BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Antimaláricos potenciais: latenciação de primaquina e desetilcloroquina e estudo da sintese de pró-fármacos peptídicos de liberação específica

Kátia Cirlene Alves Botelho

Tese apresentada para a obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2008

Kátia Cirlene Alves Botelho

19276

Antimaláricos potenciais: latenciação de primaquina e desetilcloroquina e estudo da sintese de pró-fármacos peptídicos de liberação específica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
Orientadora/Presidente

1º. Examinador
Profa. Dra. Liliana Marzorati
IQ-USP

2º . Examinador
Chung Man Chin
FCFAR-UNESP

3º. Examinador
Daniela Gonçales Rando

4º. Examinador
Carlota de Oliveira Rangel Yagui
FCF-USP

São Paulo, 09 de outubro de 2008.

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013888

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Botelho, Kátia Cirlene Alves
B748a Antimaláricos potenciais: latenciação de primaquina e desetilcloroquina e estudo da síntese de pró-fármacos peptídicos de liberação específica / Kátia Cirlene Alves Botelho. -- São Paulo, 2008.
156p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Malária I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Este trabalho é dedicado:

Ao meu Vôzinho (in memorian), que foi meu pai, meu exemplo de vida, minha inspiração para não desistir nunca frente aos obstáculos, por me ensinar a maior virtude que é a paciência e por ter me proporcionado os melhores anos de minha vida com sua presença tão doce e afetuosa.

À minha mãe, exemplo de coragem, determinação, força, fé. Com seu estímulo me fez conquistar tudo o que sempre quis. Seu apoio e seu amor me fazem chegar a qualquer lugar. ("... Eu sei que ela nunca compreendeu, Os meus motivos de sair de lá, Mas ela sabe que depois que cresce, O filho vira passarinho e quero voar, Eu bem queria continuar ali, Mas o destino quis me contrariar, E o olhar de minha mãe na porta, Eu deixei chorando a me abençoar...")

Ao meu pai Laércio Botelho (in memorian) que esteve comigo em todos estes anos, mesmo não estando presente de fato, por ter me ensinado desde pequena o sentido de família.

Ao Osvaldo, pela paciência infinita, pelo companheirismo, carinho e por acreditar mais em mim do que eu mesma. Por ter me proporcionado muitos momentos felizes. Amor eterno e inesquecível.

Às minhas irmãs Helâine e Patrícia, ao meu cunhado Marcelo e minhas sobrinhas Mariana, Raphaela e Camila e ao meu sobrinho Alex. Pelo amor, compreensão com tantas ausências, por acreditarem que meu esforço vale a pena, por estarem sempre ao meu lado, mesmo distantes fisicamente.

Ao Pollock e à Pagú, que me fazem querer sempre correr para casa e me receberem com "festa". Filhotes amados como filhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa Elizabeth Igne Ferreira, por ter me dado um sonho a ser realizado, que me ensinou tudo o que sei de Química Farmacêutica, por ser exemplo a ser seguido por qualquer um que queira seguir a carreira acadêmica, por ser mais do que orientadora: ser "mãe" e amiga em todos os momentos. Um obrigado seria pouco para agradecer todo ensinamento, científico ou não, dado.

À minha orientadora de iniciação científica Márcia Laudelina Arruda Temperini, que me ensinou a ter olhos de pesquisadora, pelo carinho, paciência e por ter me ensinado o que é um grupo de pesquisa.

Aos professores: Oswaldo Sala: por me fazer me apaixonar pela iniciação científica, pela paciência exemplar e pelo carinho; Paulo Sérgio Santos: pelos ensinamentos, por ter acreditado no meu potencial e Jonas Gruber que me ensinou as primeiras reações em química orgânica e por seu intermédio me apresentou à Profa Márcia.

Ao Carlos Alberto Brandt, por ter me proporcionado momentos muito agradáveis no laboratório, por seus ensinamentos e conversas tão agradáveis e estimulantes.

Aos profs Carlota, Veni e Michael, este em especial por ter me permitido a dar minhas primeira aulas no curso de graduação da FCF, por me ensinarem sempre, pela paciência na conciliação de trabalho e tese, por aceitarem tão calorosamente minhas sugestões, tanto nas disciplinas quanto com os alunos de iniciação científica.

Aos meus tios, Beth, Silvana, Emerson e Marcelo que carregam o gene do meu querido avô, minha vózinha Conceição e meu querido tio Luiz e primo Tadeu, por estarem comigo em todos os momentos felizes, ou não, por terem me dado os melhores anos de minha vida.

À minha, mais do que querida, amiga "mimosa", Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, por me ouvir sempre, me aconselhar, me ensinar, acreditar no meu potencial. Pessoa "iluminada" e sem igual.

Ao Diogo Teixeira Carvalho que, mesmo distante, é um amigo querido, com conversas sempre inteligentes e agradáveis.

À Michelle Carneiro Polli amiga querida e para todas as horas, por todos momentos de feliz convivência e pela saudade deixada com a ausência.

Ao Roberto Parise Filho que me viu em momentos muito ruins, mas que sempre me incentivou e me tratou com tanto carinho.

Ao Reginaldo Grenzi e Waldirley Dias, por estarem tão presentes em minha vida, por serem amigos incondicionais, por tantos momentos felizes. Uma amizade que nasceu e que será eterna.

À Priscila da Silva Azevedo que me deu oportunidade de ensinar, por sua inteligência, por ter espírito de pesquisadora, pelo carinho, paciência e por toda dedicação ao trabalho em conjunto.

À Daniela Gonçales Rando por tantos momentos vividos no LAPEN, pela convivência, ensinamentos e pela paciência de me ouvir sempre.

A Jeanine Giarolla e Vanessa Otelo por estarem sempre presentes e me deixarem ensinar o pouco que sei, pela paciência e carinho.

Aos amigos de "poucas" mais felizes baladas: Gustavo Trossini e Guilherme Matsutani, "por todo conhecimento do mundo" e pela agradável convivência.

À Franciny Mioto Maeda, Vanesca Fagundes, Priscila Lara Morita e Claudia Scordamaglia pela amizade, carinho, oportunidade de ensinamento, por estarem sempre presentes em minha vida.

À amiga Carla Maria de Souza Meneses por tantas conversas, por todo ensinamento em modelagem, por me ouvir, por acreditar em tudo que faço.

À Márcia da Silva, por ser exemplo de determinação, por me apoiar e estar ao meu lado mesmo distante.

Ao João Paulo dos Santos Fernandes, por compartilhar meus momentos na pós-graduação, por me incentivar, quando me sinto abatida, por me convidar pra bancas de TCC, sempre tão animadoras.

Aos amigos do LAPSFAR: Maité, Carlos Lee, Priscila, Michele, Talita, Sabrina Jardim, Michelle Ortiz, Mauro Júnior e Ana Cláudia pela amizade que persiste e por me deixarem ensinar um pouco do que sei.

Aos amigos do LAPEN: Hamilton, Sun, Carol, Plínio, Janaina, Leonardo, Luciana, Charles e a "agregada" D. Lélia, por tantos momentos felizes no laboratório, são a essência do que vivo hoje: muito aprendizado e momentos agradáveis.

Aos amigos que passaram pelo LAPEN: Nadia, Rita Daniela, Priscila Perrud, Marco Arribas, Hélio, Kátia Solange, que mesmo com caminhos diversos continuam me tratando com tanto carinho.

À Adriana Mendes que me apresentou ao LAPEN, que me fez ver o quão especial é a profa Elizabeth Igne.

À Raquel Delfino pela alegria no trabalho, por conversas animadoras, por estar sempre de bom humor.

À Alessandra, Cilene, Daniella e Majô por terem me permitido me agregar a "ala" acadêmica da FCF e também pelas boas conversas.

Aos colegas da Seção de pós-graduação Elaine e Jorge, por estarem sempre prontos a me auxiliar nas dúvidas.

À Beth, Suzi e Celi pelo auxílio e amizade nestes anos.

Aos amigos que, embora não mencionados, estarão sempre presentes em minhas lembranças.

À CAPES, FAPESP E CNPq pelo auxilio financeiro deste trabalho

"A única coisa que se tem e que realmente vale,
são os sentimentos.
Isto é o que importa para mim."

Janis Joplin

RESUMO

A Malária continua sendo a mais difundida e devastadora doença infecciosa, com aproximadamente 300 milhões de casos anuais e mais de 2 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. Entre os parasitas do gênero plasmodium causadores da malária em humanos, o *plasmodium falciparum* é a espécie mais letal.

Este projeto teve como objetivo a síntese de pró-fármaco recíproco de cloroquina e primaquina e de pró-fármacos duplicados de cloroquina e de primaquina utilizando, para tanto, espaçantes inespecíficos (carboxílicos). Espera-se que o pró-fármaco recíproco permita a cura radical em casos de *malária vivax* e que os derivados duplicados apresentem maior eficácia, com diminuição da toxicidade, especialmente no caso do derivado de primaquina. Além desses compostos, propôs-se a síntese de pró-fármacos duplicados de cloroquina mediante a ligação com grupo espaçante específico (peptídeos) à cisão pela falcipaína. Tais derivados são potencialmente ativos em malária causada pelo *P. falciparum* resistente à cloroquina

ABSTRACT

Malaria remains the world's most widespread and devastating infectious disease, with approximately 300 million annual cases and more than 2 million casualties. Among the protozoan parasites of the genus *Plasmodium* causing malaria in humans, *Plasmodium falciparum* is the most lethal species

This project had as objective the synthesis of reciprocal prodrug of chloroqine and primaquine using, for in such a way, inespecífics agents (carboxylics). One expects that the mutual prodrug allows to the radical cure in cases of malaria vivax and that the derivatives duplicates present greater effectiveness, with reduction of the toxicity, especially in the case of the primaquine derivative. Beyond these composites, it was considered synthesis of mutual prodrugs of chloroquine by means of the linking with specific carrier group (peptides) to the split for falcipain. Such derivatives are potentially active in malaria caused for the resistant *P. falciparum* to the chloroquine

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 04
2.1 Epidemiologia da malária 04
2.2 Custo econômico da Malária 09
2.3 Ciclo Biológico do parasito 11
2.4 Formas clínicas da parasitose 13
2.5 Medidas de controle 14
2.6 Fármacos antimaláricos 15
2.6 Prevenção 25
2.7 Planejamento de antimaláricos potenciais 26
2.7.1 Cisteino proteases 27
2.8 Modificação molecular na introdução de novos fármacos 29
2.9 Planejamento de pró-fármacos antimaláricos de liberação específica 34
2.9.1 Mecanismo de destoxificação do Plasmodium 34
2.9.2 Modelagem molecular 35
2.9.3 Pró-fármacos peptídicos 38
2.9.4 Métodos de síntese de peptídeos 39
2.9.4.1 Síntese química 39
2.9.4.2 Síntese enzimática 42
2.9.4.3 Síntese via DNA recombinante 42
3. OBJETIVOS 43
4. MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 Material 44
4.1.1 Reagentes e solventes 44
4.1.2 Equipamentos 46
4.1.3 Vidraria 47
4.1.4 Softwares para modelagem molecular 47
4.2 Métodos de Síntese 48
A. SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS NÃO PEPTÍDICOS 48
4.2.1 Obtenção da cloroquina base livre 48
4.2.2 Síntese de intermediários (grupos espaçantes) 48
4.2.2.1 Síntese de 4-cloro-4oxo-butanoato de metila 48

4.2.2.1.1 Preparação do metóxido de sódio 48
4.2.2.1.2 Preparação do sal sódico do monossuccinato de metila 48
4.2.2.1.3 Síntese do cloreto de 4-cloro-4-oxobutanoato de metila 49
4.2.2.1.4 Síntese do dicloreto de succinoíla 50
4.2.3 Estudos de acilação da cloroquina 50
4.2.3.1 Método 1: 4-cloro-4-oxobutanoato de metila 50
4.2.3.2 Método 2: Reagente de Grignard 52
4.2.3.3 Método 3: butil-lítio 53
4.2.3.4 Método 4: sal fosfônio de piridina 53
4.2.3.5 Método 5: novoldiamina acilada 53
4.2.4 Estudos de síntese do derivado de duplicação molecular da cloroquina 54
4.2.4.1 Método 1: trifenilfosfina 55
4.2.4.2 Método 2: dicloreto de succinoíla 55
4.2.4.3 Método 3: ácido succínico 56
4.2.4.4 Método 4: hidreto de sódio 56
4.2.4.5 Método 5: fusão 56
4.2.4.6 Método 6: fusão em microondas 57
4.2.4.7 Método 7: ultrassom 58
4.2.5 Estudos de síntese do derivado de duplicação molecular a partir da desetilcloroquina(DECQ) 59
4.2.5.1 Síntese de desetilcloroquina 59
4.2.5.1.1. Método 1: HBr 59
4.2.5.1.2 Método 2: I2 59
4.2.5.1.3 Método 3: cloroformato de etila 60
4.2.5.1.4 Método 3: NaH e cloroformato de etila 60
4.2.6 Síntese de succinildesetilcloroquina 61
4.2.7 Estudos de síntese de pró-fármaco derivado de duplicação molecular da desetilcloroquina 62
4.2.8 Síntese de pró-fármaco derivado de duplicação molecular da primaquina 62
4.2.8.1 Método 1: dicloreto de succinoíla 62
4.2.8.2 Método 2: succinilprimaquina e primaquina 63
4.2.8.2.1 Síntese da succinilprimaquina 63

4.2.8.2.2 Pró-fármaco derivado da duplicação molecular da primaquina 64
4.2.8.3 Método 3: ácido succínico 64
4.2.9 Síntese do pró-fármaco recíproco desetilcloroquina-succinilprimaquina 65
B. ESTUDOS DE SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS PEPTÍDICOS 65
4.2.10.Síntese dos peptídeos 65
4.2.10.1 Síntese de aminoácidos protegidos 65
4.2.10.2 Síntese de peptídeos – método clássico 69
4.2.10.2.1 Síntese do peptídeo Boc-Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe 69
4.2.10.2.2 Síntese do peptídeo alanilfenilalanina (Ala-Phe) protegido 70
4.2.10.2.3 Síntese do peptídeo leucina-fenilalanina (Leu-Phe) 71
4.2.10.2.4 Desproteção do grupo BOC dos peptídeos formados 72
4.2.10.3 Síntese de peptídeos – em fase sólida (SPFS) 72
4.2.11 Estudo de síntese dos pró-fármacos peptídicos 74
4.2.11.1 Desetilcloroquina-alanilfenilalanina (DECQ-AlaPhe) 74
4.2.11.2 Estudos de síntese do pró-fármaco succinildesetilcloroquina-alanilfenilalanina (SDECQ-AlaPhe) 75
4.2.11.3 Estudos de síntese do pró-fármaco desetilcloroquina-leucina-fenilalanina (DECQ-LeuPhe) 76
4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) 77
4.4 Método de Modelagem Molecular 77
4.5 Método de Docking 78
4.6 Métodos Analíticos 79
4.6.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de hidrogênio (RMN 13C e 1H) 79
4.6.2 Espectrometria de absorção no infravermelho 79
4.6.3 Faixas de Fusão 79
4.6.4 Cromatografia em Camada Delgada 79
4.6.5 Cromatografia líquida de alta eficiência 80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 81
5.1 Síntese do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila 83
5.2 Síntese do dicloreto de succinoíla 88
5.3 Síntese dos pró-fármacos recíproco e duplicados 90

5.3.1 Derivados de cloroquina 90
5.4 Derivado de desetilcloroquina (DECQSucDECQ) 106
5.5 Derivado de primaquina 110
5.6 Pró-fármacos peptídicos 115
5.7 Síntese dos peptídeos 124
5.8 Docking 133
6. CONCLUSÕES 138
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 139

1. INTRODUÇÃO

De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), parasitos representam a maior causa de morte humana em relação a qualquer outra doença, perdendo apenas para AIDS e tuberculose (WHO, 2008).

A malária é uma das doenças parasitárias mais graves e complexas da humanidade nos tempos recentes. É transmitida ao homem pela picada do mosquito do gênero *Anopheles.* Causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, atinge principalmente as regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2008; WINSTANLEY, WATKINS, 1992).

A doença é endêmica em aproximadamente 109 países, mas está restrita principalmente a países pobres da África, Ásia e América Latina. Cerca de 90% dos casos de malária e a maioria das mortes ocorrem na África Sub-Saariana. Estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas estejam em risco de infecção e que, aproximadamente, 1.000.000 morram, anualmente (WHO, 2008; SIRI *et al.*, 2008).

No Brasil, a malária constitui uma das principais doenças endêmicas. Apesar de extensas áreas do País estarem praticamente desprovidas e livres de transmissão, ela ainda persiste, de forma intensa, em muitas regiões, especialmente na Amazônia Legal (Brasil. Ministério da Saúde, 2005). Fatores sócio-econômicos aliados às condições climáticas particulares da Amazônia têm sido responsáveis pelo aumento de casos nos últimos anos, especialmente em 1999, com mais de 630 mil casos registrados (BRASIL, 2005).

O tratamento e o controle tornaram-se mais difíceis com a expansão dos casos de parasitos resistentes aos fármacos amplamente utilizados (GREENWOOD, 2004; TRIGG, KONDRACHINE, 1998) e de vetores resistentes aos inseticidas usuais (WHO, 2008).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Além disso, a toxicidade dos fármacos utilizados na terapêutica também limita os seus usos. Existem pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de vacinas para parasitoses como a malária, mas apesar dos avanços conseguidos na última década, ainda não se têm resultados satisfatórios para a produção em larga escala. Estas são razões pelas quais muitos estudos devem ser realizados à procura de fármacos alternativos, que possuam bom espectro de ação, boa tolerabilidade e que não sejam tóxicos, para se alcançar a cura definitiva (GREENWOOD, 2004).

O planejamento racional de novos fármacos, embora seja método bastante atrativo, é economicamente oneroso e exige longo tempo para avaliar a segurança do novo medicamento. Em doenças como a malária, que acometem pessoas de baixo poder aquisitivo, a viabilidade na produção de novos medicamentos torna-se ainda menor, pois não é processo economicamente atrativo para as indústrias farmacêuticas. Assim, segue-se uma das recomendações da OMS em se proceder alterações nos fármacos já existentes com a finalidade de se obter melhorias nas propriedades, na atividade e no desempenho do fármaco no organismo (WHO, 2008).

Uma das formas de se otimizar fármacos já existentes na terapêutica é aumentar sua afinidade pelo alvo molecular. Atualmente, tem se observado interesse no estudo de proteases parasitárias, visto que tais substâncias estão sendo exploradas como alvos potenciais para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (CHUNG, 2005; ROSENTHAL, 2003).

A falcipaína é uma cisteíno-protease presente no plasmódio, que mostrou a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, que apresentam, na posição P_1, resíduos de arginina e lisina e, na posição P_2, resíduos de leucina e fenilalanina. Tal propriedade pode ser explorada para a obtenção de fármacos antimaláricos mais seletivos

(NORTH *et al.*, 1990; SHENAI *et al.,* 2000). Estudos recentes em biologia molecular da enzima indicam ainda a preferência por aminoácidos como alanina e cisteína (SABNNIS, 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da malária

A malária continua sendo uma das mais graves e disseminadas doenças causadas por protozoários que afetam o homem. Apresentando-se em vastas regiões como endemia, representa ameaça para milhões de indivíduos em países não-desenvolvidos ou em desenvolvimento. Aproximadamente 40% da população mundial vivem em áreas endêmicas para a malária (WHO, 2008).

Reconhecendo o papel da malária em prejudicar o desenvolvimento econômico, muitas organizações de saúde uniram esforços para o controle da doença após a II Guerra Mundial. A partir de 1948, a Organização Mundial da Saúde foi envolvida na coordenação internacional de campanhas antimaláricas. Contudo, em muitas regiões verificou-se que o êxito na erradicação não era tão fácil de ser alcançado. Como se antecipara, dificuldades financeiras, imperfeições nas estruturas organizadoras, assim como as particularidades regionais provocaram, novamente, forte impacto epidemiológico da parasitose. Além disso, obstáculos técnicos, tais como a resistência dos vetores aos inseticidas e a desenvolvida por cepas de parasito aos antimaláricos disponíveis, adicionados à movimentação de populações, agravaram ainda mais os índices da infecção (JAMES, GUILLES, 2000).

Existem quatro espécies de parasitos da malária responsáveis pela infecção humana: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale.* Dentre estes agentes etiológicos o *P. vivax* é a espécie mais amplamente disseminada em todo o mundo, encontrando-se em quase todas as regiões onde a malária é endêmica (REY, 2001).

A doença é transmitida ao homem por mosquitos do gênero *Anopheles*, representado na figura 1.

Figura1: Mosquito *Anopheles*

http://www.who.int./tdr/diseases/malaria

A fonte de infecção é geralmente considerada como específica ao homem, sendo possível que primatas possam servir como reservatório animal para *P. malariae* na África tropical. No entanto, tal fonte é de limitada importância epidemiológica (COLLINS, PASKEWITZ, 1995; NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECCTIONS DISEASES, 1998; TAKAKURA, HASHIDA, 1995). A transmissão direta ocorre ocasionalmente por meio do uso de sangue contaminado em transfusões, transplantes de órgãos infectados ou pelo uso de seringas contaminadas (SIRI,2008).

Aproximadamente 1,5 a 2,7 milhões de pessoas morrem desta doença a cada ano, especialmente no continente africano. A maioria destes óbitos acomete crianças – em torno de um milhão de óbitos de menores de 5 anos de idade (DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASE WHO, 2008; SIRI, 2008). Em outras palavras, falecem de malária nesse continente 2 crianças por minuto, 1440 por dia e 10.080 por semana (WHO, 2008).

A Figura 2 mostra a situação da malária no plano mundial.

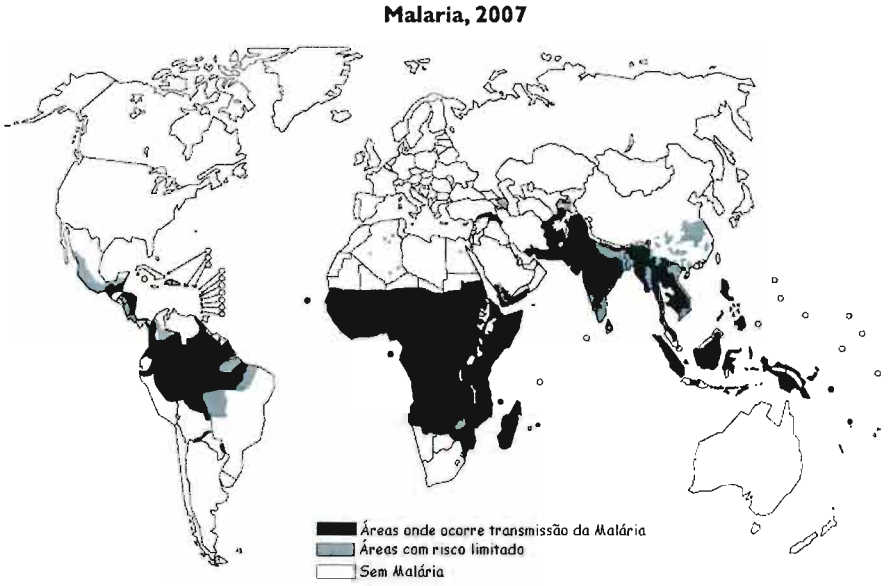


Figura 2 – Situação mundial da malária (WHO, 2008).

