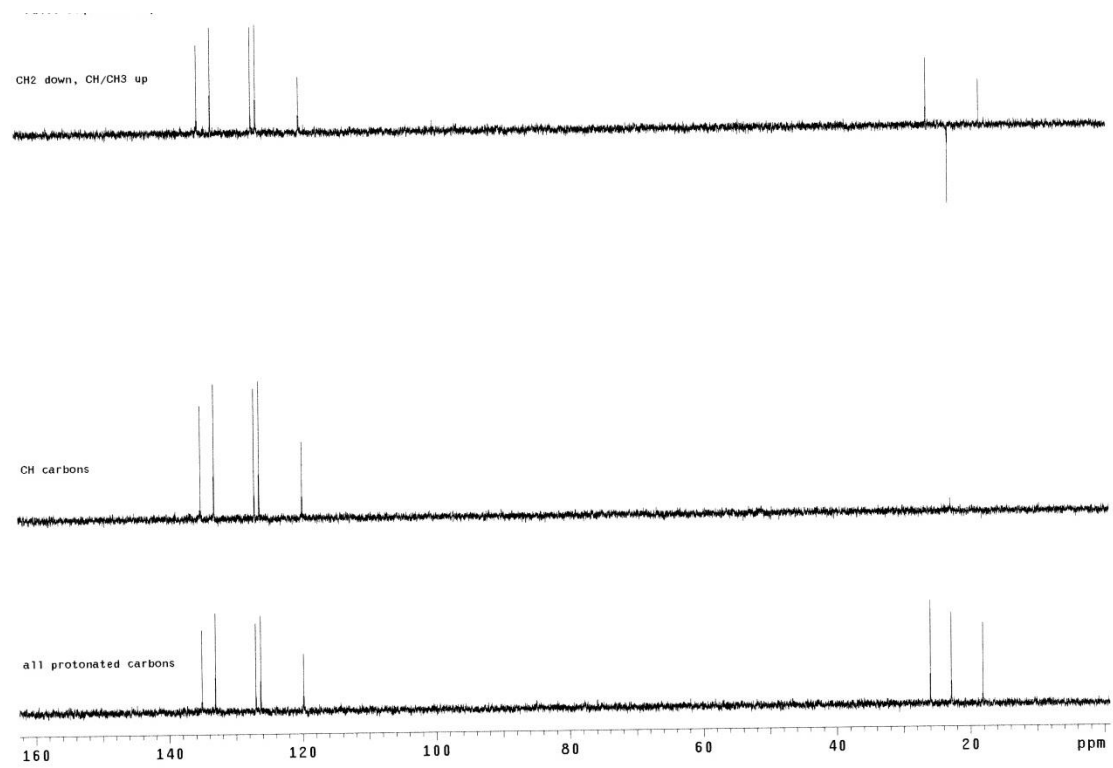


Figura 21: Espectro de RMN de C de Fr3, DEPT (CDCl_3 , 75MHz)

Quadro 10: Espectros de RMN ^1H da fração Fr3 em comparação com a literatura.

^1H	Compostos	
	Fr3 δ_c	Lapachol (MOREIRA et al. 2006) δ_c
5	8,11 dd	8,1 dd
6	7,74 td	7,7 td
7	7,66 td	7,7 td
8	8,05 dd	8,1 dd
11	3,31 dt	3,20 d
12	5,20 m	5,20 t
14	1,67 s	1,65 s
15	1,78 s	1,75 s
OH-2	7,35 s	7,20 s

Quadro 11: Espectros de RMN ^{13}C da fração Fr3 em comparação com a literatura

^{13}C	Compostos	
	Fr3 δ_c	Lapachol (MOREIRA et al. 2006) δ_c
1	184,54	184,5
2	152,67	152,7
3	123,44	123,5
4	181,67	181,7
5	126,02;	126,0
6	134,82	134,8
7	132,84	132,8
8	126,73	126,7
9	129,41	129,4
10	132,84	132,9
11	22,59	22,6
12	119,62	119,6
13	133,82	133,8
14	25,73	25,7
15	17,87	17,8

6. CONCLUSÃO

As mudanças estruturais propostas que partem da molécula do Lapachol, em geral, melhoram as características farmacocinéticas *in silico* em comparação com o Lapachol. Os análogos propostos são bem absorvidos pelo intestino. Algumas mudanças estruturais aumentam a distribuição para o SNC como OH nos carbonos C1 e/ou C4, bem como a presença de uma cadeia lateral lipofílica. Apesar das mudanças estruturais e melhora dos outros parâmetros farmacocinéticos, os análogos ainda inibem a CYP, porém apresentam um pequeno progresso em relação a isto, pois alguns análogos inibem apenas um ou duas CYPs.