Adaptado de: http://www.who.int/ith/maps/malaria2007.jpg

No Brasil, mais de 60% do território possui condições de transmissão da malária ou está em franca fase de transmissão da doença, cuja área endêmica original corresponde a 6,9 milhões de km^2 (WHO, 2008). Aproximadamente 99% dos casos se concentram na região Amazônica (Acre, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), na qual as condições sócio-econômicas e ambientais favorecem a proliferação do mosquito do gênero *Anopheles* e, conseqüentemente, a exposição de grandes contingentes populacionais. O risco de contrair a doença não é, contudo, uniforme nesta região. Este risco é medido pela Incidência Parasitária Anual (IPA), que corresponde à quantidade de lâminas positivas dividida pela população sob risco e multiplicada por uma constante, geralmente 1000. As áreas endêmicas são classificadas como de transmissão alta, média e de baixo risco, de acordo com a IPA (Figura 3). (BRASIL, 2005).

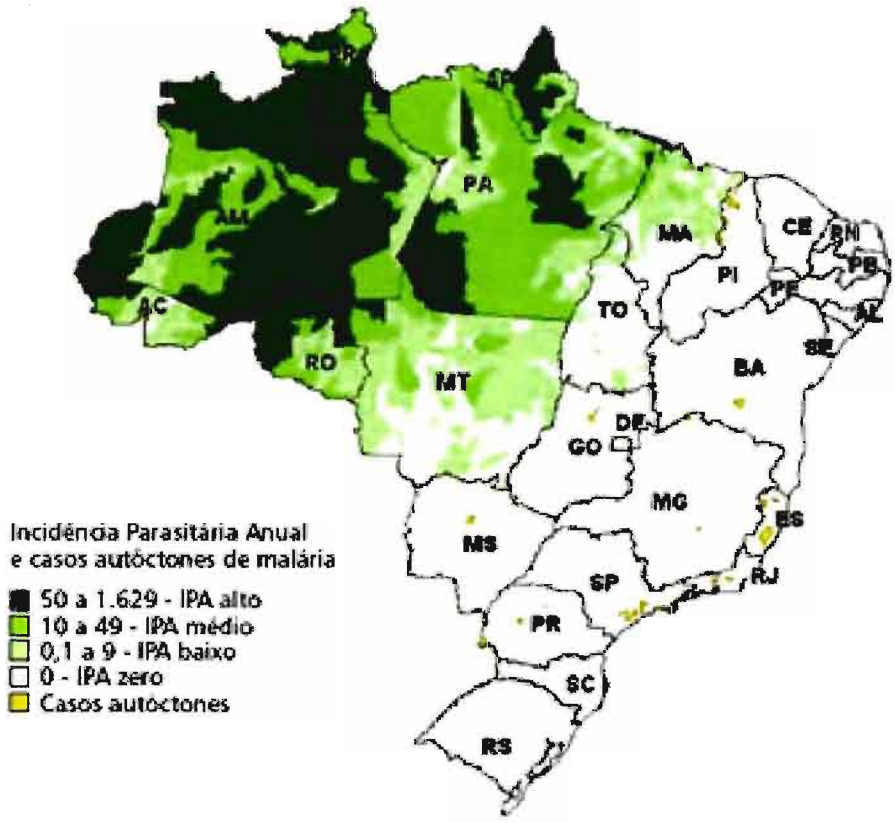


Figura 3 – Mapa de risco de transmissão da malária no Brasil, 2007.

(http://portal.saude.gov.br)

Segundo registros da evolução temporal das doenças de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde, o risco de transmissão da malária tem aumentado, mantendo-se em níveis muito superiores a 1970, quando foram observados 3,9 casos por mil habitantes na região Amazônica. Nos anos de 1999, 2000 e 2001 a incidência parasitária anual (IPA) na região foi de 31,9, 30,3 e 18,8 casos por mil habitantes, respectivamente.

Na região extra-Amazônica notifica-se, apenas, 1% do total de casos de malária no Brasil. Destes, 92% são importados dos Estados da área endêmica e de países da África (WHO, 2008).

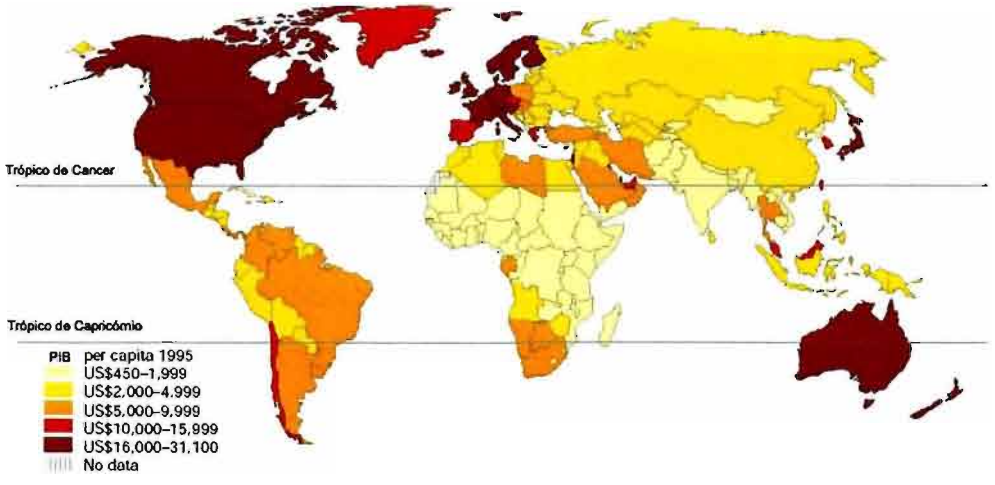
A partir de 1992, o Brasil colocou em prática a estratégia global de controle integrado – "uma ação conjunta e permanente do governo e da sociedade, dirigida para a eliminação ou redução de riscos de adoecer ou morrer de malária" – conforme recomendação da Conferência Ministerial de Amsterdã (LOIOLA, SILVA E TAUIL, 2002). Esta estratégia visa prevenir a mortalidade, reduzir a morbidade e aliviar as perdas sociais e econômicas produzidas pela malária, mediante o fortalecimento dos níveis regional e local de atenção à saúde.

Estes objetivos devem ser alcançados pelo diagnóstico precoce e tratamento imediato dos casos, assim como pelo uso de medidas seletivas contra vetores, pela detecção oportuna de epidemia e avaliação regular da situação local da malária através do monitoramento dos fatores de risco. Em muitos países, inclusive no Brasil, seguindo recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a partir de 1992 os antigos programas de erradicação da malária transformaram-se em programas de controle da doença. Não só mudaram seus objetivos como também a metodologia e a estratégia de sua aplicação. A atenção ao doente passou a ser o objetivo fundamental do programa, procurando-se evitar a mortalidade e a gravidade da doença, por meio de ampla oferta de diagnósticos e de tratamento (LOIOLA, SILVA E TAUIL, 2002).

2.2 Custo econômico da Malária (SACHS, MALANEY, 2002; ROLLBACK MALARIA, 2001)

A malária, além de afetar a saúde dos países, afeta a economia individual. Os custos da malária podem ser medidos de forma direta ou indireta. Tem-se comprovado, recentemente, que a malária é a maior restrição ao desenvolvimento econômico dos países africanos.

Economistas acreditam que a malária é responsável por perda de 1,3% ao ano em crescimento econômico, em alguns países africanos. Ao longo dos anos, essa falta de crescimento econômico leva a substancial diferença no Produto Interno Bruto (PIB) (Figura 4) de países com e sem malária e à graves restrições em toda região. Os custos diretos da malária incluem a combinação de gastos particulares e públicos, com a prevenção e o tratamento da doença.



Os gastos particulares incluem os familiares ou individuais, com a aquisição de telas tratadas com inseticidas, consultas médicas, fármacos antimaláricos, transporte para postos de saúde, assistência para os pais e algumas vezes para algum membro da família durante a estadia do paciente no hospital. Os gastos públicos incluem o desembolso do governo na manutenção dos postos de saúde e infra-estrutura para cuidados médicos, controle público dos vetores, educação e pesquisas.

Os custos indiretos da malária incluem perda de produtividade ou perdas associadas com a doença ou a morte. Isto pode ser expresso como custo devido a dias não trabalhados ou faltas no emprego formal e ao valor do trabalho não remunerado feito em casa, de homens e mulheres. No caso de morte os custos indiretos incluem o desconto feito sobre os valores que a pessoa ganharia ao longo de toda sua vida produtiva.

O impacto econômico que a malária produz na África, porém, é maior do que uma simples falta de recurso. É difícil expressar em dinheiro ou outro custo indireto a dor e o sofrimento causados pela doença. A simples presença da malária em uma comunidade ou país impede a prosperidade individual ou nacional e influencia nas decisões sociais e econômicas. O risco de contrair a doença nas áreas endêmicas pode deter um investimento interno ou externo e afetar, com isto, decisões individuais e domésticas provocando, de qualquer uma das maneiras, o impacto negativo sobre a produtividade econômica e o crescimento. Alguns exemplos incluem:

- A indústria de turismo não se desenvolve pela relutância que os viajantes têm em visitar áreas endêmicas;
- Os mercados não se desenvolvem devido à falta de vontade dos investidores em viajar e investir em áreas endêmicas;

- A preferência individual dos fazendeiros locais em plantar culturas de subsistência ao invés de cultivos intensivos com retorno rápido.

2.3 Ciclo Biológico do parasito

Do mesmo modo que os parasitos da classe *Sporozoa*, as espécies do gênero *Plasmodium* produzem um esporo resistente (oócito), que contém esporozoítos capazes de sobreviver a estados de transição de um hospedeiro a outro (TUTEJA, 2007; MILLER *et al.*, 2002).

O ciclo de vida de todas as espécies que afetam o homem é essencialmente o mesmo (Figura 5) e consiste de uma fase sexuada exógena (esporogônica) no mosquito e uma fase assexuada endógena (esquizonte) no homem. Por sua vez, a última fase consiste de dois ciclos de desenvolvimento, um no parênquima hepático (exoeritrocítico) e o outro nos eritrócitos (eritrocítico) (TUTEJA, 2007; REY, 2001).

A transmissão da doença ao homem é causada pela picada do mosquito anofelino-fêmea infectado, o qual contém nas suas glândulas salivares esporozoítos. Os esporozoítos inoculados desaparecem rapidamente do fluxo sanguíneo do hospedeiro e alguns alcançam as células do parênquima hepático nas quais sofrem o ciclo pré-eritrocítico (esquizogonia exoeritrocítica). Os esquizontes teciduais desenvolvidos liberam no sangue grande quantidade de merozoítos quando o ciclo é completado. Em infecções causadas por *P. falciparum* e *P. malariae* o ciclo exoeritrocítico termina nesta etapa, enquanto que nas outras duas formas de malária, uma parte de esporozoítos permanece no parênquima hepático em estado latente (hipnozoítos), responsável pela reincidência da infecção (TUTEJA, 2007; REY, 2001).

Nenhuma manifestação clínica é observada durante a liberação de merozoítos do parênquima hepático ao fluxo sanguíneo. Quando os merozoítos penetram nos eritrócitos se transformam em trofozoítos, iniciando um período de ativo crescimento e diferenciação (esquizogonia assexuada). Estas formas do parasito completam seu desenvolvimento rapidamente, levando à ruptura do esquizonte sanguíneo com a liberação de merozoítos, o que produz ataque de febre no hospedeiro. Os merozoítos liberados são capazes de infectar outros eritrócitos e este processo de esquizogonia é repetido em ciclos sucessivos. Após repetidos ciclos, alguns trofozoítos sofrem diferenciação a gametócitos, os quais não se dividem e podem ser diferenciados morfologicamente das outras formas. Os gametócitos são as formas que infectam o vetor, dentro do qual formam um zigoto e iniciam a esporogonia (TUTEJA, 2007; REY, 2001).

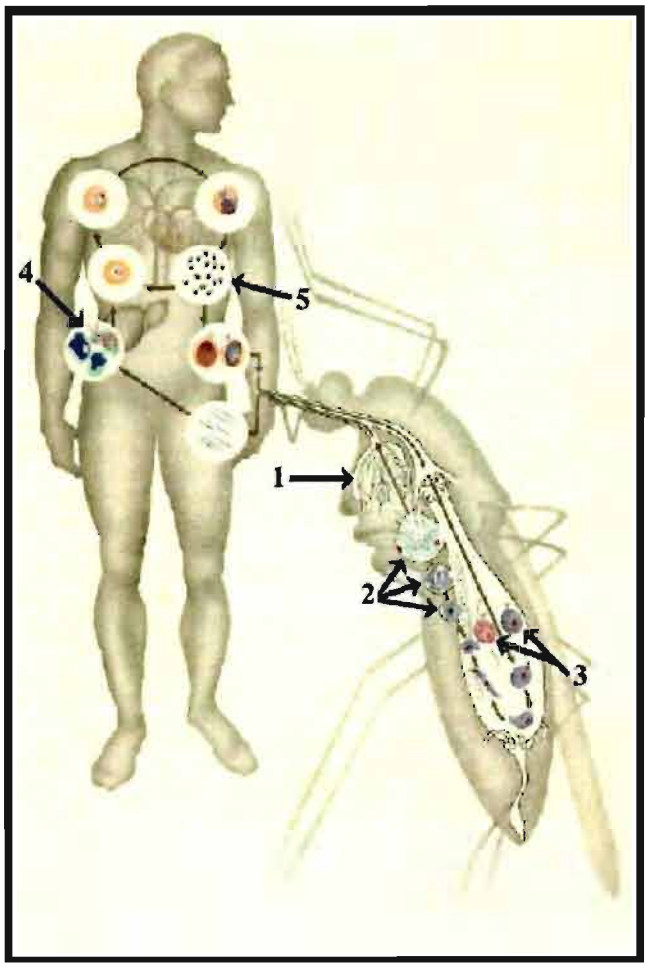


Figura 5 – Ciclo de vida do parasito da malária: 1 - esporozoítos na glândula salivar do mosquito; 2 – oocistos na parede do estômago do mosquito; 3 – gametócitos masculinos e femininos; 4 – fase hepática no homem; 5 – saída dos merozoítos do fígado, seguida de ataque aos eritrócitos, nos quais continuam os ciclos sexuado e assexuado de reprodução. (Fonte: http://www.rph.wa.gov.au/malaria/)

2.4 Formas clínicas da parasitose

Característica particular da infecção é a periodicidade dos ataques de febre determinada pela duração do ciclo eritrocítico. A ruptura do esquizonte sanguíneo e a liberação dos merozoítos ocorrem a cada 48 horas em todas as infecções maláricas, exceto para a causada por *P. malariae,* que ocorre a cada 72 horas. Nesta periodicidade baseou-se a primeira terminologia de "terçã" e

"quartã", referindo-se aos episódios de febre cada 2 ou 3 dias, seguidos do ataque inicial. Atualmente, é mais comum denominar a doença segundo a espécie do parasito infectante: malária *falciparum* ou malária *vivax* substituíram os antigos termos de terçã maligna e benigna, respectivamente (TUTEJA, 2007; JAMES, GUILLES, 2000).

Outras características clínicas que diferenciam as infecções maláricas são: gravidade dos sintomas, periodicidade do ataque inicial e a possibilidade de recorrência. As recorrências são de dois tipos: o primeiro, como resultado da persistência de formas latentes teciduais, denominado recaída "verdadeira" e o segundo, como resultado da persistência de formas eritrocíticas residuais, denominado recrudescência. As quatro espécies responsáveis pela malária humana podem recrudescer, porém somente *malária vivax* e *ovale* podem levar à recaída (JAMES, GUILLES, 2000).

O *P. falciparum* é o mais patogênico das quatro espécies. Os sintomas da infecção são febre, enxaqueca e mal-estar geral após um período de 9 a 14 dias de incubação. A periodicidade dos sintomas é menos definida do que com as outras formas de malária devido à sobreposição de ciclos eritrocíticos. O tratamento deve-se iniciar com rapidez para prevenir o desenvolvimento de malária cerebral (BOUREE, 2006).

2.5 Medidas de controle

As medidas de controle de parasitoses visam à redução contínua da prevalência da doença em regiões endêmicas, até atingir sua erradicação, assim como evitar sua disseminação em áreas livres da doença. A estratégia formulada para alcançar esses objetivos inclui três medidas básicas: educação à população para a redução: de contato vetor-homem, da densidade do vetor e do parasito do

reservatório humano através do uso de vacinas e de fármacos antiparasitários (JAMES, GILLES, 2000).

Os resultados obtidos com os programas aplicados para o controle da malária têm demonstrado que o mosquito infectado não é de grande importância, embora possa trazer alguma conseqüência em áreas pequenas. O indivíduo infectado é que se constitui no principal veículo da doença.

Neste sentido o desenvolvimento de vacinas e fármacos antimaláricos de amplo uso adquire grande importância. Contudo, a obtenção de vacinas tem sido dificultada pela complexidade antigênica das diferentes formas do parasito segundo o estágio de seu ciclo de vida (BOUREE, 2006; KOLATA, 1992). Os esforços devem ser dirigidos para obtenção de vacina ativa contra cada estágio do ciclo de vida do parasito, que, aplicada em mistura, confira imunidade ao hospedeiro (BOUREE, 2006, MILLER, 1992). A obtenção de vacina eficaz representaria nova arma de combate à malária, que, combinada com medidas sanitárias, inseticidas e fármacos, propiciaria a sua erradicação.

2.6 Fármacos antimaláricos

Os antimaláricos podem ser classificados de diferentes maneiras: de acordo com suas características químicas, farmacológicas, seu local de ação no ciclo biológico do parasito, finalidades e seus modos de obtenção, entre outras (Figura 6).

Em termos práticos, as classificações dos fármacos antimaláricos segundo suas características químicas e segundo o local de ação no ciclo biológico do parasito são muito úteis e as mais empregadas (OLUMESE, 2006; JAIN *et al.*, 2005; WIESNER *et al.*, 2003, TRACY, WEBSTER Jr,1996). Estas são apresentadas como segue:

a) classificação dos antimaláricos segundo seu grupo químico em: arilaminoálcoois (*quinina, mefloquina e halofantrina*), 4-aminoquinolinas (*cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina*), 8-aminoquinolinas (*primaquina*), peróxido de lactona sesquiterpênica (*derivados da artemisinina*), naftoquinonas (*atovaquona*) e antibióticos (*tetraciclina, doxiciclina e clindamicina*).

b) classificação dos antimaláricos segundo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasito em: esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas (cura radical *P. vivax*), esquizonticidas sangüíneos (promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueiam a transmissão) e esporonticidas (impedem a infecção pelos esporozoítos). Até o momento nenhum fármaco deste último grupo é disponível para uso humano.

A quimioterapia adequada e oportuna previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária. Além disso, o tratamento elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (KOROLKOVAS, 1988).

Existem duas formas de tratamento contra a malária: *tratamentos supressivos,* que têm por objetivo a eliminação de formas eritrocíticas assexuadas, com o desaparecimento das manifestações clínicas, e o *tratamento radical*, cujo objetivo é a eliminação de todas as formas do parasito no hospedeiro, evitando recidivas e infecção dos mosquitos vetores.

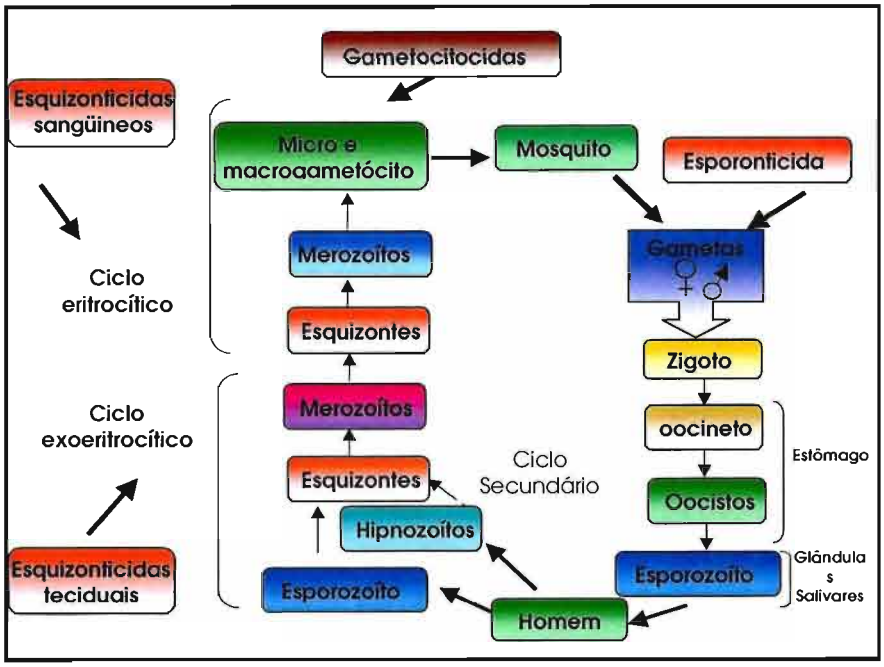


FIGURA 6- Ação dos fármacos antimaláricos de acordo com a fase do ciclo do *Plasmodium* (FERREIRA. 2005).

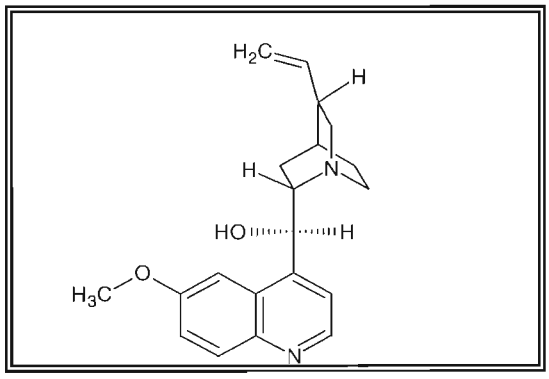


Figura 7 – Estrutura química da quinina.

A *quinina*, figura 7, um produto natural extraído da *Cinchona sp*, foi o primeiro fármaco utilizado contra a malária, introduzido no século XVII. Ainda é eficaz, porém muito tóxico. Foi utilizada como fármaco de escolha no tratamento e prevenção até 1942, quando surgiu a cloroquina. Com o aparecimento de resistência à cloroquina, quinina e artemeter têm sido as melhores opções para o tratamento de alguns tipos de malária hoje. Em países aonde a resistência à

quinina vem se desenvolvendo, ela é usada em associação com outros fármacos, como tetraciclina e clindamicina (OLUMESE,2006; BUNDGAARD,1991).

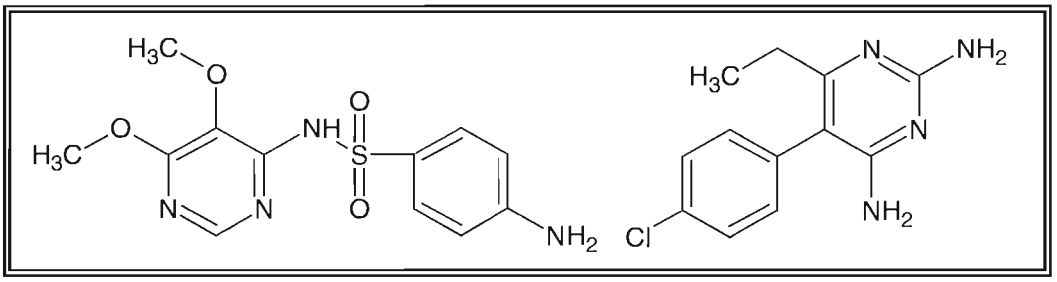


Figura 8 – Estrutura química da sulfadoxina/pirimetamina (FANSIDAR®).

A associação *sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®*, figura 8*)* foi desenvolvida na década de 1960. Apesar da resistência a este fármaco ser elevada no Sudeste Asiático e em parte da América do Sul, ele tornou-se o principal tratamento em alguns países africanos, quando a resistência à cloroquina se espalhou. Hoje, é a terapia de escolha oficial em Malawi e Quênia e em crianças que apresentam resistem à cloroquina (OLUMESE, 2006; WIESNER *et al*,2003; BJORKMAN, PHILLIPS-HOWARD, 1991).

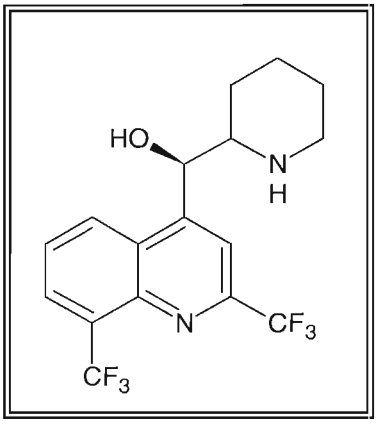


Figura 9 – Estrutura química da mefloquina.

A *mefloquina*, figura 9, foi desenvolvida pelo exército americano no início da década de 1980. A resistência à ela foi observada desde o

começo, particularmente no Camboja. Existem, ainda, casos relatados de alguns efeitos colaterais, como tontura e náusea (OLUMESE, 2006; KARBWANG, WHITE, 1990).

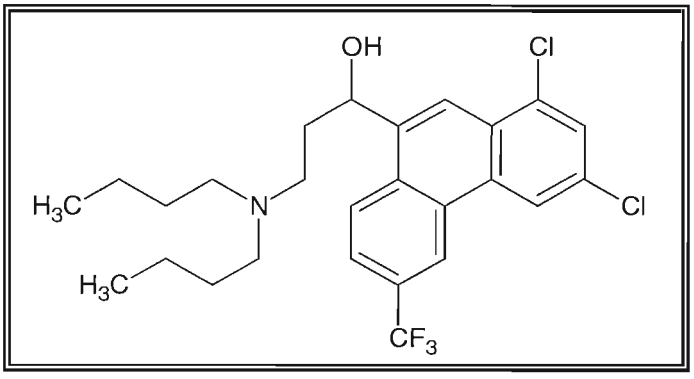


Figura 10 – Estrutura química da halofantrina.

A *halofantrina*, figura 10, também foi desenvolvida pelo exército americano na década de 1990 (WIESNER *et al*, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALARIA IN AFRICA: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FOR COOPERATION, 1998). Resistência cruzada com mefloquina e efeitos colaterais, às vezes graves, têm sido observados. O tratamento com este fármaco é relativamente custoso e seu uso pela saúde pública é impraticável.

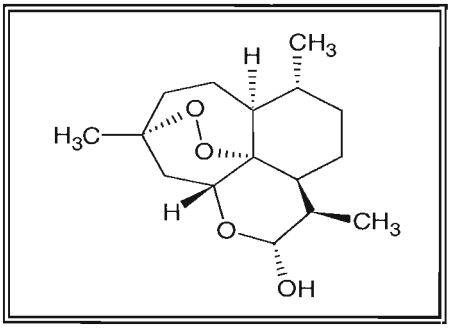


Figura 11 – Estrutura química da Artemisinina.

As *artemisininas*, figura 11, incluem uma família de produtos. Os dois compostos mais usados são o artemeter e o artesunato, principalmente no Sudeste Asiático (OLUMESE, 2006;

INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALARIA IN AFRICA: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FOR COOPERATION, 1998). Em países desenvolvidos esses fármacos não são utilizados devido à provável toxicidade. Devido à elevada quantidade de tratamentos mal-sucedidos, as artemisininas são agora associadas com mefloquina, sendo esta combinação muito eficaz (WIESNER *et al*, 2003; WONGSRICHANALAI, 2002).

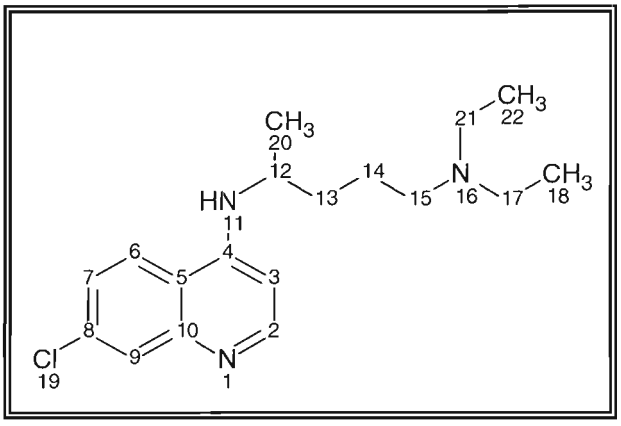


Figura 12 – Estrutura química da cloroquina.

A *cloroquina*, figura 12, foi muito utilizada nos anos 1940. Os primeiros casos de resistência foram encontrados na América do Sul e Sudeste Asiático, na década de 1960 e agora se mostra quase ineficaz em todas as regiões acometidas (WIESNER *et al*, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALARIA IN AFRICA: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES FOR COOPERATION, 1998). Entretanto, é, ainda, o antimalárico mais usado, principalmente na África, devido a seu baixo custo - em alguns países este valor é menor que US$ 0,10 por comprimido, sendo produzida por todas as maiores indústrias farmacêuticas (WIESNER *et al.*, 2003).

A cloroquina é esquizonticida sangüíneo altamente eficaz, para casos em que não há resistência, sendo utilizada para prevenir ou interromper crises de malária por *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou

P. falciparum sensíveis. Além disso, mostra-se moderamente eficaz contra gametócitos de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, mas não contra os de *P. falciparum*. Não é ativa contra os plasmódios pré-eritrocíticos e não produz curas radicais de infecções causadas por *P. vivax* ou *P. ovale*, visto que não elimina os estágios hepáticos persistentes destes parasitos (KATZUNG, 1995).

Existem várias propostas para o mecanismo de ação da cloroquina, uma das hipóteses é que ela pode atuar ao bloquear a síntese enzimática de DNA e RNA tanto nas células dos mamíferos quanto nos protozoários ao formar um complexo com o DNA que impede a sua replicação ou transcrição em RNA. No interior do parasito, o fármaco concentra-se nos vacúolos e aumenta o pH dessas organelas, interferindo na capacidade do parasito de metabolizar e utilizar a hemoglobina do eritrócito. Foi também sugerida a possível interferência com o metabolismo dos fosfolípideos no interior do parasito. A toxicidade seletiva para os parasitos da malária depende de um mecanismo de concentração da cloroquina no interior das células parasitadas. A concentração do fármaco nos eritrócitos normais é 10-20 vezes a do plasma; nos eritrócitos parasitados, a concentração é cerca de 25 vezes a dos normais (OLLIARO,2001).

Uma segunda hipótese consiste no acúmulo de cloroquina dentro do parasito, devido ao gradiente de pH entre o meio extracelular e o vacúolo digestivo. Cloroquina é uma base fraca diprótica, capaz de atravessar membranas do eritrócito na forma de base livre, sendo protonada no vacúolo digestivo do parasito, o qual apresenta característica ácida (pH 5–5,2). O fármaco protonado torna-se impermeável à membrana e se acumula no interior do parasito (HAWLEY *et al.*, 1996b). O acúmulo desta base fraca provocaria aumento temporário de pH no compartimento acídico, causando inibição de enzimas vacuolares participantes do processo de

digestão de hemoglobina (ZARCHIN *et al.*, 1987). Estudos têm indicado que a difusão passiva é suficiente para explicar a cinética de acúmulo da cloroquina (KROGSTAD *et al.*, 1987). No entanto, estudos posteriores (SANCHEZ *et al.*, 1997) mostraram que a entrada da cloroquina é suportada por mecanismo mediado por carreador, implicando transportador de troca de Na^+/ H^+. Tal transportador da membrana plasmática do parasito está envolvido com entrada de prótons gerados durante a glicólise (BOSIA *et al.*, 1993). A proposta para a cloroquina é que ela se liga no sítio do Na^+, sendo transportada para o interior, onde ocorre a troca por prótons. Tal hipótese foi corroborada através de constatação de que 5-(*N*-etil-*N*-isopropil)amilorida apresentou interação com sítio de ligação ao Na^+ no transportador, inibindo acúmulo de cloroquina, de forma competitiva e dependente da dose (BOSIA, 1993).

Uma terceira hipótese de mecanismo de ação e também mais aceita atualmente, está relacionada ao grupo heme de fundamental importância no ciclo biológico do parasito. Acredita-se que ocorra interação da cloroquina com o grupo heme (hematina) impedindo a heme-polimerase de atuar e formar hemozoína, tóxica ao hospedeiro. Não havendo polimerização ocorre acúmulo de hematina que é tóxica ao parasito (OTELO, 2007; FITCH, 2004). Este processo de destoxificação do *Plasmodium* encontra-se no item 2.9.1

Outra hipótese para o mecanismo de ação seria a capacidade de degradação da hemoglobina pelas cisteíno-proteases, que será discutida em item subseqüente.

A relação estrutura-atividade mostra que: se for introduzido um grupo metila no carbono 3 do anel quinolínico, a atividade é reduzida; caso essa substituição ocorra no carbono 8, não haverá este problema. Para aumentar a ação deve ser introduzido um átomo de halogênio na posição 8. Outros grupos introduzidos no anel aromático

reduzem a atividade. Por outro lado, a presença de hidroxilas na cadeia lateral diminui a toxicidade e aumenta a concentração sérica (OLUMESE, 2006; Olliaro, 2001).

A cloroquina apresenta carbono quiral, portanto, possui dois enântiomeros: o isômero (+) é cerca de três vezes mais ativo contra o *P. vinckei* que o isômero (-). Não se provou a correlação entre os dois enântiomeros com o DNA e a atividade antimalárica, uma vez que a cloroquina interage com mais eficiência com DNA rico em guanina e citosina, enquanto o genoma do *Plasmodium* é rico em bases adenina e timina (RIDLEY *et al.*, 1991).

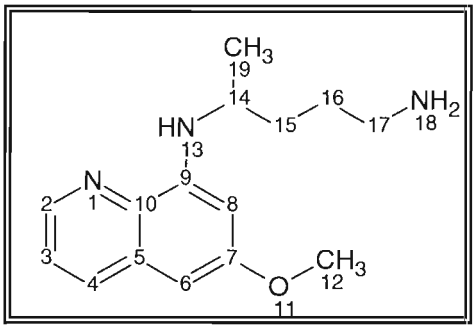


Figura 13 – Estrutura química da primaquina.

A *primaquina*, figura 13, é o único fármaco da família das 8-aminoquinolinas presentemente utilizado na luta contra a malária. Possui um anel bicíclico heteroaromático (grupo quinolíníco), substituído na posição 8 com um grupo amino secundário ao qual se liga uma cadeia alifática, e por um grupo metoxila na posição 6, característico da primaquina. Resultou de um programa cooperativo destinado à obtenção de fármacos antimaláricos, desenvolvido nos Estados Unidos durante a Segunda Guerra Mundial. Esse fármaco apresenta grande importância clínica em malária. (OLUMESE, 2006; WIESNER *et al*, 2003; OLLIARO, 2001)

A primaquina tem elevado poder gametocitocida sobre todos os quatro principais tipos de *Plamodium*, prevenindo a propagação da

doença. A sua ação antimalárica é exercida contra os hipnozoítos hepáticos, sendo o único fármaco capaz de efetuar a cura radical das formas teciduais latentes dos *P. vivax* e *ovale*. No entanto, a primaquina não afeta as formas assexuadas do parasito no sangue (esporozoítos), sendo por isso freqüentemente utilizada em combinação com um esquizonticida sanguíneo, como a cloroquina, para obtenção de cura radical. A primaquina é administrada oralmente, sendo bem absorvida do trato gastrintestinal. O seu metabolismo é rápido, desaparecendo quase por completo 10 a 12 horas após a administração. O seu tempo de meia-vida é de cerca de 3 a 6 horas. O metabolismo da primaquina é um processo simples, consistindo em 2 passos metabólicos, no primeiro dos quais se forma a 6-hidroxiprimaquina e a 6-hidroximetilprimaquina, e no segundo passo, a *N*-acetilprimaquina. Este processo transforma a primaquina em potente agente oxidante, mais ativo nas células teciduais que contêm os esquizontes.

Um dos poucos efeitos adversos deste fármaco é a sua atividade hemolítica em pacientes com deficiência congênita em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) nas hemácias, deficiência esta relacionada com o cromossomo X. As células dos pacientes deficientes em G6PD não conseguem regenerar NaDPH, cuja concentração é reduzida pelos metabólitos oxidantes da primaquina e de outros fármacos. Em conseqüência, as funções metabólicas gerais das hemácias alteram-se e ocorre hemólise. Entre os efeitos adversos ocasionais provocados pela primaquina, contam-se distúrbios gastrintestinais, metemoglobinemia e cianose, relacionados com dosagens elevadas. Embora se tenha observado menor sensibilidade em algumas espécies de *P. vivax*, a resistência à primaquina continua a ser fenômeno raro. (OLLIARO, 2001).

O mecanismo de ação proposto para a primaquina é o de interação com os ácidos nucléicos, interferindo na síntese e função

dos mesmo. A interação com o DNA se processa, provavelmente, mediante formação de complexo. As ligações compreendidas seriam: 1) a atração iônica entre os átomos de nitrogênio protonizados da cadeia lateral e os grupos fosfatos, negativamente carregados, das hélices do DNA; 2) transferência de carga ou interação hidrofóbica específica envolvendo o anel aromático plano da 8-aminoquinolina e os pares de bases do DNA, guanina-citosina. Da interação entre primaquina e DNA resulta inibição da atividade de DNA e RNA-polimerases. Por não poder se separar suficientemente, a dupla hélice não atua como molde (OLLIARO, 2001).

Outro mecanismo da ação antimalárica proposto baseia-se na ação dos intermediários quinolina-quinona derivados da primaquina, os quais são compostos redox transportadores de elétrons, que podem atuar como antioxidantes. É provável que estes intermediários produzam a maior parte da hemólise e da metemoglobinemia associadas ao uso de primaquina. Nesta mesma linha de raciocínio a ação antimalárica da primaquina está associada a espécies reativas de oxigênio, com a formação de peróxido de hidrogênio (JAIN *et al.*, 2005; KATZUNG, 1995).

2.6 Prevenção

Recomendações profiláticas variam de acordo com a preferência de diferentes países e também de médicos. A maioria recomenda mefloquina para turistas não-imunes, em uma semana de tratamento. Possui eficiência de aproximadamente 90%. Entretanto, existem casos relatados de efeitos adversos, como tontura e náusea (DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASE WHO, 2008; INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURES ASSOCIATIONS, 1992; KOLATA, 1992).

Outra alternativa de prevenção seria a aplicação de vacina contra malária (GIRARD *et al.*, 2007; INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURES ASSOCIATIONS, 1992). Porém, não existe, ainda, vacina disponível para uso.

Devem-se estabelecer programas de controle do mosquito, empregando-se inseticidas nas áreas endêmicas. Como medida de proteção individual contra a picada do mosquito, podem ser utilizados repelentes na pele (WHO, 2008; JAMES, GUILLES, 2000; WERNSDORFER, 1994).

2.7 Planejamento de antimaláricos potenciais

A despeito de existirem alternativas quimioterápicas para a parasitose (FERREIRA, 2002, 1993, BJORKMAN, PHILLIPS-HOWARD,1990, GOA, 1992; CHANG, LIN-HUA, JANTANAVIVAT, 1992; DRUG EVALUATIONS ANNUAL, 1991; FOSTER, 1991), a situação vem se agravando em razão do aumento significativo da resistência dos plasmódios, sobretudo do *P. falciparum*, aos fármacos ora disponíveis (DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASE WHO, 1998; PETERS, 1995; BJORKMAN, PHILLIPS-HOWARD, 1990; COWMAN, FOOTE, 1990; ORLOV, RABINOVICH, 1990 PANISKO, KEYSTONE, 1990;).

Extensas regiões de países onde grassa a malária apresentam alta incidência de casos resistentes e multi-resistentes, constituindo-se no principal obstáculo à quimioterapia (WINSTANLEY, 2000) e à profilaxia da malária (BIA, 1992; FERREIRA, 2002; Di SANTI, BOULOS,2001)

Como explicado anreriormente, a cloroquina, esquizonticida sanguíneo cuja introdução remonta à época da II Guerra Mundial (FERREIRA, 1982; STOKSTAD, JUKES, 1987), tem hoje sua eficácia diminuída em razão da emergência crescente de *P. falciparum*

resistentes (DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASE WHO, 1998; GINSBURG, KRUGLIAK, 1992; KOROLKOVAS, 2003; OGA, FERREIRA, 1994; PAYNE, 1987; WERMUTH, GAIGNAULT, MARCHANDEAU, 2003). Muitas são as hipóteses aventadas para explicar o mecanismo de resistência ao fármaco (COWMAN, FOOTE, 1990; HOWELLS, 1987; PETERS, 1984). Entre elas, a possibilidade de as células resistentes apresentarem alta atividade de monoxigenases, provocando diminuição da referida 4-aminoquinolina, que não atingiria concentração suficiente para manifestar a ação antimalárica (MENEZES, FERREIRA, 2005; WONGSRICHANALAI *et al.*,2002).

2.7.1 CISTEINO PROTEASES

Entre os alvos promissores para o planejamento de novos fármacos antimaláricos podem-se destacar as proteases presentes no parasito as quais têm recebido considerável atenção nos últimos anos. Essas enzimas estão envolvidas em diversos processos nos organismos vivos, tais como diferenciação e replicação celular e interação do parasito com a célula do hospedeiro (LIÑARES, RODRIGUEZ, 2007; ROSENTHAL, 2004; NORTH, MOTTRAM, COOMBS, 1990; SIJWALI *et al.,* 2001).

Estudos realizados para identificar os tipos de proteases presentes nos parasitos revelaram algumas diferenças interessantes entre as proteases dos parasitos e mamíferos. Nestes últimos observam-se três principais cisteíno-proteases, as catepsinas B, L e H, enquanto que alguns protozoários contêm número relativamente grande de enzimas distintas (LIÑARES, RODRIGUEZ, 2007; ROSENTHAL, 2004; BNORTH, MOTTRAM, COOMBS, 1990).

As enzimas da classe das proteases ou endopeptidases, como as cisteíno-proteases, apresentam a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas no interior de proteínas. Essas enzimas estão envolvidas

em processos proteolíticos, que podem, ocorrer, por exemplo, dentro dos lisossomas (ROSENTHAL, 2004; NORTH, MOTTRAM, COOMBS, 1990).

Entre as proteases presentes nos plasmódios merece destaque a falcipaína, visto que esta enzima está, provavelmente, implicada na hidrólise da hemoglobina, que representa uma fonte de aminoácidos para o parasito no estágio eritrocítico. Estudos *in vitro* demonstraram que inibidores dessa protease bloquearam a hidrólise da hemoglobina e o desenvolvimento dos parasitos (ROSENTHAL, 2004; SIJWALI *et al.*,2001).

A falcipaína corresponde à cisteíno-protease mais importante do *Plasmodium*, e tem massa molecular de 68 kDa (ROSENTHAL, 2004; NORTH, MOTTRAM, COOMBS, 1990).

A atividade dessa cisteíno-protease foi identificada inicialmente em extratos de trofozoítos, o estágio eritrocítico do parasito, em que se observou intensa degradação de hemoglobina. O papel da falcipaína foi comprovado quando culturas contendo o *Plasmodium* incubadas com inibidores de cisteíno-proteases falharam no desenvolvimento do parasito (SHENAI, ROSENTHAL, 2002).

A falcipaína apresenta a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas, que apresentem na posição P_1 resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys) e, na posição P2 preferencialmente resíduos de leucina (Leu) e fenilalanina (SHENAI *et al.*, 2000).

Essa especificidade da falcipaína foi observada em estudos realizados entre a falcipaína e outras cisteíno-proteases. Testaram-se 25 compostos (substratos peptídicos sintéticos), sendo que a falcipaína hidrolisou 10 desses substratos. Todos os substratos clivados apresentaram resíduos de arginina e lisina na posição P_1. A falcipaína demonstrou, também, preferência significativa por resíduos

de leucina e fenilalanina na posição C terminal. A falcipaína, juntamente com catepsina L, papaína e cruzipaína, apresentou preferência por aminoácidos hidrofóbicos, mas não carregados na posição P_2. A preferência por leucina na posição P_2 foi observada apenas com a falcipaína (SHENAI *et al.*, 2000).

A falcipaína pode ser explorada como alvo bioquímico para o planejamento de inibidores e, também, no desenvolvimento de pró-fármacos que seriam especificamente ativados por essa cisteíno-protease do parasito. Esses tipos de pró-fármacos, cuja liberação do fármaco depende de uma enzima específica do parasito, podem proporcionar menor toxicidade ao hospedeiro (ROSENTHAL, 2004; NORTH, MOTTRAM, COOMBS, 1990).

2.8 Modificação molecular na introdução de novos fármacos

A modificação molecular tem se mostrado a técnica mais promissora para a introdução de novos fármacos na terapêutica (WERMUTH, 2008; KOROLKOVAS, 1988). Tal processo permite que as propriedades indesejáveis dos protótipos sejam diminuídas e as características desejáveis, ressaltadas, mediante retirada, substituição ou introdução de grupos químicos, cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor. Apesar de, em geral, a modificação molecular clássica não utilizar as bases moleculares da doença como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, esse foi o processo mais profícuo de introdução de fármacos na terapêutica.

Entre os processos de modificação molecular, a latenciação é um dos mais promissores (CHUNG *et al.*, 2005; AVENDAÑO, 1993; BALANT, BODOR, 1991; BUNDGAARD, 1985; FRIIS, BUNDGAARD, 1996; GRAHAM, 1983; ILLUM, DAVIS, 1987; JONES, 1985; JULIANO,

1980; KOROLKOVAS, 1988; MEÑENDEZ, AVENDAÑO, 1993; POZNANSKY, CLELAND, 1980; SCHACHT, VANSTEENKISTE, SEYMOUR, 1996; SILVA *et al.*, 2005; SINKULA, 1985; TRIPATHI, DUTTA, VISHWAKARMA, 1996; TRIPATHI, PURI, DUTTA, 1996) e foi definida por Harper, em 1958, como a transformação do fármaco em forma inativa de transporte, que, mediante reação enzimática *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele, teve seu conceito ampliado, incluindo liberação por meio de reação química. No entanto, em 1957, Albert já havia definido uma das formas obtidas com esse processo, o pró-fármaco. A Figura 14 mostra esquematicamente o conceito clássico de latenciação.