A toxicidade da maioria dos análogos do Lapachol, não apresentaram mudanças favoráveis. Entretanto, alguns análogos não mostraram serem mutagênicos ou carcinogênicos em teste *in silico*. Talvez este resultado possa estar relacionado com a ausência da carbonila, substituída pela OH, assim como a presença da OH na cadeia lateral.

Em relação à atividade biológica, as substâncias estudadas podem apresentar um ou mais atividades biológicas. Porém, nenhum dos análogos apresentou atividade Leishmanicida, mesmo os que possuem atividade contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, como a α -lapachona e β -lapachona. Portanto, esse programa utilizando pode não ser o mais adequado para estudos de predição de atividade Leishmanicida.

Basicamente, todas as mudanças estruturais propostas aumentaram a interação dos análogos com a proteína alvo. Embora a energia de interação seja menor, quando comparados com o inibidor padrão, os análogos apresentaram boa energia.

Na avaliação segundo os critérios pré-estabelecidos o análogo selecionado mais promissor foi o 3,4-diidroxi-2-(2-hidroxi-3-metilbutil)naftalen-1(4H)-ona (O), pois apresentou boas propriedades farmacocinéticas, toxicológicas e boa interação com a proteína alvo. Porém, sugere-se que estudos futuros sejam realizados, a fim de comprovar os dados dos estudos *in silico* e sintetizar tal análogo para avaliar sua atividade frente a parasitos de *L. amazonensi*.

7. REFERÊNCIAS

AJAY, B. G. W, MURKCO, M. A. Designing libraries with CNS activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4942–51 1999.

ALBRECHT, H.; SOBOTTKA, I.; EMMINGER, C.; JABLONOWSKI, H.; JUST, G.; STOEHR, A.; KUBIN, T.; SALZBERGER, B.; LUTZ, T.; VAN LUNZEN, J. Visceral leishmaniasis emerging as an important opportunistic infection in HIV infected persons living in areas nonendemic for *Leishmania donovani*. **Pathology & Laboratory Medicine**. v. 120, n. 2, p.189–98, 1996.

ALEXANDER, J; RUSSELL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**., v.31, p.175-254, 1992.

ALMEIDA, S.M.; GAMA, C.S.; AKAMINE, N. Prevalência e classificação de interações entre medicamentos dispensados para pacientes em terapia intensiva. **Einstein**, v. 5, n. 4, p. 347-351, 2007.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN,C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.;CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. 536-49, 2012.

AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2281–5, 1973.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Endogenous mutagens and the cause of aging and câncer. **Mutation Research**. v. 250, n. 1, p. 3-16, 1991.

ANDRADE-NETO, V. F.; GOULART, M. O. F.; SILVA FILHO, J. F.; SILVA, M. J.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 5, p. 1145-9, 2004.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; RAMALHO CATÃO, R. M.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.;

SARMENTO SILVA, T. M. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.16, n. 4, p. 517-24, 2006.

AUFFINGER, P.; HAYS, F. A.; WESTHOF, E.; Ho, P. S. Halogen bonds in biological molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 48, p. 16789–94, 2004.

BAI, L.; YING HAN, Y.; JINFENG YAO, J.; LI, X.; LI, Y.; XU, P.; XUE, M. Structural elucidation of the metabolites of lapachol in rats by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 944, p.128-135, 2014.

BAIOCCO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, F.; ILARI, A. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.

BERG, J.M; TYMOCZKO, J.L, STRYER, L. **Bioquímica**. Ed.7. Rio de janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 1340-50, 2014.

BONSE, S.; SANTELLI-ROUVIER, C.; BARBE, J.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 26, p. 5448-54, 1999.

BOOTHMAN, D. A.; TRASK, D. K.; PARDEE, A. B. Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. **Cancer research**, v. 49, n. 3, p. 605-612, 1989.