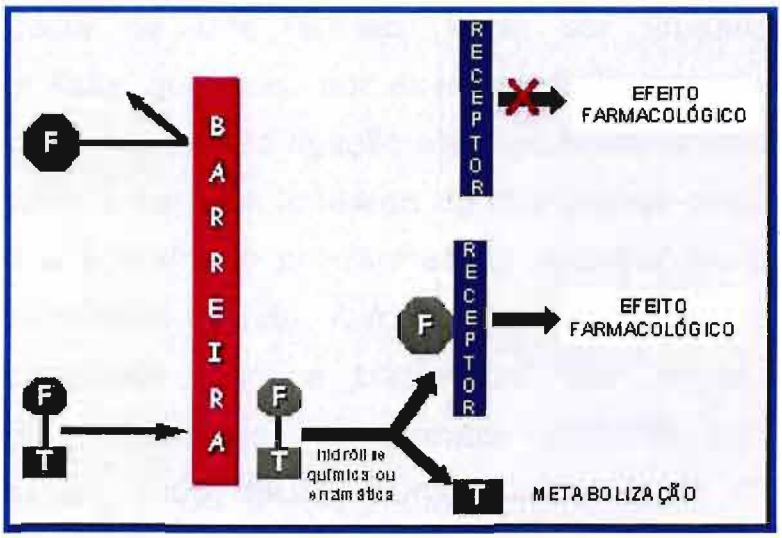


Figura 14 – Esquema geral de latenciação (adaptado de Friis e Bundgaard, 1996).

WERMUTH, em 1984, classificou as formas latentes em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores e fármacos dirigidos.

O planejamento pode ser dividido em três passos básicos:

1- Identificação do problema associado ao fármaco;

2 - Identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas;

3 - Escolha do transportador adequado e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.

Os *pró-fármacos clássicos* compreendem área da pesquisa de fármacos que é voltada, especialmente, para a otimização das propriedades farmacocinéticas correspondentes (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008; BUNDGAARD, 1985; FRIIS, BUNDGAARD, 1996). Em geral, o termo pró-fármaco implica ligação covalente entre o grupo ativo e o transportador, mas alguns autores também usam-no para caracterizar algumas formas de sais de princípios ativos.

A eficácia de um fármaco pode ser limitada por suas propriedades físico-químicas, por exemplo, baixa permeabilidade na membrana plasmática. Pela ligação com um transportador adequado, pode-se superar a barreira limitante ao fármaco de origem. Uma vez ultrapassada a barreira, o pró-fármaco é revertido ao protótipo por sistemas enzimáticos ou não. A formação do pró-fármaco, portanto, confere propriedade química transitória, que altera ou elimina propriedades indesejáveis no fármaco (CHUNG *et al.*, 2005; WERMUTH *et al.*, 2003; FRIIS, BUNDGAARD, 1996). O enfoque do pró-fármaco como um modo de se otimizar a distribuição do fármaco passou por significativa expansão nas duas décadas passadas e mais de 50 compostos farmacologicamente ativos são clinicamente usados sob essa forma, no presente (ETTMAYER *et al.*, 2004).

Os pró-fármacos clássicos podem ser subdivididos em duplos ou triplos, ou em cascata, e pró-fármacos recíprocos (WERMUTH, 2008). Essas denominações dizem respeito à necessidade de mais de um passo metabólico para a liberação do fármaco. Quando o transportador é ligado à ponte conectada com o fármaco, conhecida

como grupo espaçante, o termo duplo é utilizado. O grupo espaçante permitiria maior acesso às enzimas, quando for o caso, facilitando a liberação do fármaco de sua forma de transporte. Pró-fármacos triplos ou em cascata são aqueles que além de ligações por meio de espaçante apresentam liberação por vias química e enzimática.

Pró-fármaco recíproco é o termo aplicado à forma latente que consiste de dois fármacos, em geral, de ação sinérgica, ligados um ao outro (um fármaco é transportador do outro e vice-versa) (SINGH, SHARMA, 1996). Tal conceito não é recente, mas, não raro, confunde-se com hibridação molecular, que é processo de associação molecular que implica ação *per se*, sem necessidade de liberação do fármaco de sua forma de transporte (KOROLKOVAS, 1988). A sulfassalazina é exemplo que atesta a formação de pró-fármaco recíproco, em 1942, anteriormente à introdução do conceito da própria latenciação. Entre os exemplos mais recentes podem-se citar as cefalosporinas de ação mista, conhecidas como DAC – *Dual Action Cephalosporins* –, cujo propósito é ampliar o espectro de ação das mesmas. Albrecht e colaboradores (1990, 1991) sintetizaram série de DAC em que se associam, mediante ligação na posição 3' da cefalosporina, quinolonas, melhorando a atividade, solubilidade, estabilidade e farmacocinética do β-lactâmico matriz. Resultam, dessa forma, antibióticos de ação complementar, uma vez que as quinolonas atuam em cepas resistentes a β-lactâmicos enquanto as cefalosporinas são eficazes contra estreptococos. Ademais, os mecanismos de ação são diferentes, as primeiras atuando na DNA-girase e as últimas, na transpeptidase. Com base no mesmo princípio, pró-fármacos recíprocos de β-lactâmicos não-clássicos, mais propriamente das carbapenemas, com fluorquinolonas encontravam-se em ensaios clínicos avançados em 1990 (ALBRECHT, BESKID, CHRISTENSON, 1991; ALBRECHT, BESKID, CHAN, 1990).

Bioprecursor é um tipo de pró-fármaco, em que a reversão ao composto ativo se dá por meio de reações enzimáticas, em geral, não hidrolíticas. Sistemas de óxido-redução são utilizados pelo organismo para liberar o fármaco (WERMUTH, 2008). Nesses casos, não se utilizam transportadores. Há, no entanto, formas mistas de bioprecursores e pró-fármacos clássicos.

Fármacos dirigidos são formas latentes em que o transportador apresenta alta especificidade, por si só, ou por conter grupo diretor da ação ao nível celular. Anticorpos, imunoglobulinas e ácidos nucléicos podem ser empregados como transportadores, normalmente ligados a matrizes poliméricas (BLAU *et al.*, 2008; SCHACHT *et al.*, 1996; TAKAKURA, HASHIDA, 1995; WERMUTH, 2008).

Variante de grande especificidade de ação, que engloba a concepção de fármaco dirigido é a do processo ADEPT – *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* (MELTON *et al.*, 1996). Por esse planejamento, inicialmente se administra um conjugado anticorpo monoclonal-enzima não existente no organismo, e, em seguida, pró-fármaco, cuja ligação ao transportador é cindida especificamente pela enzima componente do conjugado, é administrado. Modelos mais avançados desse processo são o GDEPT – *Gene Directed Emzyme Prodrug Therapy*, e VDEPT – *Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy,* entre outras formas (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

2.9 Planejamento de pró-fármacos antimaláricos de liberação específica

Estudos sobre a bioquímica do parasito têm sido bastante explorados, objetivando a identificação de possíveis alvos terapêuticos. A partir dessa abordagem é possível o desenvolvimento de fármacos antimaláricos mais seletivos capazes de bloquear rotas metabólicas essenciais do parasito (SIJWALI *et al.,* 2001). Entre os alvos estudados, podem-se citar o processo de destoxificação do *Plasmodium*, as cisteíno-proteases envolvidas com o processo de degradação de hemoglobinas e a síntese de pirimidinas (CASTEEL, 2003; SRIVASTAVA, *et al.*, 1999; SIJWALI *et al.,* 2001).

2.9.1 Mecanismo de destoxificação do *Plasmodium*

Durante o ciclo de vida eritrocítico, o plasmódio utiliza a hemoglobina como alimento, digerindo a proteína e liberando o heme. A digestão da hemoglobina pelo parasito compreende uma rota metabólica existente no *Plasmodium*. Os eventos iniciais consistem na endocitose da hemoglobina do citoplasma do hospedeiro e transporte para o vacúolo alimentar, onde a porção protéica (globina) é degradada por enzimas proteolíticas. O heme é liberado como um resíduo da degradação da hemoglobina e recebe o nome de ferriprotoporfirina IX, que é uma substância tóxica. A toxicidade do heme em muitos sistemas biológicos é devido à sua habilidade em formar espécies reativas de oxigênio. No plasmódio, a degradação do heme ocorre pela ação de uma heme-polimerase, que converte a ferriprotoporfirina IX em polímeros de beta-hematina (beta-hematina-hemozoína). A ligação do polímero envolve uma ligação covalente entre o átomo de ferro do heme e a cadeia lateral propionila de outro grupo heme. Os polímeros de beta-hematina não são tóxicos devido à sua insolubilidade em água, em pH fisiológico ou pH baixo, e justificam a coloração do pigmento da malária ou

hemozoína. A redução da atividade da heme-polimerase causaria o acúmulo de ferriprotoporfirina IX e, portanto, estaria alterando o sistema de destoxificação do parasito. Um dos mecanismos de ação proposto para a cloroquina, antimalárico de escolha, seria interferir com esse sistema de destoxificação do parasito (OTELO, 2007; CASTEEL, 2003).

2.9.2 Modelagem Molecular

Um dos mais importantes avanços no planejamento racional e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular (BARREIRO *et al.*, 1997).

Ela tem se firmado como ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de um protótipo já existente ou com o auxílio de ferramentas computacionais. O desenvolvimento da modelagem molecular deveu-se, em grande parte, ao avanço em paralelo dos recursos computacionais -- *hardware* (velocidade de cálculo) e *software* (programas de modelagem molecular). No passado, a utilização desta técnica era restrita a um seleto grupo de pessoas que desenvolviam os seus próprios programas de modelagem molecular. Atualmente, não é mais necessário ao usuário compor o seu próprio programa, uma vez que eles podem ser obtidos através de grandes companhias e de laboratórios acadêmicos (BARREIRO *et al.*, 1997; RODRIGUES, 2001).

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos. Ela permite o cálculo de propriedades específicas de uma molécula, que podem influenciar na interação com o receptor. Como exemplos, podem-se citar o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e a energia e os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO (*Highest*

Occupied Molecular Orbital) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), entre outros. Reações em que moléculas atuam como doadoras de elétrons é importante analisar o HOMO destas, porém quando atuam como aceptoras de elétrons é importante analisar o LUMO (RODRIGUES, 2001).

Outras informações importantes também podem ser obtidas a partir da comparação estrutural entre diferentes moléculas, o que permite a geração de um índice de similaridade, correlacionado ou não com a atividade farmacológica. A modelagem molecular também permite a visualização tridimensional (3D) do complexo fármaco-receptor e fornece informações sobre os requisitos estruturais essenciais que permitem a interação adequada do fármaco no seu sítio receptor. Esta ferramenta também tem o potencial de planejar teoricamente novas moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais para um perfeito encaixe no sítio receptor. A maioria dos programas de modelagem molecular é capaz de desenhar a estrutura molecular e realizar os cálculos de otimização geométrica e estudos de análise conformacional. Os arquivos de saída destes cálculos podem ser utilizados como arquivos de entrada para outros programas (BARREIRO *et al.*,1997; RODRIGUES, 2001; COHEN, 1988).

Desta forma, a primeira etapa em estudos de modelagem molecular é desenhar a estrutura da molécula. Em seguida, a molécula é otimizada objetivando encontrar parâmetros geométricos tais como comprimentos e ângulos de ligação que estejam próximos aos valores determinados experimentalmente. Com isto, pode-se avaliar a qualidade do programa de modelagem molecular selecionado para efetuar os cálculos, considerando que ele deve ser capaz de representar corretamente a estrutura molecular sem que os parâmetros estruturais da referida molécula tenham sido usados para elaborá-lo. Assim, um programa de modelagem molecular deve ser

capaz de adotar o princípio da *transferibilidade*, ou seja, reconhecer e transferir os parâmetros embutidos no programa para uma nova molécula que apresente as mesmas características estruturais e eletrônicas das moléculas usadas para confeccionar o programa (mesmo tipo de átomos, funções químicas, hibridização molecular, entre outros) (BARREIRO *et al.*,1997; CARVALHO, PUPO, BERNARDES, 2003; RODRIGUES, 2001).

O estudo de análise conformacional permite determinar as conformações de mínimo de energia (confôrmeros). Estes confôrmeros indicam como os grupamentos funcionais estão orientados e, portanto, revelam aspectos relevantes de como a molécula pode interagir com um receptor específico, considerando que a conformação mais estável deve estar em maior concentração durante o processo de interação com o receptor. Entretanto, deve-se ressaltar que não existe uma relação entre a conformação mais estável e a conformação bioativa, pois a primeira pode sofrer mudanças na sua conformação original no momento em que se aproxima do sítio receptor. Este estudo conformacional é realizado considerando-se as rotações livres entre dois átomos consecutivos que, por sua vez, determinam um ângulo diedro, assinalando como devem estar orientados os grupamentos adjacentes a estes dois átomos (CARVALHO, PUPO, BERNARDES, 2003).

Os cálculos podem ser realizados utilizando mecânica molecular ou mecânica quântica.

Para a mecânica molecular a energia é calculada por comparação entre ângulos e distâncias de ligação entre átomos que compõem a molécula, com valores tabelados. As equações obtidas consideram apenas o núcleo dos átomos e não incluem os elétrons nos cálculos. O objetivo é predizer a energia associada com

determinada conformação de uma molécula (BARREIRO *et al.*,1997; CARVALHO, PUPO, BERNARDES, 2003; RODRIGUES, 2001).

A mecânica quântica utiliza as equações de física quântica para calcular as propriedades de moléculas, a partir das interações entre os seus elétrons e núcleos.

É possível descrever a energia eletrônica separadamente da energia nuclear (BARREIRO *et al.*,1997; CARVALHO, PUPO, BERNARDES, 2003, RODRIGUES, 2001). Esta se divide em dois métodos: *Ab initio* e semi-empírico. No método *Ab initio* utilizam-se cálculos mecânico-quânticos independentes de qualquer experimento que não seja a determinação de constantes fundamentais. Os métodos são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível (SANT´ANNA, 2002).

Quanto ao método semi-empírico, apesar de ser menos exato ele é mais rápido e é utilizado na minimização de energia e otimização de moléculas que variam de 10 a 120 átomos. Entre os métodos, têm-se: AM1 (estes cálculos envolvem os elétrons de valência dos átomos da molécula), PM3 (é um programa de cálculo semi-empírico de orbital molecular) e MNDO (são cálculos semi-empíricos de orbital molecular (MO), que usam como aproximação uma negligência modificada de recobrimento diatômico (diferencial)), sendo os dois primeiros os mais utilizados (SANT´ANNA, 2002).

2.9.3 Pró-fármacos peptídicos

Com o intuito de diminuir a toxicidade de alguns fármacos, CARL e colaboradores (1980) foram os primeiros pesquisadores a utilizar peptídeos como transportadores em fármacos. Em 1983,

CHAKRAVARTY e colaboradores sintetizaram pró-fármacos peptídicos de doxorrubicina, com o propósito de que estes pró-fármacos fossem levados ao local de ação, neste caso às células tumorais. Outro exemplo é caso de aminoácidos e peptídeos ligados à primaquina, como intermediários de pró-fármacos recíprocos com o nitrofural, que manifestaram atividade tripanomicida *in vitro* (CHUNG, 1999. CHUNG *et al.*, 1997).

2.9.4 Métodos de síntese de peptídeos (MACHADO *et al.*,2004; STEWART, 1984)

Atualmente, três são os métodos utilizados para a síntese destes compostos em número e escala variados: síntese química, síntese enzimática (ou biocatalisada) e síntese via DNA recombinante.

2.9.4.1 SÍNTESE QUÍMICA

Este método utiliza um reagente químico para ativar o ácido carboxílico de um N^{α}-acil-aminoácido ou N^{α}-acil-fragmento peptídico, o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo α-amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico C^{α}-bloqueado, resultando na formação da ligação peptídica entre eles (RCONHR', Figura 15). Quando grupos funcionais reativos que não estão diretamente envolvidos na formação da ligação peptídica estiverem presentes, estes devem ser previamente protegidos ou bloqueados. Com isto, a síntese torna-se mais controlada em relação à possível formação de subprodutos.

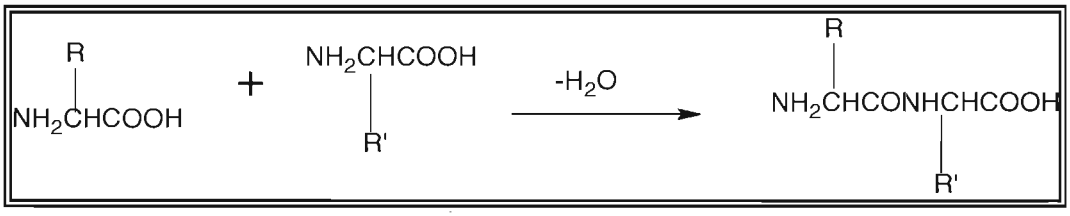


Figura 15 – Esquema de formação de um peptídeo.

Em síntese de peptídeos, a formação de ligação amida entre dois aminoácidos ou fragmentos peptídicos é chamada de acoplamento. Existem três diferentes maneiras de promover esta reação: a) o componente carboxílico é ativado e exposto ao componente amínico; b) o componente carboxílico ativado é isolado e purificado previamente à sua aminólise e c) o agente acilante é gerado no meio reacional em presença do componente amínico, pela adição de um reagente ativador ou acoplador. Alguns exemplos de agentes acoplantes são: o etoxiacetileno, as carbodiimidas (DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida, DCC: *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida e EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), entre outros.

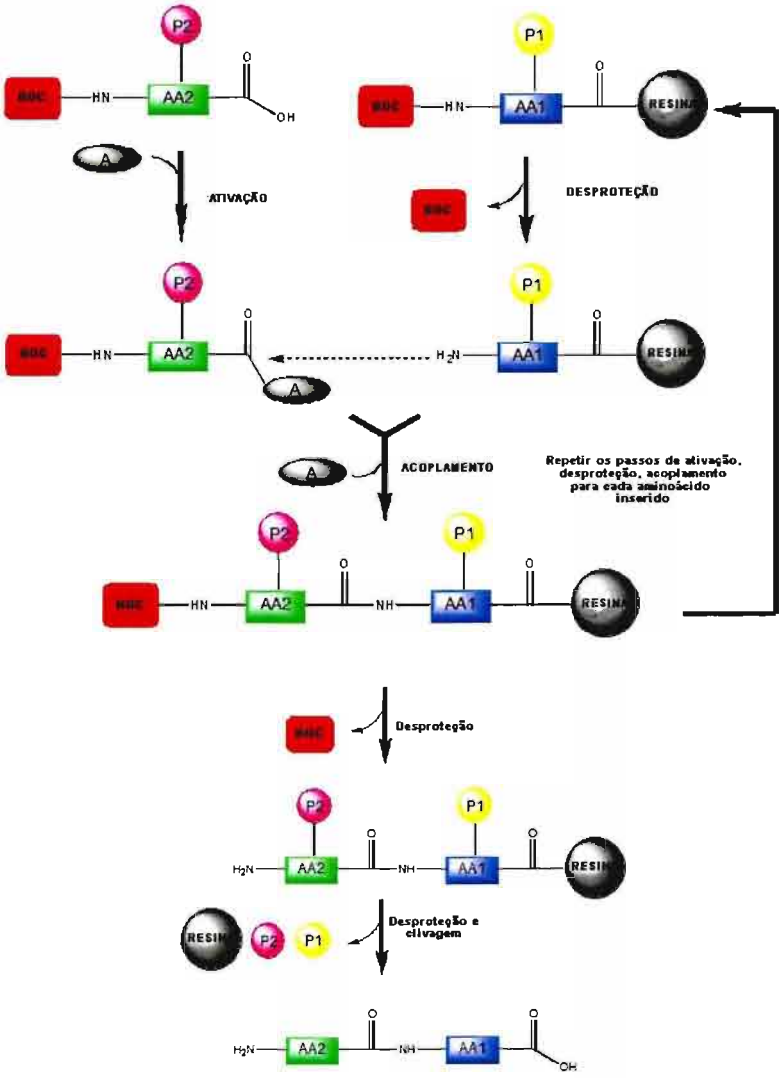
A síntese química pode ser realizada em solução (método clássico) ou utilizando um suporte polimérico (resina) (Figura 16). Este último método é denominado síntese de peptídeos em fase sólida. A diferença entre os dois se dá no acoplamento: no primeiro caso este acoplamento se dá via grupamento amina com o grupo carboxílico esterificado, enquanto que no segundo, o grupo carboxílico é ligado ao suporte polimérico e o grupamento amina é protegido. A síntese clássica ocorre via C→N ou N→C enquanto em fase sólida geralmente ocorre via N→C. Os principais grupos protetores são: BOC (*t*-butiloxicarbonila), FMOC (9-fluorenilmetoxicarbonila), Bzl (benziloxicarbonila), Bz (benzila) ou Tos (tosila).

As etapas utilizadas na metodologia clássica são: ativação do grupo carboxílico do primeiro aminoácido com seu grupo amino protegido por um agente acilante, inserção do segundo aminoácido com o grupo carboxílico esterificado, desacoplamento, purificação e análise do produto obtido.

Na metodologia por fase sólida as etapas utilizadas são: acoplamento do primeiro aminoácido com grupo amino protegido à

resina, remoção do grupo amino protetor, inserção do segundo aminoácido com grupo amino protegido, desproteção deste grupo, desacoplamento da resina, que, dependendo do grupo protetor utilizado e da resina utilizada podem ser uma única etapa, purificação e análise química.

A escolha do melhor método depende do número de aminoácidos a serem inseridos, ou seja, com o tamanho do peptídeo que se deseja obter: dipeptídeo, tetrapeptídeo, entre outros.



Legenda: P1 e P2 - grupos protetores para cadeia lateral; **AA1 e AA2** - 1°. e 2°. aminoácidos; **BOC**: grupo protetor de amina; **A** - grupo ativador de carbonila

Figura 16. Síntese de peptídeos em fase sólida. Adaptado de Merrifield (1963).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

2.9.4.2 SÍNTESE ENZIMÁTICA

Por esse método, a formação da ligação química peptídica é efetuada através de uma enzima, que pode estar na sua forma livre ou imobilizada. Aqui a reação não é mediada por reagentes químicos. Porém, da mesma forma que a síntese química, ela pode ser realizada passo a passo ou via condensação de fragmentos peptídicos preparados previamente.

2.9.4.3 SÍNTESE VIA DNA RECOMBINANTE

Tal processo utiliza todos os métodos modernos de clonagem e expressão gênica via microrganismos modificados, podendo produzir um peptídeo recombinante ou vários deles simultaneamente.

3. OBJETIVOS

Face ao exposto e à necessidade de quimioterápicos realmente úteis contra malária, é imperativa a busca por novas alternativas que enriqueçam o arsenal terapêutico contra a parasitose.

À vista de tal fato e ante as diferenças observadas entre o parasito e o hospedeiro, o presente trabalho teve como o objetivo sintetizar, mediante o processo de latenciação:

- pró-fármacos recíprocos da desetilcloroquina com a primaquina, empregando-se espaçantes dicarboxílicos. Espera-se que o derivado permita a cura radical em casos de *malária vivax;*
- pró-fármacos duplicados de desetilcloroquina e primaquina, mediante a ligação com grupo espaçante inespecífico. Espera-se que, pelo fato de duas moléculas estarem sendo transportadas ao mesmo tempo, se diminua a dose necessária de cada um deles, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade correspondente. A associação dos dois fármacos pode levar à cura radical em casos de *malária vivax*;
- pró-fármacos duplicados de desetilcloroquina, mediante a ligação com grupo espaçante peptídico específico à cisão da falcipaína. Espera-se que a liberação seja seletivamente efetuada no interior do plasmódio, especialmente, do *P. falciparum*, no seu estágio eritrocítico. Pelo fato de duas moléculas estarem sendo transportadas ao mesmo tempo e seletivamente, poder-se-á diminuir a dose necessária, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes comerciais utilizados foram secos e purificados, quando necessário, segundo os padrões estabelecidos pela literatura (PERRIN *et al.*, 1980).

- 1,1'-Carbonildiimidazol (CDI) (Acros Organics)
- 1-Etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma)
- 1-Hidroxibenzotriazol (Aldrich)
- 2-(*t*-Butiloxicarboniloxiimino)-2-fenilacetonitria (Boc-ON) (Aldrich)
- 4-Cloro-4-oxo-butanoato de metila e dicloreto de succinoíla (sintetizados no laboratório de Química Farmacêutica, segundo método de FURNISS, HANNAFORD, SMITH (1989)).
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)
- Acetato de etila (Merck)
- Acetona (Merck)
- Acetona-d6 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)
- Acetonitrilia grau HPLC (Merck)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido bromídrico (Merck)
- Ácido cítrico p. A.(Merck)
- Ácido fosforoso (Merck)
- Água desionizada
- Água deuterada (D_2O) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)
- Alanina (Fluka)
- Anidrido succínico (VETEC)
- Bicarbonato de potássio (Synth)
- Bicarbonato de sódio (Synth)
- Boc-Arg(Tos)-OH (Bachem)

- Boc-L-alanina (Lcsciences)
- Boc-L-leucina (Lcsciences)
- Boc-Lys(Cl-Z)-OH (Bachem)
- Butil-lítio 1,6 M em hexano (Aldrich)
- Carbonato de césio (Merck)
- Carbonato de sódio (Merck)
- Cloreto de acetila (Aldrich)
- Cloreto de cálcio (CRQ)
- Cloreto de tionila (Merck)
- Cloroformato de etila (Aldrich)
- Clorofórmio (Merck)
- Clorofórmio-d3 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)
- Dicicloexilcarbodiimida (DCC) (Merck)
- Diclorometano (Merck)
- Difosfato de cloroquina (GALENA)
- Difosfato de primaquina (ITACÁ)
- Diisopropilamina (Aldrich)
- Diisopropilcarbodiimida (DIC) (Aldrich)
- Dimetilformamida (Merck)
- Dimetilsulfóxido-d6 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc)
- Dioxano (Merck)
- Etanol (Merck)
- Éter de petróleo (30-60 °C) (Merck)
- Éter etílico (Merck)
- Hidreto de sódio (NaH) (Aldrich)
- Hidróxido de amônio (Merck)
- Hidróxido de sódio (Merck)
- Iodeto de etila (Merck)
- L-alanina (Fluka)
- L-fenilalanina (Fluka)
- L-leucina (Fluka)
- Magnésio metálico em tiras (Synth)

- Metanol (Merck)
- Metanol grau HPLC (Merck)
- Nα-Boc-Nε-(2-cloro-Z)-L-lisina
- Piridina (Merck)
- Placas de sílica-gel F254 (Merck)
- *p*-Nitrofenol (Merck)
- Resina Merrifield 200-400 MESH "cross-linked"2% (Aldrich)
- Sílica-gel para cromatografia em coluna F254 70-230 MESH (Merck)
- Sulfato de sódio anidro (Merck)
- 2-(*t*-Butoxicarboniloxiimina)-2-fenil-acetonitrila (Boc-ON) (Aldrich)
- Tetraidrofurano (THF) (Merck)
- Tolueno (Merck)
- Trietilamina p.a (Et3N) (Merck)
- Zinco em pó (Galena)

4.1.2 Equipamentos

- Agitadores magnéticos (FISATOM)
- Mantas de aquecimento com agitação (FISATOM)
- Evaporador rotatório (BÜCHI)
- Forno de destilação (BÜCHI)
- Espectrofotômetro FTIR-Bomem (Serie MIchelson)
- Aparelho digital de ponto de fusão MQAPF 301(MICROQUÍMICA)
- Espectrômetro RMN 300 MHz Advance DPX300 (BRUKER)
- Forno de microondas doméstico, 900W (ELETROLUX)
- Lavadora ultrassônica (UNIIQUE)
- HPLC Shimadzu semipreparativo

A maioria dos equipamentos encontra-se disponível no LAPEN – Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Endemias Tropicais -- e no laboratório dos professores: Veni, Carlota e Diogo na FCF- USP.

A termobalança TGA50 e a célula DSC50, ambas Shimadzu, encontram-se disponíveis no Laboratório de Análise Térmica do Prof. Jivaldo do Rosário Matos, IQ-USP.

4.1.3 Vidraria

Vidraria comum em laboratório de síntese orgânica e análise.

4.1.4 Softwares para modelagem molecular

- Spartan O2 v.119 (Wavefunction)
- Gaussian 03W e Gaussview (Gaussian)
- GOLD 3.1.1 (Genetic Optimisation for Ligand Docking) (CCDC)
- Deepview (Swiss-Model)
- Chimera (University of California San Francisco)

4.2 Métodos de Síntese

A. SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS NÃO PEPTÍDICOS

4.2.1 Obtenção da cloroquina base livre (KOROLKOVAS,1988)

Em um funil de separação âmbar de 500 mL adicionaram-se 5 g (15,6 mmol) de difosfato de cloroquina, 80 mL de diclorometano e 80 mL de solução de hidróxido de sódio (2,4 g, 60 mmol). Extraiu-se a fase aquosa 3 vezes com 80 mL de diclorometano. À fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se em agitação por uma noite. Evaporou-se esta fase e, ao líquido de coloração branco-esverdeada obtido, adicionaram-se gotas de acetona para que ocorresse precipitação. Manteve-se sob refrigeração até a completa precipitação da cloroquina livre.

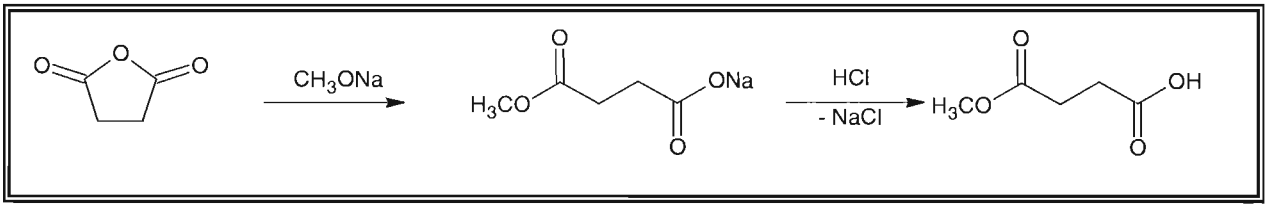
4.2.2 Síntese de intermediários (grupos espaçantes)

4.2.2.1 Síntese de 4-cloro-4oxo-butanoato de metila (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

4.2.2.1.1 Preparação do metóxido de sódio

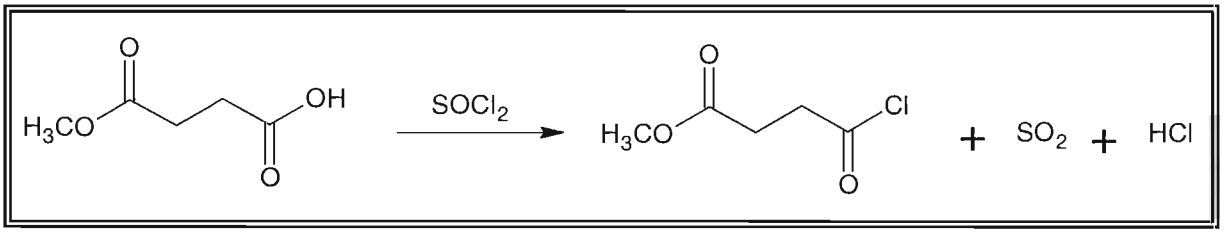
Em um balão de 500 mL adicionaram-se 270 mL de MeOH anidro e, lentamente, sob agitação e banho de gelo, 4,83 g (0,2 mol) de Na metálico. A reação foi mantida até que não houvesse mais liberação de gás. Obteve-se líquido incolor.

4.2.2.1.2 Preparação do sal sódico do monossuccinato de metila



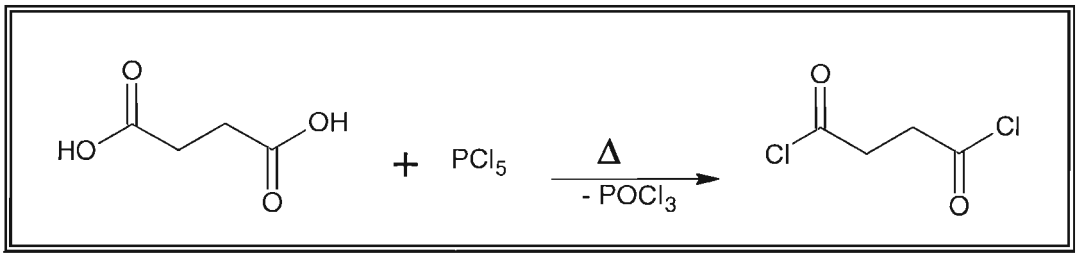
Ao metóxido de sódio obtido anteriormente, adicionaram-se 19,89 g (1,8 mol) de anidrido succínico sublimado. Manteve-se a reação sob refluxo por 5 horas. Evaporou-se o solvente à pressão reduzida, obtendo-se produto sólido de coloração amarelada. O sólido obtido foi solubizado em 135 mL de $CHCl_3$ e lavado com 135 mL de HCl 10% (v/v). A fase aquosa foi extraída mais 2 vezes com $CHCl_3$. Adicionou-se sulfato de sódio anidro para completa secagem. Evaporou-se o solvente e o sólido obtido foi secado sob pressão reduzida.

4.2.2.1.3 Síntese do cloreto de 4-cloro-4-oxobutanoato de metila (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)



Em um balão de fundo redondo adicionaram-se 5 g (0,38 mol) do ácido do monossuccinato de metila e 19,41 mL de cloreto de tionila. Deixou-se sob refluxo por 4 horas com temperatura controlada a 90 ^{0}C. O final da reação foi verificado pelo término da liberação de HCl. Removeu-se o $SOCl_2$ excedente por destilação simples. A seguir, destilou-se o produto em forno de destilação a 141 ^{0}C e 10 mmHg.

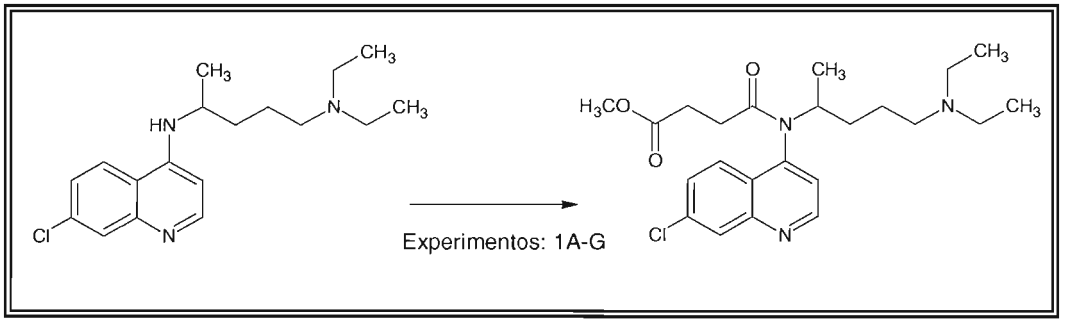
4.2.2.1.4 Síntese do dicloreto de succinoíla (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)



Em um gral adicionaram-se 234,9 g (1,13 mol) de PCl_5 e 58,33 g (0,5 mol) de ácido succínico. Esta mistura foi homogeneizada rapidamente e então transferida para balão de 500 mL. O meio reacional foi mantido sob refluxo e na saída do condensador montado sistema de coleta para o HCl liberado. Ao final da reação destilou-se inicialmente o $POCl_3$ formado à temperatura de 107 ^{0}C e pressão ambiente. Em seguida, destilou-se o dicloreto de succinoíla, em forno de destilação, à pressão reduzida (82 ^{0}C/12 mmHg).

4.2.3 Estudos de acilação da cloroquina

Reação geral



4.2.3.1 Método 1: 4-cloro-4-oxobutanoato de metila (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

As condições reacionais, como reagentes, solventes empregados e tempo, estão detalhadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Estudos de síntese de derivado acilado da cloroquina

Método	Reagentes	Proporção molar (mmol)	Solvente /volume (mL)	Condições de reação
1A	cloroquina trietilamina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila DMAP	3,4 3,7 4 0,35	$CHCl_3$ 12,5	Agitação, 48 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1B	cloroquina trietilamina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila DMAP	3,4 3,7 4 0,70	$CHCl_3$ 12,5	Agitação, 48 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1C	cloroquina trietilamina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila DMAP	3,4 3,7 4 0,35	$CHCl_3$ 12,5	Agitação, 72 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1D	cloroquina trietilamina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila DMAP	3,4 3,7 4 0,70	$CHCl_3$ 12,5	Agitação, 72 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1E	cloroquina trietilamina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila DMAP	3,4 3,7 8 0,35	CH_2Cl_2 12,5	Agitação, 144 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1F	cloroquina piridina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila	1 1 1	CH_2Cl_2 5	Agitação, 100 horas, T.A. e ao abrigo da luz
1G	cloroquina piridina 4-cloro-4-oxobutanoato de metila	1 2 1	CH_2Cl_2 5	Agitação, 100 horas, T.A. e ao abrigo da luz

* T. A. Temperatura ambiente

Experimentos 1A-E

Em balão de 25 mL adicionaram-se as quantidades molares dos reagentes: cloroquina base livre, trietilamina, 4-cloro-4-oxobutanoato de metila e DMAP, conforme Quadro 1. Para os experimentos 1A-D o solvente utilizado foi clorofórmio e para o experimento 1E o solvente utilizado foi diclorometano, ambos anidros. As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Experimentos 1F-G

Em balão de duas bocas de 25 mL adicionaram-se cloroquina base livre solubilizada em diclorometano e piridina. O meio foi mantido sob agitação por meia hora. A seguir, adicionou-se lentamente, com auxílio de uma seringa o 4-cloro-4-oxobutanoato de metila recém-destilado. As quantidades molares dos reagentes e volumes de solvente utilizado estão detalhadas no Quadro 1. As reações foram acompanhadas por CCD.

4.2.3.2 Método 2: Reagente de Grignard (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Em um balão de três bocas de 25 mL adicionaram-se 2,67 g (0,11 mol) de Mg metálico em tiras, 1,6 mL (20 mmol) iodeto de etila e 10 mL de THF anidro, aqueceu-se suavemente a reação e adicionaram-se 7,8 mL (0,1 mol) de iodeto de etila e 35 mL de THF anidro. A temperatura foi levada a −10 °C e a reação foi mantida sob agitação por 3 horas. Adicionou-se 0,319 g (1 mmol) de cloroquina base livre e solução de 4-cloro-4-oxobutanoato de metila (0,150 g, 1 mmol, 3 mL de THF anidro), mantendo-se a reação sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas.

4.2.3.3 Método 3: butil-lítio *(FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)*

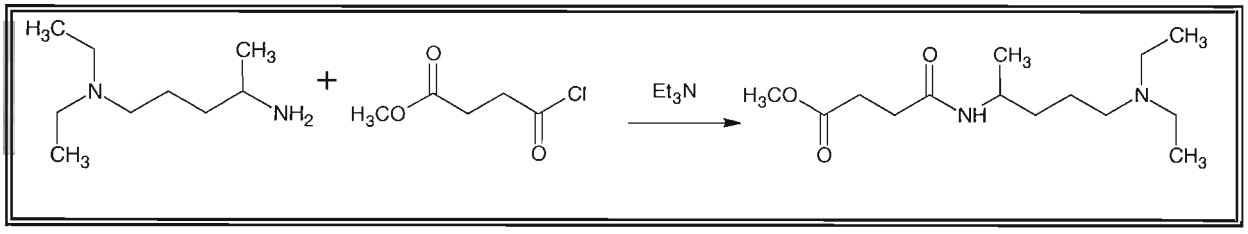
Em um balão de três bocas adicionaram-se 0,319 g (1 mmol) de cloroquina base livre e 5 mL THF anidro. Em seguida, sob gotejamento (15 minutos), juntaram-se 2 mL de solução de butil-lítio (1,6 mol L^{-1}, em hexano,3,2 mmol) a -78 °C. Após 1,5 h, adicionou-se solução de 4-cloro-4-oxobutanoato de metila (0,150 g, 1 mmol, 3 mL de THF anidro). A mistura foi mantida a -78 °C durante 1 h e, em seguida, à temperatura ambiente por 48 h. Adicionaram-se 10 mL de água e o produto foi extraído com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (20 mL), secada sobre $MgSO_4$ anidro e o solvente evaporado. Realizou-se análise por CCD.

4.2.3.4 Método 4: sal fosfônio de piridina

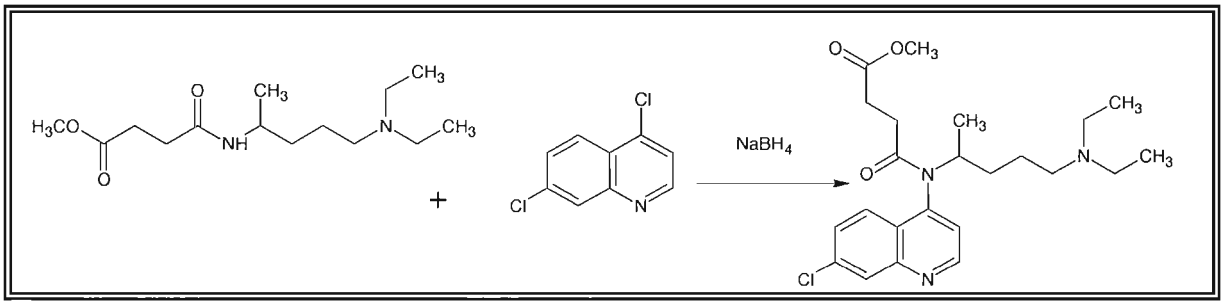
Mistura de 2,052 g (25 mmol) de ácido fosforoso e 6,775 g (25 mmol) de cloreto de mercúrio II em 20 mL de piridina foi mantida sob refluxo por 1 hora. A seguir, adicionaram-se 2,5 g (25 mmol) de anidrido succínico e o refluxo foi mantido por mais 1 hora. Adicionaram-se, então, 8,95 g (28 mmol) de cloroquina base livre e o sistema foi mantido sob aquecimento e agitação por 24 horas. Analisou-se o produto obtido por CCD.

4.2.3.5 Método 5: novoldiamina acilada (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Acilação da novoldiamina



Em um balão de 10 mL adicionaram-se 0,19 mL (1 mmol) de novoldiamina, 0,12 mL (1 mmol) de 4-cloro-4-oxobutanoato de metila e 0,1 mL (1 mmol) de trietilamina e 3 mL de diclorometano anidro como solvente. Manteve-se sob agitação por 14 horas e extraiu-se com água, com posterior precipitação em acetona. Realizaram-se análises no infravermelho e por CCD.



Experimento 8

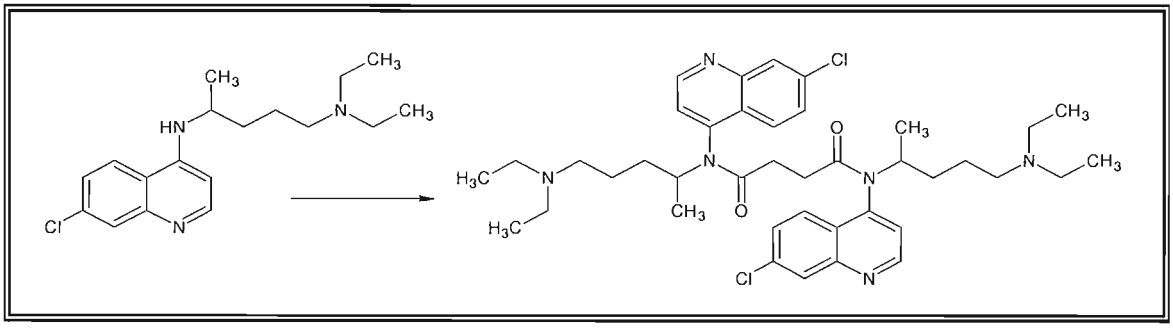
Em balão de 10 mL adicionaram-se 0,1 g (0,4 mmol) de novoldiamina acilada, 0,08 g (0,4 mmol) de 4,7-dicloroquinolina e 0,0151 g (0,4 mmol) de $NaBH_4$. A reação foi mantida por 4 horas sob agitação e acompanhada por CCD.

Experimento 9

O mesmo procedimento anterior foi realizado, alterando-se, apenas, o tempo reacional para 48 horas. Formou-se produto escuro, que foi analisado por CCD e no infravermelho.

4.2.4 Estudos de síntese do derivado de duplicação molecular da cloroquina (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Reação geral



4.2.4.1 Método 1: trifenilfosfina

Em um balão de 10 mL adicionaram-se 0,26 g (1 mmol) de trifenilfosfina, 3 mL THF anidro e 1 mL de tetracloreto de carbono, mantendo-se sob refluxo por 30 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo-água e 0,11 g (1 mmol) de ácido succínico foi adicionado. Esta mistura reacional foi mantida a 5 °C por 10 minutos e, então, 0,63 g (2 mmol) de cloroquina base livre foi adicionada, iniciando refluxo de 45 minutos. Filtrou-se e o solvente foi rotoevaporado, obtendo-se líquido viscoso castanho escuro, que foi analisado por CCD.

4.2.4.2 Método 2: dicloreto de succinoíla

Experimento 10

Em balão de 3 bocas de 100 mL adicionaram-se 5 g (15 mmol) de cloroquina base livre e 20 mL de CH_2Cl_2 anidro. Com o auxílio de funil de adição, juntaram-se, lentamente, 2,54 mL (22 mmol) de dicloreto de succinoíla. A reação foi mantida sob refluxo por 76 horas, sendo acompanhada por CCD. Extraiu-se o produto em água:CH_2Cl_2 e foi realizada novamente CCD da fase orgânica, que mostrou apenas mancha inferior à cloroquina base livre. O produto obtido apresentava-se extremamente viscoso e de cor castanho escura. Realizou-se infravermelho e RMN ^{1}H.

Experimento 11

As condições reacionais seguiram as do experimento 10, utilizando-se, porém, seringa e agulha para adicionar o dicloreto de succinoíla.

Experimento 12

Utilizou-se o mesmo procedimento que o descrito no experimento 10 com quantidades diferentes dos reagentes: 0,5889 g (1,84 mmol) de cloroquina base livre, 0,1 mL (0,92 mmol) de dicloreto de succinoíla e 0,26 mL (1,84 mmol) de trietilamina. A reação permaneceu 3 horas sob banho de gelo e 72 horas sob agitação à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD.

4.2.4.3 Método 3: ácido succínico

Em balão de 50 mL adicionaram-se 2,0001 g (4,8 mmol) de cloroquina base livre, 0,2834 (2,45 mmol) de ácido succínico, 0,9032 g (4,7 mmol) de EDC, 0,627 g (0,5 mmol) de DMAP e 25 mL de diclorometano anidro. A reação foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 minutos e 48 h à temperatura ambiente. Foi realizada CCD para acompanhamento da reação.

4.2.4.4 Método 4: hidreto de sódio

Em balão de duas bocas de 10 mL adicionaram-se 5 mL de DMF anidro, 0,6 g (1,88 mmol) de cloroquina base livre e 0,045 g (1,88 mmol) de NaH. Com auxílio de uma seringa, adicionou-se gota a gota 0,142 g (0,94 mmol) de dicloreto de succinoíla, o sistema foi mantido sob agitação e atmosfera inerte por 40 horas. Extraiu-se o produto com solução 5% de $NaHCO_3$, sendo a fase orgânica evaporada e o produto obtido analisado por CCD e IV.