BOVERIS, A.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. F.; STOPPANI, A. Effect of α lapachone on superoxideanion and hydrogenperoxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 6, n. 3, p. 207-209, 1978.

BRAGA F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p.396-402, 2007.

BRASIL _____. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-v/11330descricao-da-doenca>>. Acesso em: 20 maio 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose tegumentar americana**. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-az/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 20 maio 2016.

CALDAS, C. P. M.; SOUSA, J. P.; PEREZ, A. L. A. L.; SANTOS, J. M. C. G; OLIVEIRA, H. M. B. F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica *in silico* e *in vitro* do monoterpene citral. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 905-912, 2016.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n.5, p.520-9, 1998.

CASTRO, S.L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, v. 53, n. 2, p. 83-98, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>>. Acesso em: 14 maio 2016.

CERQUEIRA, E. C.; NETZ, P. A.; DINIZ, C.; DO CANTO, V. P.; FOLLMER, C. Molecular insights into human monoamine oxidase (MAO) inhibition by 1,4naphthoquinone: Evidences for menadione (vitamin K3) acting as a competitive and reversible inhibitor of MAO. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 24, p. 7416–24, 2011.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **Journal of parasitic diseases**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

CORACINI, J. **Simulação computacional do sistema proteína-ligante. Estudo da chiquimato quinase de mycobacterium tuberculosis**.2012. 91f. Dissertação (mestrado em ciências da saúde). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F. Determinação da Estereoquímica Relativa de Pimaradienos Através de Produtos de Oxidação. **Química Nova**, v. 20, n.3, p.261-6, 1997.

CRUZ, F. S., DO CAMPO, R., AND DE SOUSA, W. Effect of β -lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 35, n. 1, p. 3540, 1978.

CRUZ, F. S., DOCAMPO, R.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anions and hydrogen peroxide from 3-lapachone in bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 14, n. 4, p. 630-3, 1978.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n.6, p. 491-502, 2009.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAS, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, v. 326, n. 7385, p. 377-82, 2003.

DE MICHELI, C.; FRÉZARD, F. Pentavalent Antimonials: from chemistry to the design of new drugs. **Drugs Design Reviews**, v. 2, n. 3, p. 2317-36, 2005.

DE SOUZA, M. A. A.; DA SILVA, A. R.; FERREIRA, M. A.; DE LEMOS, M. J.; RAMOS, R. G.; FERREIRA, A. B. B.; DE SOUZA, S. R. Atividade biológica do Lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1678-7064, 2008.

DECUYPERE, S.; RIJAL, S.; YARDLEY, V.; DE DONCKER, S.; LAURENT, T.; KHANAL, B.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.C. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4616-21, 2005.

DIMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p.151-85, 2003.

DO CAMPO, R., CRUZ, F. S., BOVERIS, A., MUNIZ, R. A.; ESQUIVEL, D. M. S. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion and hydrogen peroxide in fl-lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.186, n. 2, p. 292-297, 1978.

DO CAMPO, R., CRUZ, F. S., BOVERIS, A., MUNIZ, R. P., AND ESQUIVEL, D. M. β -Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, n. 6, p. 723-8, 1979.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanosoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997.130f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

DORES, S. M. C; PAIVA, S. A. R; CAMPANA, A. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 3, p. 207-18, 2001.

ELDER, S. J.; HAYTOWITZ, D. B.; HOWE, J.; PETERSON, J. W.; BOOTH, S. L. Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U.S. diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 463-7, 2006.

EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M., COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, v. 567, n. 1, p. 1-61, 2004.

FAIRLAMB, A. H.; RIDLEY, R. G.; VIAL, H. J. Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues – Discoveries and drug development. **Revista de Microbiologia**, v. 12, n. 1, p. 13-20, 2001.

FAIRLAMB, A. H; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the *Kinetoplastida annu*. **Revista de Microbiologia**, v.46, n. 1, p. 695-729,1992.

FERREIRA, M. G. P. R.; KAYANO, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; DA SILVA, T. O; ZULIANI, J.P.; FACUNDO, V.A.; CALDERON, L. A; ALMEIDA-E-SILVA, A; CIANCAGLINI, P. STÁBELI, R.G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenil) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 20, n.6, p.1003-1006, 2010.