4.2.4.5 Método 5: fusão

Experimento 13

Em um balão de 10 mL adicionaram-se 40 mg (0,125 mmol) de cloroquina base livre, mantendo-se em banho de silicone à

temperatura de 90 °C até fusão completa da cloroquina. Em seguida, adicionaram-se 7,4 mg (0,063 mmol) de ácido succínico e manteve-se a reação por 12 horas. Extraiu-se com água e diclorometano e o produto foi analisado por CCD, IV e RMN ^{1}H.

Experimento 14

O procedimento seguiu o Experimento 13, porém tempo de reação de 24 horas. A reação foi acompanhada com CCD.

Experimento 15

Utilizaram-se as mesmas quantidades do Experimento 13, porém a reação foi mantida em banho de silicone por 36 horas. A reação foi acompanhada com CCD

4.2.4.6 Método 6: fusão em microondas (SAUER, KALVIN, PHELAN, 2003)

Em um tubo de ensaio Pyrex® adicionaram-se cloroquina base livre e ácido succínico. Levou-se ao forno de microondas doméstico. As quantidades, tempo e potência foram variadas e constam do Quadro 2, que segue.

Quadro 2 – Condições reacionais da reação de fusão em microondas

Experimento	Cloroquina (mmol)	Anidrido Succínico (mmol)	Potência (W)	Tempo (min)
12a	0,8	0,8	450	20
12b	0,8	0,8	450	15
12c	0,8	0,8	450	12
12 d	0,8	0,8	450	10
12e	0,8	0,8	450	8
12f	0,8	0,8	675	20
12g	0,8	0,8	675	15
12h	0,8	0,8	675	10
12i	0,8	0,8	675	5
12j	0,8	0,8	900	15
12k	0,8	0,8	900	10
12l	0,8	0,8	900	5

4.2.4.7 Método 7: ultrassom

Experimento 16

Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,5 g (1,6 mmol) de cloroquina base livre, 0,09 g (0,8 mmol) de ácido succínico e 5 mL de diclorometano anidro. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos. Acompanhou-se a reação por CCD e analisou-se no IV.

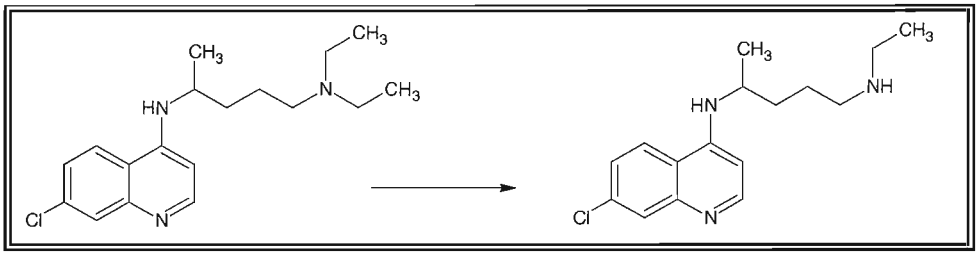
Experimento 17

As mesmas quantidades do Experimento 17 foram utilizadas e levou-se ao ultrassom por 2 horas. Acompanhou-se a reação por CCD e analisou-se no IV.

4.2.5 Estudos de síntese do derivado de duplicação molecular a partir da desetilcloroquina(DECQ)

4.2.5.1 Síntese de desetilcloroquina

Reação geral



4.2.5.1.1. Método 1: HBr

Em um balão de 2 bocas de 25 mL adicionaram-se 0,67 g (2 mmol) de cloroquina base livre e 0,3 mL de trietilamina e o meio foi mantido sob agitação por meia hora. A seguir, adicionou-se 0,19 mL de HBr 48%, sendo a reação mantida sob refluxo por 12 horas. Após purificação em coluna cromatográfica (sílica 230 MESH) e fase móvel acetato de etila e etanol (5:2) obteve-se líquido viscoso de coloração amarelada, que foi analisado por CCD, no IV e por RMN ^{1}H.

4.2.5.1.2 Método 2: I_2 (BAKKER, KASPERSEN, 1978)

Em um balão de 25 mL adicionaram-se 0,25 g (1 mmol) de I_2, 0,32 g (1 mmol) de cloroquina base livre e 10 mL de ácido acético e o meio foi mantido sob agitação e refluxo a 80 ^{0}C por 12 horas. O produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica (sílica 230

MESH) e fase móvel acetato de etila e etanol (5:2), obtendo-se líquido viscoso amarelado, que foi analisado por CCD e no IV.

4.2.5.1.3 Método 3: cloroformato de etila (KAPNANG, CHARLES, 1983)

Em um balão de 25 mL adicionaram-se 1 g (3 mmol) de cloroquina base livre solubilizada em 15 mL de éter etílico. Com o auxílio de uma seringa gotejou-se 0,30 mL (3 mmol) de cloroformato de etila, sob agitação. A reação foi mantida sob refluxo por 18 horas. O solvente foi evaporado e o produto obtido foi solubilizado em 15 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se 0,056 g (1 mmol) de KOH e refluxou-se por 15 minutos. O etanol foi evaporado e o produto, extraído com tolueno, foi isolado após rotaevaporação. Obteve-se líquido viscoso amarelo, que foi analisado por CCD e no IV.

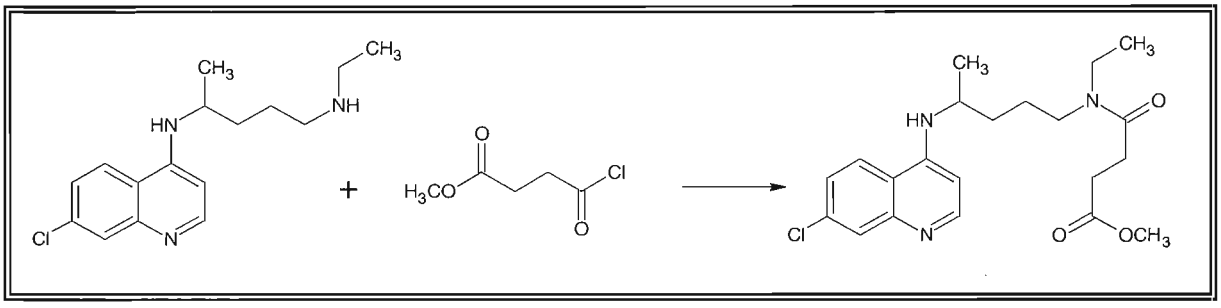
4.2.5.1.4 Método 4: NaH e cloroformato de etila (ANSARI, CRAIG, 1995)

Em um balão de 25 mL adicionaram-se 1,35 g (4,175 mmol) de cloroquina base livre solubilizada em THF anidro, 4,58 mmol de NaH (50% de dispersão em óleo mineral). Esta mistura reacional foi mantida sob refluxo por 2 horas sob atmosfera de argônio. Resfriou-se a 20 °C e solução de cloroformato de etila (0,45 mL, 4,7 mmol) e THF foi gotejada lentamente (cerca de 10 minutos). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 20 minutos e refluxo por 18 horas, sob atmosfera de argônio. O solvente foi evaporado e o resíduo tratado com água e extraído com benzeno. As fases orgânicas foram lavadas com água e solução de cloreto de sódio e secadas sob sulfato de sódio anidro. Após 24 horas, o solvente foi evaporado e o resíduo obtido foi solubilizado em ácido acético glacial a 15 °C. Zinco em pó foi adicionado em pequenas porções e o meio reacional foi mantido sob agitação por 4,5 horas à temperatura ambiente. A

mistura foi filtrada e a fase sólida lavada com metanol anidro. Os filtrados foram evaporados e diluídos com solução de hidróxido de amônio. Extraiu-se com diclorometano e lavou-se com água e solução de cloreto de sódio. As fases orgânicas foram secadas sob sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o solvente e o resíduo obtido foi transferido para coluna cromatográfica de sílica-gel com fase móvel clorofórmica e, em seguida, com clorofórmio e metanol, obtendo-se o produto final desejado.

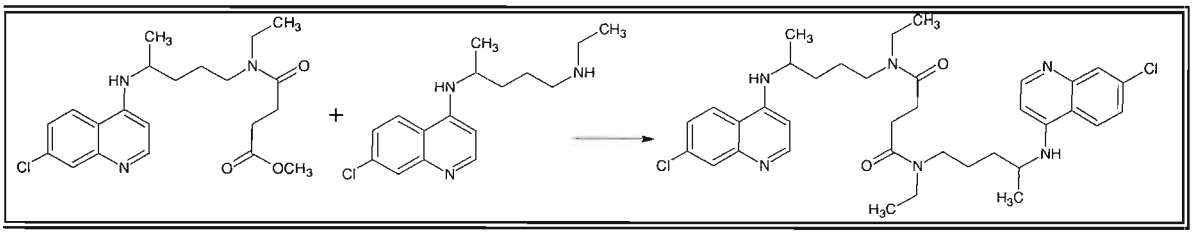
4.2.6 Síntese de succinildesetilcloroquina (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Reação geral



Em um balão de 10 mL adicionaram-se 0,1 g (0,35 mmol) de desetilcloroquina, 0,1 mL (0,7 mmol) de trietilamina, 0,05 mL (0,4 mmol) de 4-oxobutanoato de metila e 5 mL de diclorometano. O meio foi mantido sob agitação por 72 horas. O produto foi extraído com diclorometano/água. A fase orgânica foi secada sob sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. A reação foi acompanhada por CCD.

4.2.7 Estudos de síntese de pró-fármaco derivado de duplicação molecular da desetilcloroquina

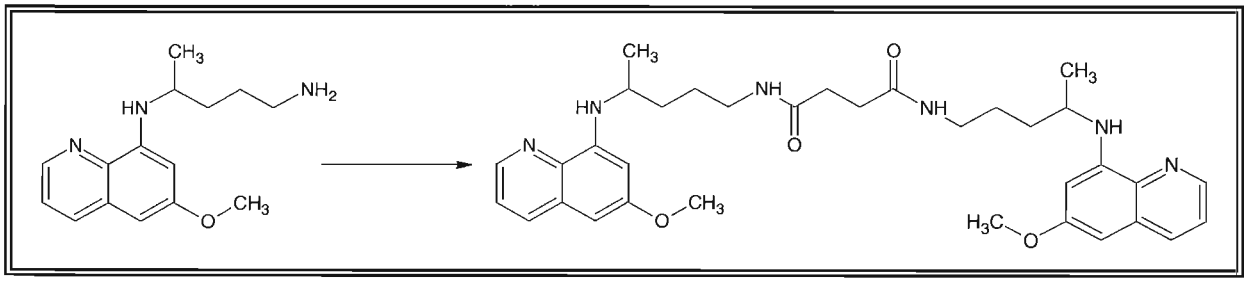


Em balão (1) de 25 mL adicionaram-se 0,1 g (0,25 mmol) de succinildesetilcloroquina, 0,07 g (0,50 mmol) de carbonato de potássio e 10 mL de metanol anidro. Manteve-se em agitação por 1 hora. O solvente foi removido sob pressão reduzida.

Em um balão (2) de 10 mL adicionaram-se 0,07 g (0,25 mmol) de desetilcloroquina, 0,01 g (0,25 mmol) de hidreto de sódio e 5 mL de tetraidrofurano (THF) anidro. Manteve-se sob agitação por 4 horas. Este meio reacional foi transferido para o balão 1 e mantido sob agitação por 72 horas.

4.2.8 Síntese de pró-fármaco derivado de duplicação molecular da primaquina (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Reação geral



4.2.8.1 Método 1: dicloreto de succinoíla

Em balão de 25 mL adicionaram-se 1,25 g (2,2 mmol) de difosfato de primaquina, 2,5 mL (13,2 mmol) de trietilamina, 0,23 mL

(1,5 mmol) de dicloreto de succinoíla, 0,04 g (0,22 mmol) de DMAP e 7,5 mL de $CHCl_3$ anidro. A reação foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por 12 horas. Obteve-se produto de cor preta, que foi analisado por CCD.

4.2.8.2 Método 2: succinilprimaquina e primaquina

4.2.8.2.1 Síntese da succinilprimaquina

Em balão de 100 mL solubilizaram-se 2,275 g (5 mmol) de difosfato de primaquina em 12,75 mL de etanol e, em seguida, adicionaram-se 1,4 mL (10,3 mmol) de trietilamina. Ao início do refluxo adicionou-se 0,627 g (6,25 mmol) de anidrido succínico e a reação permaneceu por uma hora, sob agitação. O produto foi resfriado sob agitação e, em seguida, adicionou-se água e o solvente foi evaporado. Após a precipitação, procedeu-se à filtração. O produto foi recristalizado de acetona.

4.2.8.2.2 Pró-fármaco derivado da duplicação molecular da primaquina

Experimento 18

Sob banho de gelo seco e acetona, adicionaram-se em balão de 50 mL, 0,23 g (0,5 mmol) de difosfato de primaquina, 38 mL de diclorometano anidro e 0,42 (3,3 mmol) de trietilamina. Em seguida, adicionou-se 0,22 g (0,6 mmol) de succinilprimaquina, 0,006 g (0,05 mmol) de DMAP e 0,12 g (0,6 mmol) de EDC. Manteve-se sob agitação por 1 hora em banho de gelo e 24 horas à temperatura ambiente. Efetuaram-se análises de CCD e no IV.

Experimento 19

Foi efetuado o mesmo procedimento anterior, utilizando, no entanto, o dobro das quantidades descritas.

Experimento 20

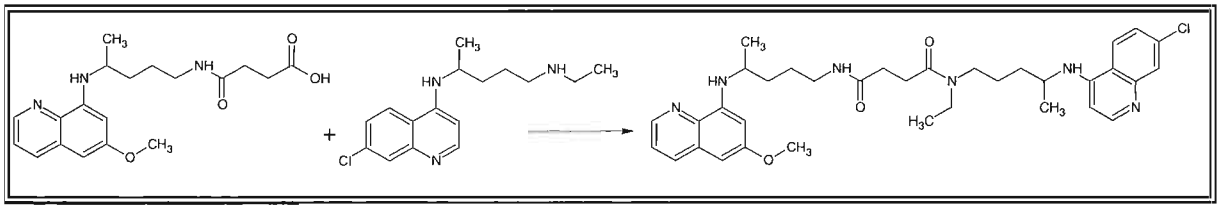
Em balão de 10 mL adicionaram-se 0,22 g (0,5 mmol) de succinilprimaquina, 0,084 g (0,52 mmol) de CDI e 3 mL de diclorometano anidro. A reação foi mantida sob banho de gelo e agitação por 20 minutos. Após este tempo, adicionou-se 0,23 g (0,5 mmol) de difosfato de primaquina e manteve-se sob agitação por 2 horas. Rotaevaporou-se o produto obtido, não sendo possível a precipitação em diversos solventes. Realizou-se, então, purificação através de coluna cromatográfica em sílica-gel (70-230 MESH).

4.2.8.3 Método 3: ácido succínico

Em balão de 50 mL adicionaram-se 0,11 g (1 mmol) de ácido succínico, 0,32 g (2 mmol) de CDI e 40 mL de diclorometano anidro. A reação foi mantida sob banho de gelo e agitação por 20 minutos. Após este tempo, adicionaram-se 0,92 g (2 mmol) de difosfato de primaquina, 1,6 mL (2 mmol) de trietilamina, mantendo-se sob agitação por 17 horas. Realizou-se análise por CCD e separação por cromatografia em coluna (sílica-gel 230 MESH). Isolou-se produto, que foi analisado por espectrometria no IV, RMN ^{1}H e ^{13}C, análise térmica (DSC).

4.2.9 Síntese do pró-fármaco recíproco desetilcloroquina-succinilprimaquina (FURNISS, HANNAFORD, SMITH, 1989)

Reação geral



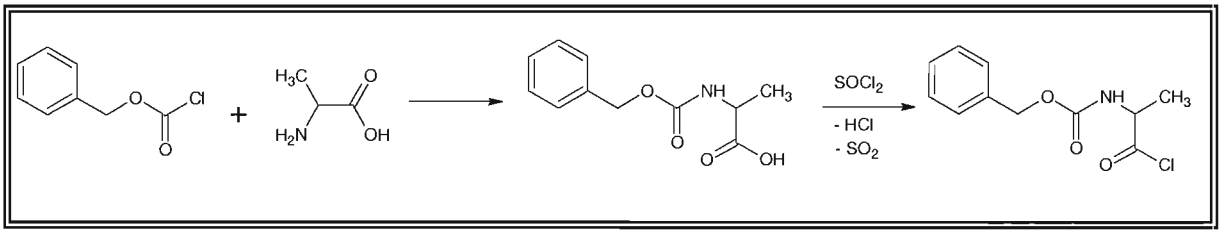
Em balão de 25 mL adicionaram-se 0,33 g (1 mmol) de succinilprimaquina, 0,15 g (1mmol) de EDC e 10 mL de diclorometano anidro, mantendo-se sob agitação em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, adicionaram-se 0,4 g (1mmol) de desetilcloroquina e 0,15 mL (1 mmol) de trietilamina. Manteve-se o meio reacional sob agitação por 72 horas. Extraiu-se com água e diclorometano, o produto foi secado sob sulfato de sódio e analisado por CCD, IV e RMN.

B. ESTUDOS DE SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS PEPTÍDICOS

4.2.10.Síntese dos peptídeos

*4.2.10.1 Síntese de aminoácidos protegidos (*BODANSZKY, BODANSZKY,1984)

- Síntese do cloreto de benziloxicarbonilalanina (CBzAla)

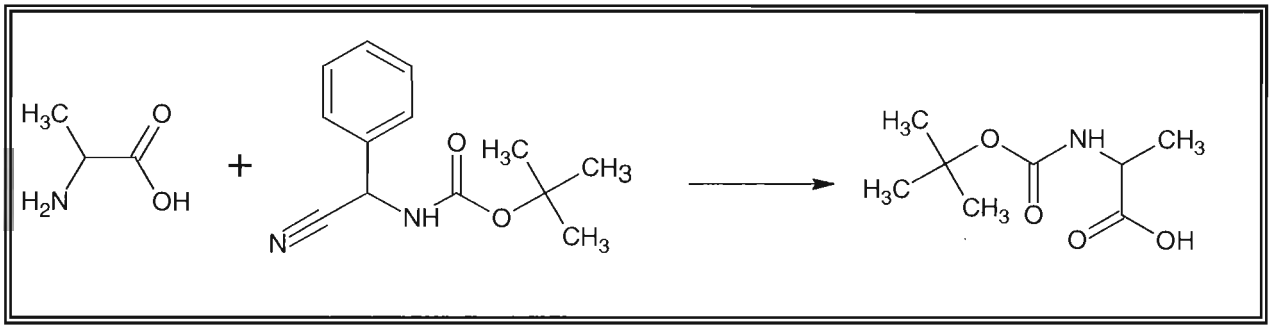


Em um balão de 50 mL adicionaram-se 1,73 g (10 mmol) de cloroformato de benzila, 0,89 g (10 mmol) de alanina, 0,4 g (10

mmol) de NaOH e 25 mL de clorofórmio. Manteve-se a mistura reacional sob vigorosa agitação por 24 horas. O produto foi extraído em água/clorofórmio, a fase orgânica secada sob sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. O produto obtido foi um sólido branco.

Em um balão de 50 mL adicionaram-se 2,23 g (10 mmol) de CbzAla e 0,9 mL (11 mmol) de cloreto de tionila. O meio reacional foi mantido sob refluxo por 2 horas. O cloreto de tionila excedente foi retirado sob pressão reduzida.

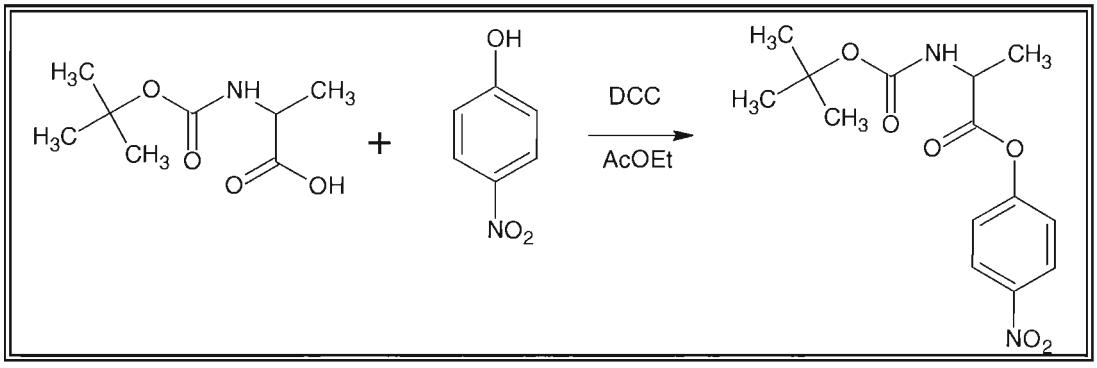
- Síntese de Boc-alanina



Em um balão de 100 mL, adicionaram-se 30 mL de água e 30 mL de dioxano, solubilizando-se 0,576 g (5,5 mmol) de alanina. Adicionaram-se, em seguida, 0,9 mL (6 mmol) de trietilamina e, por último, 1,365 g (5,5 mmol) de BOC-ON, mantendo-se a reação por 24 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, o pH foi baixado de 8 para 3, com ácido cítrico e, em seguida, efetuaram-se 4 extrações com 20 mL de acetato de etila cada. O solvente foi removido à pressão reduzida. Adicionou-se solução saturada a 10% de bicarbonato até alcalinizar a solução. Efetuaram-se, então, duas extrações com 20 mL cada de acetato de etila e lavou-se a solução uma vez com 30 mL de solução saturada 10% de bicarbonato de sódio e depois com 30 mL de água. O solvente da extração foi secado

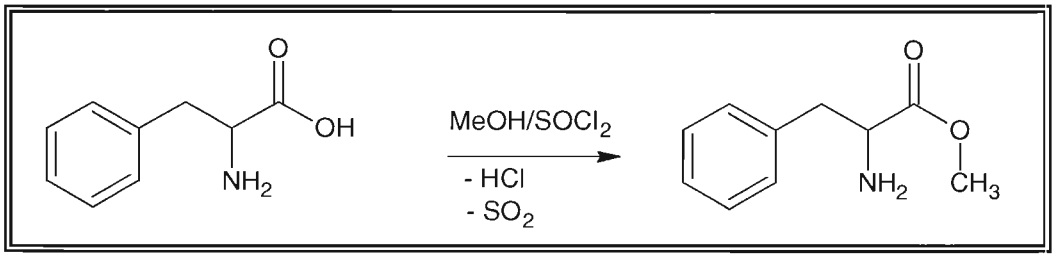
com sulfato de sódio e depois evaporado à pressão reduzida, isolando-se um sólido branco.

➢ Síntese do éster *p*-nitrofenílico da L-alanina



Em um balão de 100 mL, adicionaram-se 30 mL de acetato de etila à temperatura ambiente, 0,779 g (4 mmol) de BOC-alanina e 0,453 g (4 mmol) de *p*-nitrofenol, resfriando-se a mistura reacional até atingir temperatura de, aproximadamente, 5 °C, mantendo-se sob agitação por 10 minutos. Adicionaram-se, então, 0,812 g (4 mmol) de DCC em 4 porções de 0,200 g, em intervalos de 15 minutos, deixando-se em agitação por mais 30 minutos. Em seguida, retirou-se o banho de gelo, mantendo-se à temperatura ambiente por 12 horas. Após o termino da reação, filtrou-se o DCU formado e fizeram-se duas extrações com solução saturada de bicarbonato de sódio e o produto permaneceu na fase orgânica. Este foi evaporado à pressão reduzida, isolando-se, então, sólido cristalino branco.

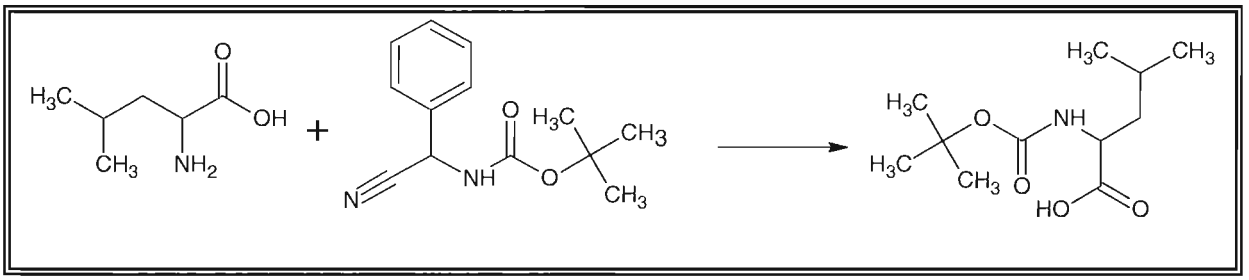
➢ Síntese do éster metílico da L-fenilalanina



Em um balão de 125 mL adicionaram-se, inicialmente, 50 mL de metanol em banho de gelo, mantendo-se por 15 minutos. Em

seguida, juntaram-se 8 mL (0,1 mol) de cloreto de tionila. Após 10 minutos, adicionaram-se 11,73 g (0,71mol) de fenilalanina, o banho de gelo foi retirado e o meio mantido à temperatura ambiente por 2 horas e 30 minutos. Realizaram-se, então, duas extrações com solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e o solvente foi retirado sob pressão reduzida.

- Síntese de Boc-leucina-OH

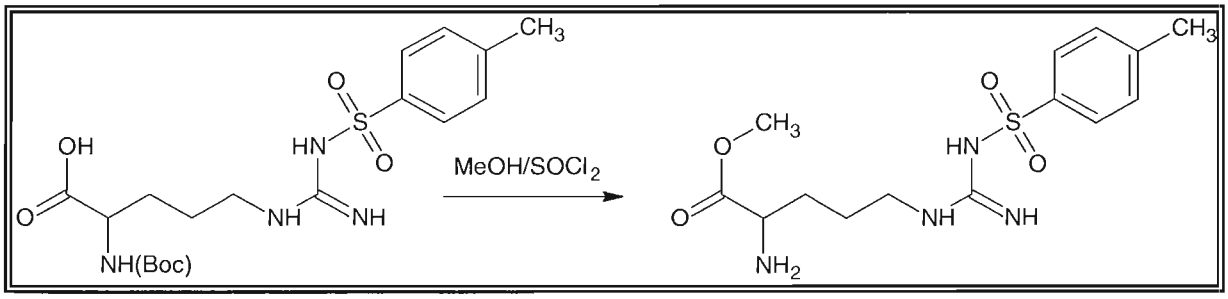


Em um balão de 100 mL, adicionaram-se 30 mL de água e 30 mL de dioxano, solubilizando-se 0,72 g (5,5 mmol) de L-leucina. Adicionaram-se, em seguida, 1,5 mL (11 mmol) de trietilamina e, por último, 1,35 g (5,5 mmol) de BOC-ON, mantendo-se a reação por 24 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, o pH foi baixado de 8 para 3, com ácido cítrico e, em seguida, efetuou-se extração com acetato de etila. O solvente foi evaporado e ao produto obtido adicionou-se solução 10% de bicarbonato e sódio. Extraiu-se novamente o produto com acetato de etila. O solvente foi evaporado e o produto analisado por CCD, no IV e por RMN ^{1}H.

4.2.10.2 Síntese de peptídeos - método clássico (BODANSZKY, BODANSZKY,1984)

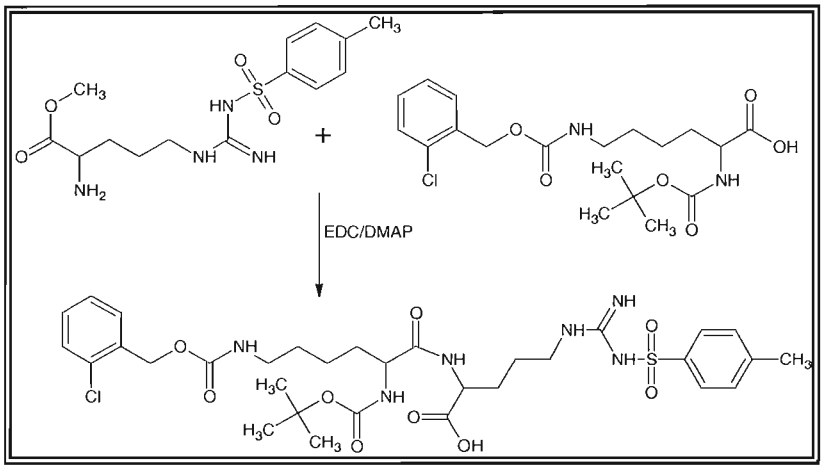
4.2.10.2.1 Síntese do peptídeo Boc-Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe

- Síntese do éster metílico do Boc-Arg(Tos)-OH



Em um balão de 25 mL adicionaram-se 1,29 g (3mmol) de Boc-Arg(Tos)-OH e, em seguida, juntaram-se 10 mL de metanol anidro e, sob gotejamento, 0,5 mL (6,5 mmol) de cloreto de tionila. O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente sob agitação por 2 horas. O produto obtido foi rotaevaporado até secagem, extraído com acetato de etila e solução saturada de bicarbonato de sódio por 3 vezes. A fase orgânica foi secada sob sulfato de sódio e rotaevaporado até secagem. Um produto amarelo claro foi obtido e analisado por CCD.

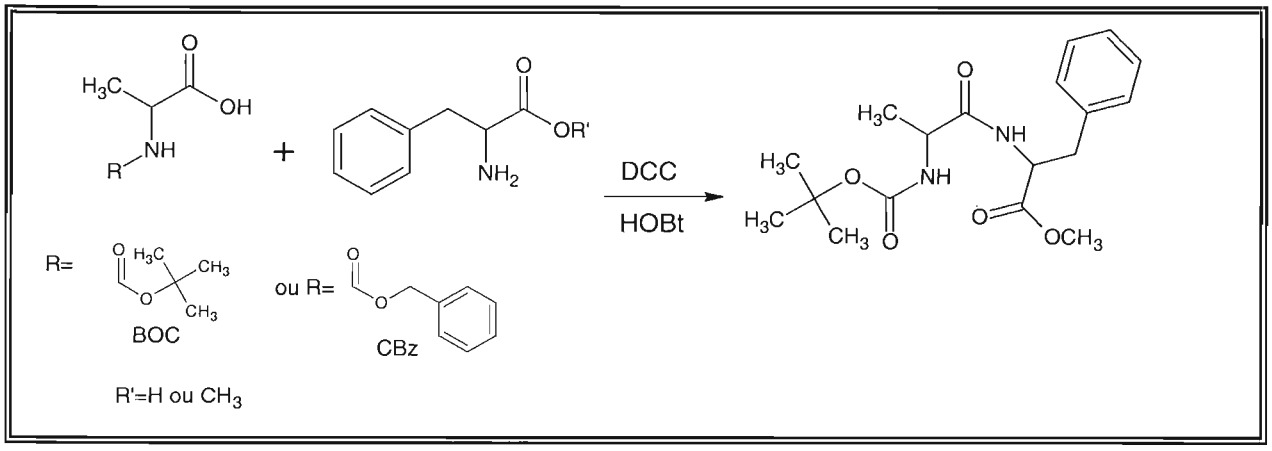
- Síntese do dipeptídeo Boc-Lys(ClZ)-Arg(Tos)OMe



Em um balão de 25 mL adicionaram-se 0,42 g (1mmol) de Boc-Lys-OH(ClZ), 10 mL de acetato de etila e 0,15 g (1mmol) de EDC. A mistura reacional foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, adicionaram-se 0,42 g (1mmol) de Boc-Arg(Tos)OMe e 0,01 g de DMAP.(0,1 mmol). Manteve-se a agitação por 12 horas e, a seguir, o produto obtido foi extraído com solução saturada de $NaHCO_3$, a fase orgânica retirada sob pressão reduzida, obtendo-se um produto viscoso de coloração amarelada.

4.2.10.2.2 Síntese do peptídeo alanilfenilalanina (Ala-Phe) protegido

Reação geral



Experimento 21 (a partir de CbzAla)

Em um balão de 50 mL adicionaram-se 1,65 g (10 mmol) de fenilalanina, 1,5 mL (15 mmol) de cloreto de CbzAla e 25 mL de clorofórmio e o meio reacional foi mantido sob agitação por 24 horas. O produto foi extraído em água/clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com solução saturada, e secada sob sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. Purificou-se o produto em coluna cromatográfica de sílica (230 MESH) com fase móvel acetato de etila e hexano (5:2).

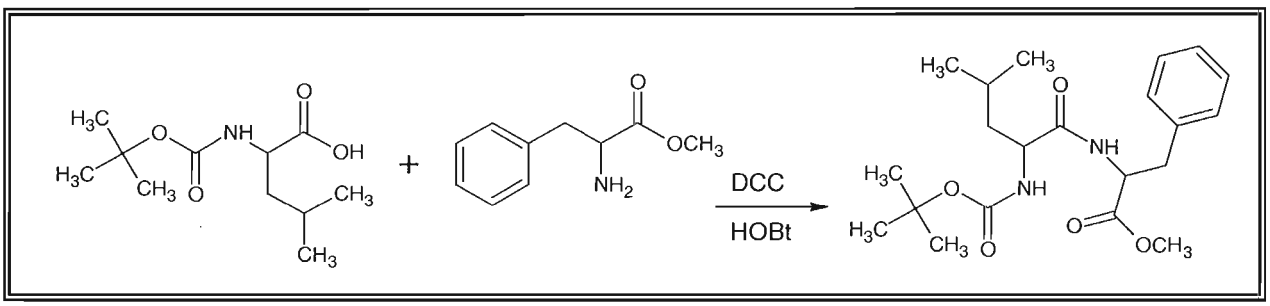
Experimento 22 (a partir de Boc-Ala)

Em um balão de 100 mL, adicionaram-se 30 mL de diclorometano e, em seguida, 0,9650 g (5 mmol) de BOC-alanina com 1,0320 g (5 mmol) de DCC. Adicionaram-se, então, 0,9158 g (5,1 mmol) de éster metílico da fenilalanina e 0,04 g (0,5 mmol) de DMAP e o meio reacional foi mantido sob agitação por 36 horas. Efetuou-se extração com água por duas vezes e uma última com solução saturada de bicarbonato de sódio. O solvente foi evaporado e obteve-se sólido ligeiramente amarelado.

Experimento 23 (a partir de Boc-Ala)

Em um balão de 25 mL solubilizaram-se 1,89 g (10 mmol) de Boc-Ala-OH em 5 mL de DMF em banho de gelo e, em seguida, adicionaram-se 1,79 g de éster metílico de fenilalanina (10 mmol), 2,06 g (10 mmol) de DCC e 1,35 g (10 mmol) de HOBt. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 3 dias. A seguir, adicionaram-se 20 mL de acetato de etila e filtrou-se a mistura reacional. A fase orgânica foi lavada por 3 vezes com 10 mL de solução de HCl 1 M, uma vez com 10 mL de solução de cloreto de sódio, 3 vezes com 10 mL de solução saturada de carbonato de sódio e duas vezes com 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica em sulfato de sódio anidro e evaporou-se sob pressão reduzida.

4.2.10.2.3 Síntese do peptídeo leucina-fenilalanina (Leu-Phe)



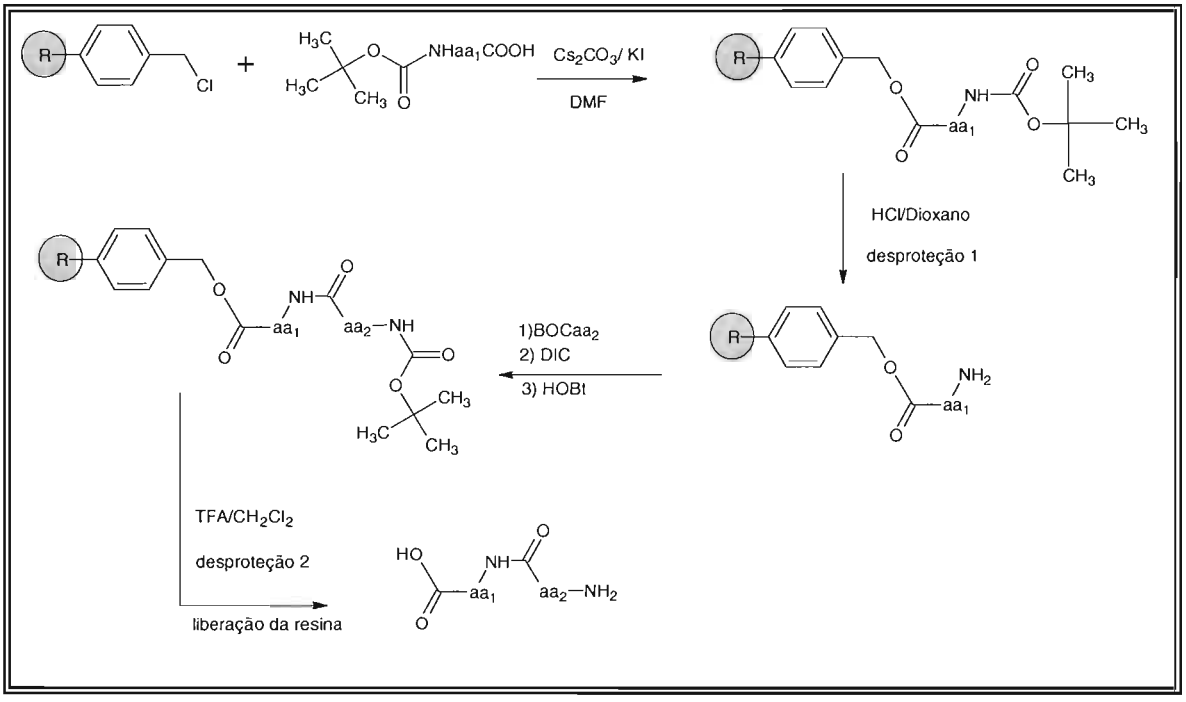
O mesmo procedimento do experimento 22 para Ala-Phe foi adotado, partindo-se de 10 mmol de cada reagente.

4.2.10.2.4 Desproteção do grupo BOC dos peptídeos formados

Os compostos peptídicos foram suspensos em diclorometano e resfriados em banho de gelo seco e acetona. À suspensão resultante adicionou-se ácido trifluoracético (TFA). Após 10 minutos a -70 °C, a reação foi mantida à temperatura ambiente, por 2 horas, sob agitação. Em seguida, o solvente e o TFA foram eliminados sob pressão reduzida. O produto obtido foi lavado com trietilamina e água e extraído com acetato de etila, secado sob sulfato de sódio e analisado por espectrometria no IV e por RMN.

4.2.10.3 Síntese de peptídeos - em fase sólida (SPFS) (BODANSZKY, BODANSZKY,1984; SEWALD, JAKUBKE,2002)

Reação geral



A síntese dos peptídeos Ala-Phe, Leu-Phe e Lys-Arg foi realizada utilizando-se a resina de Merrifield como suporte descrito

anteriormente, em solução e em microondas. As quantidades de aminoácidos protegidos, resina, agente acoplante, catalisador, solvente e tempo reacional estão detalhados no Quadro 3. A desproteção do grupo BOC em primeira etapa ocorre em meio de HCl/dioxano com agitação de 2 horas à temperatura ambiente e o desacoplamento da resina seguiu o método apresentado anteriormente.

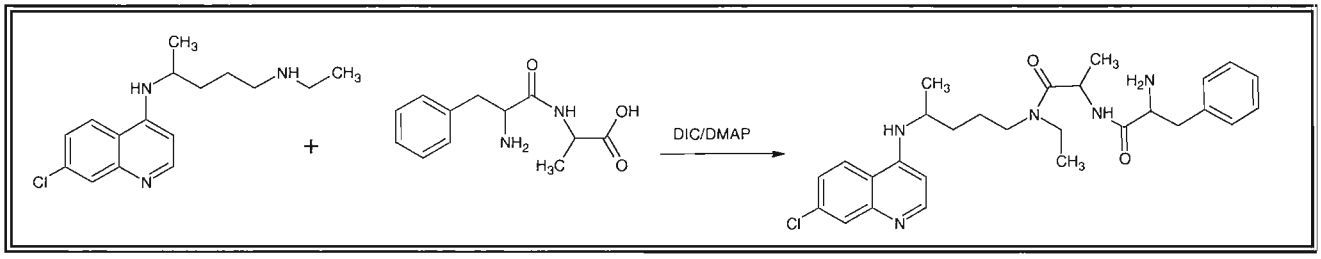
Quadro 3 - Condições reacionais da síntese de AlaPhe e LysArg com resina de Merrifield

	Em solução			**Em microondas**		
Peptídeo / **Reagentes**	**AlaPhe**	**LeuPhe**	**LysArg**	**AlaPhe**	**LeuPhe**	**LysArg**
Resina Merrifield	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg	400 mg
Cs_2CO_3	700 mg	700 mg	700 mg	700 mg	700 mg	700 mg
KI	332 mg	332 mg	332 mg	332 mg	332 mg	332 mg
Boc-Ala-OH	189 mg	-	-	189 mg	-	-
Boc-Phe-OH	265 mg	265 mg	-	265 mg	265 mg	-
Boc-Leu-OH	-	231 mg	-			
Boc-Arg(Tos)-OH	-	-	428 mg	-	-	428 mg
Boc-Lys-(2-Cl-Z)-OH	-	-	414 mg	-	-	414 mg
Tempo	12 h	12 h	12 h	9 min	9 min	9 min
HOBt	270 mg	270 mg	270 mg	270 mg	270 mg	270 mg
DIC	252 mg	252 mg	252 mg	252 mg	252 mg	252 mg
DMF	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

4.2.11 Estudo de síntese dos pró-fármacos peptídicos

4.2.11.1 Desetilcloroquina-alanilfenilalanina (DECQ-AlaPhe)

Reação Geral



Experimento 24

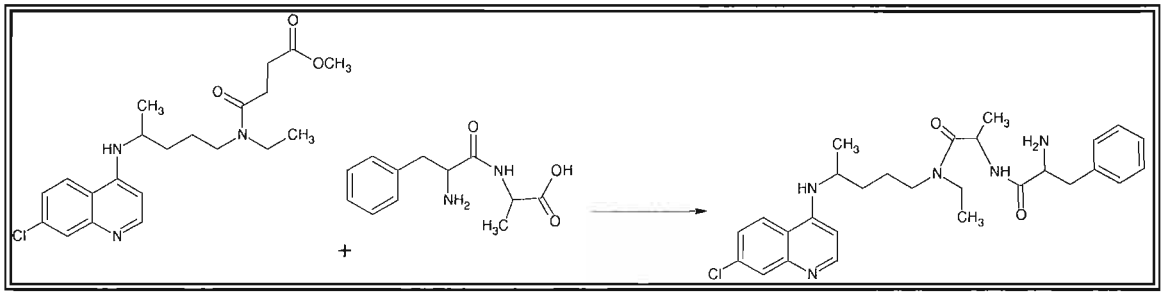
Em um balão de 25 mL adicionaram-se 0,25 g (1 mmol) de alanilfenilalanina, 0,15 g (1 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 0,13 g (1 mmol) de DIC e 10 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação e banho de gelo por 1 hora. A seguir, adicionaram-se 0,29 g (1 mmol) de desetilcloroquina e 0,15 mL (1 mmol) de trietilamina. Manteve-se a reação sob agitação à temperatura ambiente por 5 dias. Realizaram-se análises de CCD e no IV.

Experimento 25

Repetiu-se o mesmo procedimento do experimento 24 (0,15 g de HOBt, 0,13 g de DIC), substituindo-se a trietilamina por 0,29 g (1 mmol) de desetilcloroquina solubilizada por 4 horas em uma solução de 0,024 g (1 mmol) de NaH e 10 mL de diclorometano. A reação permaneceu por 5 dias sob agitação. Realizaram-se análises por CCD e no IV.

4.2.11.2 Estudos de síntese do pró-fármaco succinildesetilcloroquina-alanilfenilalanina (SDECQ-AlaPhe)

Reação Geral

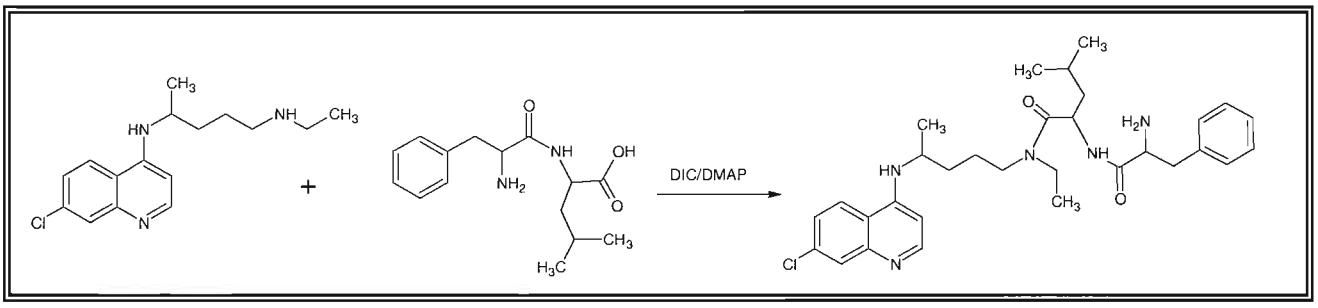


Experimento 26

Em um balão de 10 mL adicionaram-se 0,1 g (0,25 mmol) de succinildesetilcloroquina, 0,3 mL de MeOH e 0,028 de KOH. O meio reacional foi mantido sob agitação a 35 ^{0}C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água. Extraiu-se o produto por 2 vezes com éter etílico. A fase orgânica foi seca sob Na_2SO_4 e, em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida. Ao produto obtido adicionaram-se 0,033 g (0,22 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 0,03 g (0,22 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIC) e 5 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação e banho de gelo por 1 hora. A seguir, adicionaram-se 0,05 g (0,22 mmol) de alanilfenilalanina, e 0,01 mL (0,22 mmol) de trietilamina. Manteve-se sob agitação à temperatura ambiente por 10 dias. Realizaram-se análises de CCD e no IV.

4.2.11.3 Estudos de síntese do pró-fármaco desetilcloroquina-leucina-fenilalanina (DECQ-LeuPhe)

Reação Geral



Experimento 27

Em um balão de 25 mL adicionaram-se 0,28 g (1 mmol) de alanilfenilalanina, 0,15 g (1 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 0,13 g (1 mmol) de DIC e 10 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação e banho de gelo por 1 hora. A seguir, adicionaram-se 0,29 g (1 mmol) de desetilcloroquina e 0,15 mL (1 mmol) de trietilamina. Manteve-se sob agitação à temperatura ambiente por 5 dias. Realizaram-se análises de CCD e no IV.