FERREIRA, V.F. Aprendendo sobre os conceitos ácido e base. **Química Nova na Escola**, v. 4, n. 1, p. 1-2, 1996.

FILIMONOV, D. & POROIKOV, V. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. **Royal Society of Chemistry journals**, v. 4, p. 182-216, 2008.

FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.7, p.1739-1749, 2004.

FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S.; NEDER, K.; WITIYAK, D. T. LIU, A. A.; WANG, H.; MAO, Y.; WU, H.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA

Topoisomerase II-mediated DNA Cleavage by b-Lapachone and Related Naphthoquinones. **Cancer Research**, v.57, n.4, p.620-627, 1997.

GONÇALVES, A. M.; VASCONCELLOS, M. E. L.; DO CAMPO, R.; CRUZ, F. S.; DE SOUZA, W.; LEON, W. Evaluation of the toxicity of 3-allyl- β -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.1, n.3, p.167-176, 1980.

GRIMALDI JUNIOR, TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, n.6, p.687-725, 1989.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista de Procedimentos Químicos**, v.2, n.4, p.24-26, 2008.

GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C. F. R.; LANZA, J. S.; MELO, M. N.; DO MONTENETO, R. L.; DE MELO, I. M. M.; DIOGO, E. B. T.; FERREIRA, V. F.; CAMARAE, C. A.; VALENÇA, W. O.; DE OLIVEIRA, R. N.; FRÉZARD, F.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and – resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel a- and nor-alapachonebased 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azidealkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, p.523-530, 2013.

GUPTA, A.; BLUHM, R. Seborrheic dermatitis. **Journal of European Academy of Dermatology & Venereology**, v. 18, n.1, p. 13-26, 2004.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glioxal Formation. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p.115-123, 2012.

HALPERT, J. R. Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 29-53, 1995.

HAUPTMAN, P.; KELLY, R. A. **Digitalis**. *Circulation*, v. 99, p.1265-1270, 1999.

HILLARD, E. A.; DE ABREU, F. C.; FERREIRA, D. C.; JAOUEN, G.; GOULART, M. O.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development,

with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, v. 23, n. 21, p.2612-28, 2008.

JOCKERS-SCHERUBL, M. C.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, n. 2, p. 267-272, 1989.

JORQUEIRA, A.; GOUVÊA, R. M.; FERREIRA, V. F.; DA SILVA, M. N.; DE SOUZA, M. C. B. V.; ZUMA, A. A.; CAVALCANTE, D. F. B.; ARAÚJO, H. P.; SANTOS, D. O.; BOURGUIGNON, S. C. Oxyrane derivative of α -lapachone is potent growth inhibitor of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 429-433, 2006.

KARTASASMITA, R. E.; HEROWATI, R.; GUSDINAR, T. Docking Study of Quercetin Derivatives on Inducible Nitric Oxide Synthase and Prediction of their Absorption and Distribution Properties. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 23, p. 3098-3104, 2010.

KARTASASMITAA, R. E.; MUSFIROHA,I.; MUHTADIB, A.; IBRAHIMA, S. Binding affinity of asiatic acid derivatives design against Inducible Nitric Oxide Synthase and ADMET Prediction. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 075-080, 2014

KATOH, T.; MONMA, H.; WAKASUGI, J.; NARITA, K.; KATOH, T. Synthesis of β -Lapachone, a Potential Anticancer Agent from the Lapacho Tree. **European Journal of Biochemistry**, v. 2014, n. 32, p. 7099-7103, 2014.

KELLER-SEITZ, M. U.; CERTA, U.; SENGSTAG, C.; WÜRGLER, F. E.; SUN, M.; FASULLO, M. Transcriptional Response of Yeast to Aflatoxin B1: Recombinational Repair Involving RAD51 and RAD1. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, n. 9, p. 4321–4336, 2004.

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.

KLACK, K.; CARVALHO, J. F. Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n.6, p. 398-406, 2006

KOVAČEVIĆ, S. Z.; JEVRIĆ, L. R.; PODUNAVAC KUZMANOVIĆ, S. O.; LONČAR, E. S. Prediction of In-silico ADME Properties of 1,2-O-Isopropylidene Aldohexose Derivatives . **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 899–907, 2014.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives - Eleutherin, a Lapachone, and b Lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1367-1379, 2000.

KUMAGAI, Y.; TSURUTANI, Y.; SHINYASHIKI, M.; HOMMA-TAKEDA, S.; NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 245-250,1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; PÓVOA, M. M.; ISHKAWA, E. A. Y. A. Leishmania e as Leishmanioses. **Instituto Evandro Chagas**, v. 1, 1986.

LAURSEN, M.; GREGERSENA, J. L.; YATIMEA, L.; NISSENA, P.; FEDOSOVA, N. U. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺, K⁺, ATPase compared with the ouabain-bound complex. **Medical Research Council**, v. 112, n. 6, p. 1755-1760, 2014.

LENGAUER, T; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402-406, 1996.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B. M.; LIEEDALE, G. F.; LEOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B. Induction of Apoptosis by a-Lapachone in Human Prostate Cancer Cells. **Cancer research**, v. 55, n.17, p. 3712-3715,1995.

LIMA, N. M. F.; CORREIA, C. S.; LEON, L. L.; MACHADO, G. M. C.; MADEIRA, M. F.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antileishmanial activity of Lapachol analogues. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n, 7, p. 757-761, 2004.

LIN, J. H.; LU, A. Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 5, p. 361-390, 1994.

LIVINGSTON, H. M.; LIVINGSTON, M. G. Monoamine Oxidase Inhibitors. An update on drug interactions. **Drug Safety**, v. 14, n.4, p. 219-227, 1996.

MARCOLIN, M. A.; CANTARELLI, M. G.; GARCIA JUNIOR, M. Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 2, p. 70-81, 2004.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n.3, p.173-215, 1983.

MARZIN, D.; KIRKLAND, D. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye of Henna, is non-genotoxic in the mouse bone marrow micronucleus test and does not

produce oxidative DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 560, n. 1, p.41–47, 2004.

MATA-SANTOS, T.; PINTO, N. F.; MATA-SANTOS, H. A.; DE MOURA, K. G.; CARNEIRO, P. F.; CARVALHO, T. S.; DEL RIO, K. P.; PINTO, M. C. F. R.; MARTINS, L. R.; FENALTI, J. M.; DA SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. Anthelmintic activity of lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p.197-204, 2015.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n.6, p.999-1006, 2003.

MELO, N. M. **Avaliação da atividade anti-leishmanicida in vitro de complexos Sb(V)-ribonucleosídeos em Leishmania (L) chagasi**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MICHELIM, L.; ATTIB, J. L.; PANAROTTOB, D.; LOVATTOB, L.; BONIATTI, M. M. Dermatoses em pacientes infectados pelo HIV com a contagem de linfócitos CD4 Dermatological disease among HIV-infected patients with CD4 lymphocyte count. **Revista saúde pública**, v. 38, n. 6, p. 758-763, 2004.

MOLFETTA, F. A.; FREITAS, R. F.; DA SILVA, A. B. F.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, n. 10, p. 1175-1184, 2009.

MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E. Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n, 3, p. 392-396, 2006.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n, 1-2, p. 29-60, 2000.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R. D.; KRAUTH-SIEGEL, L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitology**, v. 19, n.7, p. 320-328, 2003.

NALDI, L.; REBORA, A. Clinical practice. Seborrheic dermatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 4, p. 387-396, 2009.

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. *In vitro* antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61-66, 2009.

OLIVEIRA, C. G. T.; MIRANDA, F. F.; FERREIRA, V. F.; FREITAS, C. C.; RABELLO, R.F.; CARBALLIDO, J.M.; CORRÊA, L.C.D. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 3-Hydrazino-Naphthoquinones as Analogs of Lapachol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12 n.3, p.339-345, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; DE MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G.M.P.; BRAZ-FILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.74 n. 2, p. 211-21, 2002.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 127-51, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. 2002. Disponível em <<http://www.who.int/wer>>, acessado em: 9 fev 2015.

_____* . Eishmaniasis. 2016². Disponível em:
<<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 20 maio 2016.

_____* . Leishmaniasis. 2016³. Disponível em:
<<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 20 maio 2016.

_____* . Casos de Leishmaniose cutânea ao redor do mundo. 2016⁴.
Disponível em:
<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png>.
Acesso em 13 maio 2016.

PALUMBO, E. Current Treatment of Leishmaniasis: A review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 16, n. 2, p. 172-82, 2009.

PANDEY, R.K.; KUMBHAR, B.V.; SUNDAR, S.; KUNWAR, A.; PRAJAPATI, V.K. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase. **Journal of receptors and signal transduction**, v. 37, n. 1, p.60-70, 2017.

PÉREZ-SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; YAPU, D.G.; TURBA, A.G. Antiplasmodial Activity of Naphthoquinones Related to Lapachol and β -Lapachone. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 2, p. 264-74, 2005.

RAMA, M.; ANIL KUMAR, N.V.; BALAJI, S. Docking Studies on Leishmanial Trypanothione Reductase. **CT International Journal of Pharmaceutical and Integrated Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 2015.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspectos of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-54, 2009.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROONEY, C.M; NG, C.Y.C.; LOFTIN, S.; SMITH, C.A.; LI, C.; KRANCE, R.A.; BRENNER, M.K.; HESLOP, H.E.; ROONEY, C.M.; BRENNER, M.K.; BRENNER, M.K.; KRANCE, R.A.; HESLOP, H.E. Use of gene-modified virusspecific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. **The lancet**, v. 345, n. 8941, p. 9-13, 1995.

SACAU, E.P.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; FERRO, E.A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory Effects of Lapachol Derivatives on Epstein-Barr Virus Activation. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p.483–488, 2003.

SALAS, C; TAPIA, R.A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, J.D.; MORELLO, A. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.2, p. 668-74, 2008.

SALUSTIANO, E. J. S.; NETTO, C. D.; FERNANDES, R. F.; da SILVA, A. J. M.; BACELAR, T. S.; CASTRO, C. P.; BUARQUE, C. D.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M. & COSTA, P. R. R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4- naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigation of New Drugs**, v. 28, n. 2, p. 139-144, 2010.

SARAVANAMUTHU, A.; VICKERS, T.J.; BOND, C.S.; PETERSON, M.R.; HUNTER, W.N. FAIRLAMB, A.H. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase – a template for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n.28, p. 29493–29500, 2004.

SAÚDE-GUIMARAES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.17, n.3, p.455-465, 2007.

SCHWARTZ, R.A.; JANUZ, C.A.; JANNIGER, C.K. Seborrheic dermatitis: an overview. **American Family Physician**, v.74, n. 1, p.125–30, 2006.

SUNDAR, S; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 593-598, 2002.

TARANTO, A.G.; LACERDA BRAGA TELES, A.L.; QUEIROZ ARAÚJO, J.Q.; ALVES FERREIRA, B.A.; COMAR JR, M. Estudos QSAR e Ancoragem Molecular de Inibidores da Atividade Biológica do Fator de Inibição da Migração dos Macrófagos (MIF). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 437-45, 2012.

TEIXEIRA, M.J.; DE ALMEIDA, Y.M.; VIANA, J.R.; HOLANDA FILHA, J.G. RODRIGUES, T.P.; PRATA, J.R.; COÊLHO, I.C.; RAO, V.S.; POMPEU, M.M. *In vitro* na *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 44-8, 2001.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; DE ANDRADE JR, H.F. Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal Antimicrobial chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60-8, 2004.

THAKUR, C.P. A single high dose treatment of kala-azar with Ambisome (amphotericin B lipid complex): a pilot study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 67-70, 2001.

THOMPSON, M.P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr Virus and Cancer. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 3, p. 803-21, 2004.

URDAPILLETA, A. A. A. **Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis e Leishmania (V.) brasiliensis**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2006.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v.32, n.5, p. 1245-52, 2009.

VENKATESAN, S. K.; DUBEY, V.K. Footprinting of Inhibitor Interactions of In Silico Identified Inhibitors of Trypanothione Reductase of Leishmania Parasite. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-13, 2012

VIANNA, E.N.; MORAIS, M.H.F.; DE ALMEIDA, A.S.; SABROZA, P.C.; REIS, I.A.; DIAS, E.S.; CARNEIRO, M. Abundance of Lutzomyia longipalpis in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302-10, 2016.

YAZDANIAN, M.; GLYNN, S.L.; WRIGHT, J.L.; HAWI, A. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1490-94, 1998.

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. 763-6, 1997.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The Role of pH and Temperature in the Development of Leishmania Parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994.