Experimento 28

Repetiu-se o procedimento do experimento 26 (0,15 g de HOBt, 0,13 g de DIC), substituindo-se a trietilamina por 0,29 g (1 mmol) por desetilcloroquina solubilizada por 4 horas em uma solução de 0,024 g (1mmol) de NaH e 10 mL de diclorometano. A reação permaneceu por 5 dias sob agitação. Efetuaram-se análises por CCD e no IV.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

4.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise calorimétrica diferencial (DSC) foram obtidas na faixa de temperatura de 0 a 500 ºC, utilizando razão de aquecimento de 10 ºC/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e massa de amostra em torno de 4 mg, suportada em cadinho de platina.

4.4 Método de Modelagem Molecular

Utilizou-se o programa SPARTAN para Linux versão 119 (Wavefunction Inc.) em computador dotado de processador Athlon 1.8.

Os cálculos foram efetuados empregando-se o método semi-empírico AM1 (Dewar, 1985). Este método é baseado no uso conjunto de leis da mecânica quântica (Equação de Schörendinger) em que o tratamento de elétrons foi restringido àqueles de valência, associado a dados experimentais, permitindo o cálculo de energia dos átomos e moléculas de modo rápido e preciso (SILVA, 2003). Em adição, este método tem sido reportado como capaz de reproduzir dados cristalográficos de compostos quinolínicos antimaláricos, fornecendo, ainda, dados físico-químicos e superfícies esteroeletrônicas capazes de explicar diferenças de atividade biológica (KARLE, BHATTACHARJEE, 1999; BHATTACHARJEE, KARLE, 1998; KARLE, BHATTACHARJEE, VENNERSTROM, 2002). Desta forma, pode ser considerado como método útil à interpretação de propriedades e ao planejamento de novos compostos desta classe química.

Com o objetivo de melhor avaliar a reatividade da cloroquina, o estudo de modelagem molecular foi efetuado para os isômeros *R* e *S* da cloroquina e seus derivados simplificados: cloroquina desmetilada (removido o grupo metila da cadeia lateral), 4-aminoquinolina, 4-alquil(isopropil)quinolina, 4,7-dicloroquinolina e para a cadeia lateral do fármaco novoldiamina acilada por grupo succinil no nitrogênio primário, denominada novoldiamina acilada e o amideto correspondente, denominado como amideto da novoldiamina.

Os compostos citados tiveram suas estruturas otimizadas por método MMFF94 (HALGREN,1996) e, em seguida, por AM1. A análise conformacional foi realizada empregando-se o método randômico Monte Carlo segundo *default* do programa. Os confôrmeros de menor energia mínima (estado gasoso) de cada estrutura foram selecionados e submetidos aos cálculos de determinação de ponto único (*single point*). A partir deste foram construídos os mapas de potencial eletrostático (MEPs) e mapas de orbital HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*, Orbital Molecular de Mais Alta Energia Ocupado). As faixas de energia selecionadas bem como as superfícies eletrônicas encontram-se no capítulo Resultados e Discussão.

4.5 Método de *Docking*

Para esta metodologia utilizou-se os confôrmeros de energia mínima obtidos por AM1 e realizou-se o cálculo *Ab initio* 3-21G no programa Gaussian e Gaussview. Foi utilizado o modelo CHELPG ("Charges from Electrostatic Grid Based"), a fim de se obter os mapas eletrostáticos dos compostos estudados.

Inicialmente a estrutura da falcipaína foi preparada utilizando o programa Deepview retirando-se o ligante glicerol, as moléculas de água e as cargas.

Os estudos de *docking* foram efetuados no programa GOLD, que utiliza metodologia para *docking* rígido. Os parâmetros utilizados foram: escolha do átomo 42 (referente à cisteína 25 da falcipaína), estrutura **1yvb** da falcipaína cristalizada disponível em pdb (www.pdb.org) e distância do sítio ativo de 15 Angstroms. Escolheu-se 100 ciclos onde os 10 melhores *scores* forams obtidos..

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de hidrogênio (RMN ^{13}C e ^{1}H)

Os espectros de RMN ^{13}C e ^{1}H foram obtidos em um espectrômetro Brüker, modelo Advance DPX300 – 300 MHz. Os solventes utilizados foram clorofórmio-d_3, acetona-d_6 e dimetilsulfóxido-d_6.

4.6.2 Espectrometria de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no IV, na região de 4000 a 400 cm^{-1}, foram obtidos em pastilhas de KBr ou NaCl no espectrofotômetro Bomem série Michelson.

4.6.3 Faixas de Fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-301(MICROQUÍMICA).

4.6.4 Cromatografia em Camada Delgada

Utilizaram-se cromatofolhas de alumínio com sílica-gel F_{254}. Utilizaram-se os seguintes sistemas eluentes:

Cloroquina, desetilcloroquina e seus derivados - AcOEt:NH_4OH:EtOH (5:2:2).

Primaquina, succinilprimaquina e seus derivados - $CHCl_3$:MeOH:HAc (95:5:3)

Aminoácidos protegidos e peptídeos - AcOEt: MeOH (5:1)

4.6.5 Cromatografia líquida de alta eficiência Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu Class VP 10A, com detector de ultravioleta, coluna C18-ODS-Shimadzu.

Para cloroquina, desetilcloroquina, primaquina e derivados o sistema eluente foi ACN:MeOH (5:3), comprimento de onda 274 nm, fluxo 1 mL/min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese dos compostos seguiu a ordem anteriormente descrita em Material e Métodos. Inicialmente, obteve-se cloroquina base livre para que as reações a partir dela fossem realizadas em meio orgânico. Como seu sal não é liberado em trietilamina, optou-se por seguir metodologia descrita na Farmacopéia Americana (2004), utilizando NaOH e extração com diclorometano. A formação da base livre ocorre com bom rendimento, porém, são necessários 3 dias em geladeira para se obter um sólido. Em seguida, sintetizaram-se os intermediários utilizados nos experimentos de obtenção dos pró-fármacos recíprocos desejados, ou de pró-fármacos derivados da duplicação molecular do antimalárico.

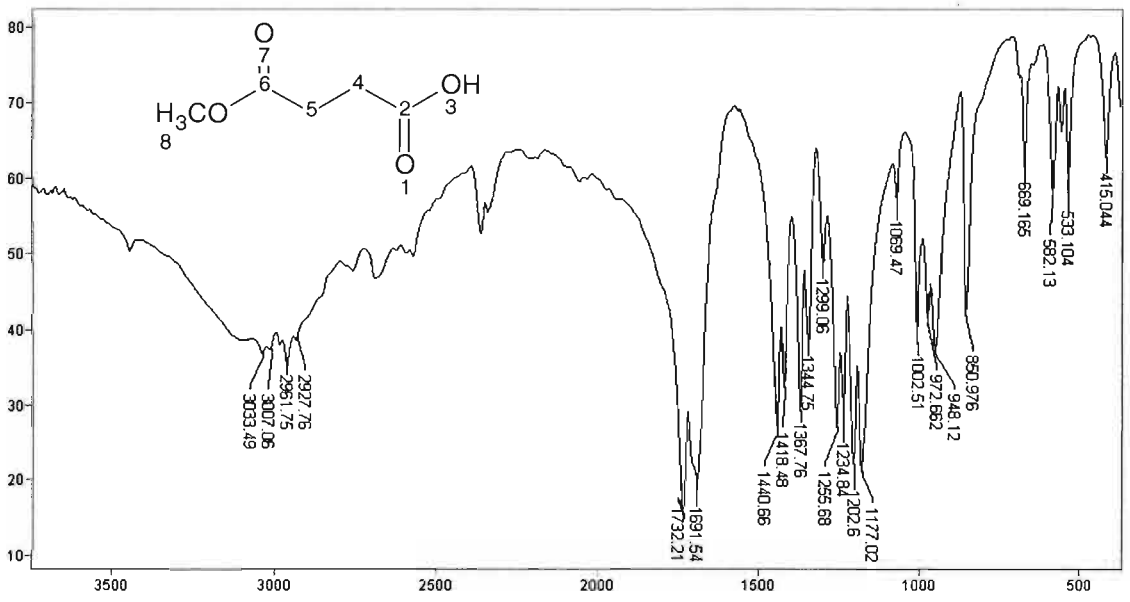
O Quadro 4 resume algumas características dos compostos cuja discussão de síntese e análises encontram-se a seguir.

Quadro 4 - Rendimento, Faixa de Fusão e Ponto de Ebulição

Composto	Faixa de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Rendimento (η=%)	Característica física
monossuccinato de metila	56-57	-	95	Sólido branco
4-cloro-4-oxobutanoato de metila	-	141/ 10 mmHg	47	Líquido incolor
dicloreto de succinoíla	-	82/ 12 mmHg	42	Líquido incolor
Succinil-1-(dietilamino)-4-aminopentano (Succinilnovoldia-mina)	-	-	54	Líquido viscoso amarelo
Desetilcloroquina (DECQ)	81-83	-	63	Sólido amarelo
SuccinilDECQ	-	-	24	Líquido viscoso amarelo escuro
DECQ-Suc-DECQ	-	-	18	Líquido viscoso castanho
Primaquina(PQ)-SUC-PQ	>200	-	82	Sólido amarelo escuro
BOC-Ala	77-79	-	87	Sólido branco
BOC-Leu	84-86	-	81	Sólido branco
AlaPhe	>200	-	43	Sólido amarelo claro
LeuPhe	>200	-	40	Sólido amarelo
Boc-Lys(ClZ)-(Tos)Arg-OMe	>200	-	32	Sólido castanho claro

5.1 Síntese do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila

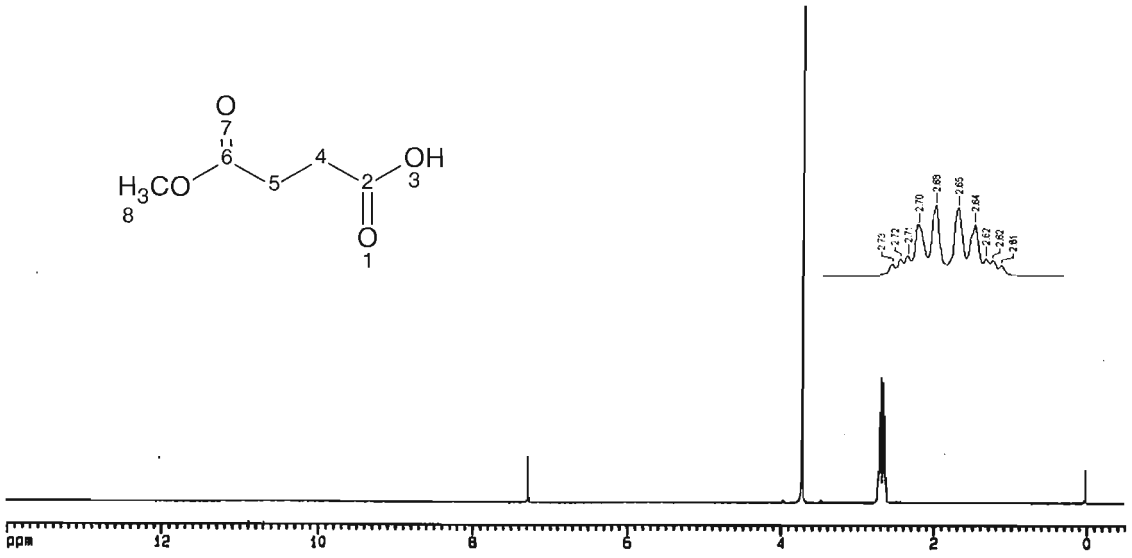
A síntese do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila ocorre em 4 etapas: formação do metóxido de sódio, formação do sal sódico do monossuccinato de metila, formação do monossuccinato de metila, caracterizado no infravermelho, em que se observa banda do éster metílico em 1732 cm^{-1} (espectro 1) e do ácido, a 1.691 cm^{-1}; por RMN ^{1}H (espectro 2), com um multipleto na faixa 2,5-2,8 ppm característico dos grupos metilênicos e sinal em 3,71 ppm, referente ao grupo CH_3 do éster metílico e por RMN ^{13}C (espectro 3), em que todos os carbonos presentes na sua estrutura foram identificados. Por fim, forma-se o 4-cloro-4-oxobutanoato de metila, caracterizado no infravermelho (espectro 4), em que se observa banda de éster em 1735 cm^{-1} e banda de cloreto de ácido em 1790 cm^{-1}. O espectro de RMN ^{1}H (espectro 5) mostra dois tripletos um em 2,66 ppm e outro em 3,23 ppm, relacionados aos grupos metilênicos da estrutura.



Espectro 1 – IV (em KBr) do monossuccinato de metila.

Tabela I – Atribuições do espectro no infravermelho do monossuccinato de metila

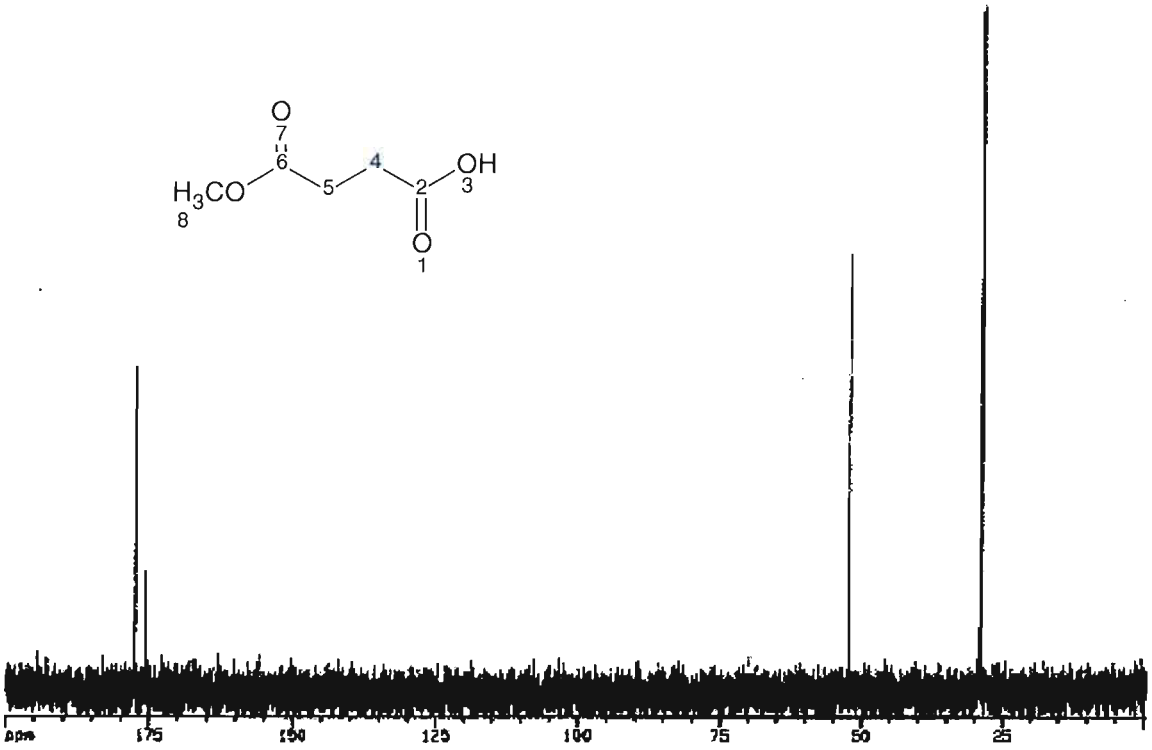
ν (KBr, cm^{-1})
2961(νCH $_{alif\ sim}$);2927 (νCH $_{alif\ assim}$); 1732(νCO,COOR); 1691(νCO, COOH)



Espectro 2 – RMN ^1H do monossuccinato de metila (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela II – Atribuições do espectro de RMN ^1H do monossuccinato de metila

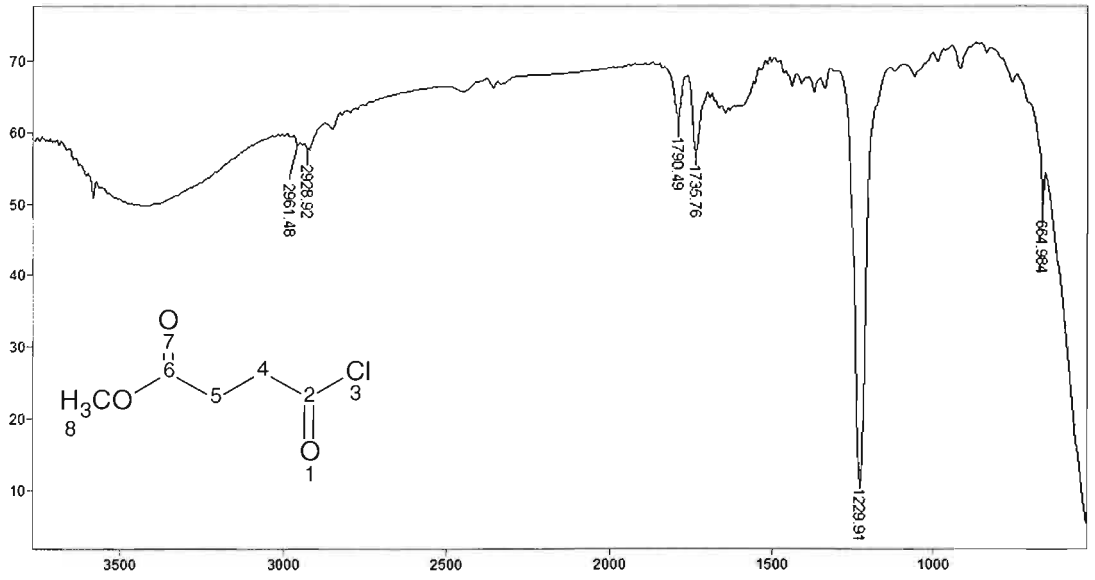
RMN ^1H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
2,52-2,81 (m, $H_{4,5}$, 4H); 3,71 (s, H_8, 3H)



Espectro 3 – RMN ^{13}C do monossuccinato de metila (75 MHz, D_2O, δ ppm).

Tabela III – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C do monossuccinato de metila

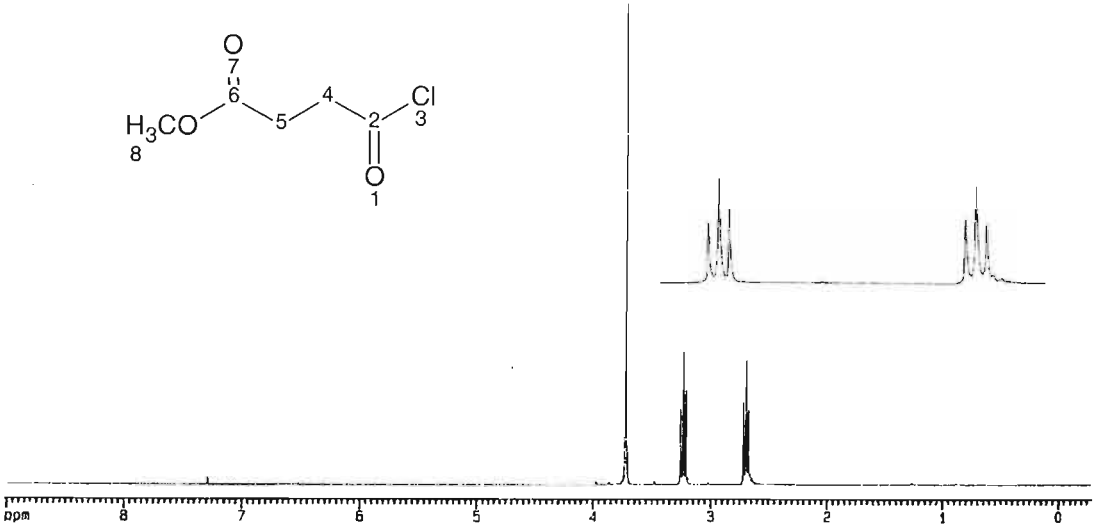
RMN ^{13}C (D_2O), 75 MHz, δ=ppm.
28 (C_4); 29(C_5); 52 (C8); 175 (C_6); 177 (C_2)



Espectro 4 – IV (em NaCl) do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila.

Tabela IV – Atribuições do espectro no infravermelho do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila

ν (cm^{-1}, NaCl)
2957(νCH sim); 2923(νCH assim);1790(νCOOCl); 1735(νCOOR)



Espectro 5 – RMN ^{1}H do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

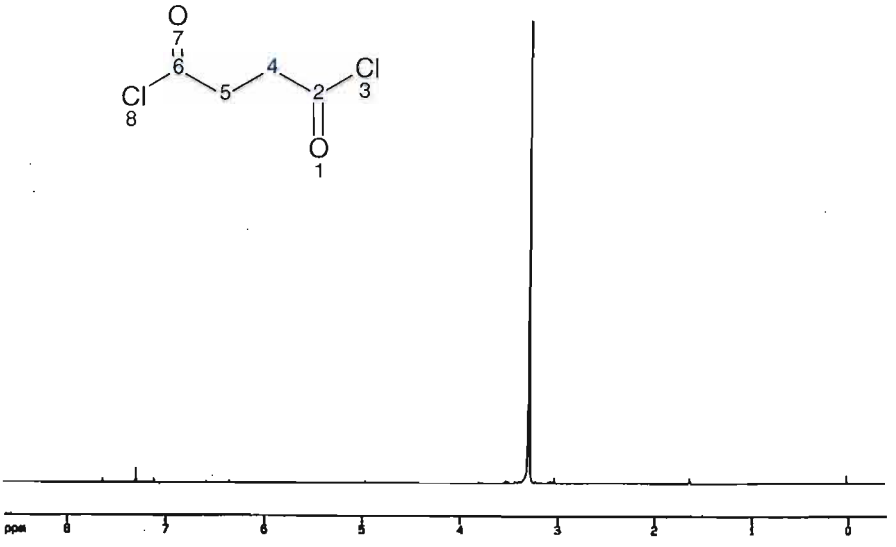
Tabela V – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
2,66 (t, H_5, 2H); 3,23 (t, H_4, 2H); 3,72 (s, H_8, 3H)

As três primeiras etapas de síntese ocorrem de maneira convencional, utilizando refluxo e evaporação de solvente, apresentando bons rendimentos. O 4-cloro-4-oxobutanoato de metila é obtido em forno de destilação e sua pureza só é garantida após o produto obtido ser purificado. Por se tratar de um cloreto de ácido possui baixa estabilidade, podendo ser guardado em freezer apenas por 5 dias.

5.2 Síntese do dicloreto de succinoíla

Outro intermediário de síntese obtido foi o dicloreto de succinoíla, mediante reação a partir da fusão entre pentacloreto de fósforo e ácido succínico. Esta reação ocorre sob refluxo e forma-se um intermediário: o oxicloreto de fósforo, que é retirado do meio reacional através de destilação simples. O dicloreto de succinoíla é obtido em forno de destilação. Assim como ocorre com o 4-cloro-4-oxobutanoato de metila, a pureza só é garantida após redestilação. Este produto foi armazenado em freezer e sua estabilidade é de 3 dias. Sua caracterização se deu através de RMN ^{1}H (espectro 6), em que se observa um singleto em 3,27 ppm, referente aos grupos metilênicos. Não foi possível realizar análise no infravermelho deste composto, devido a sua alta acidez, que ataca a pastilha de NaCl utilizada para obter espetros em compostos líquidos. Vale ressaltar que o manuseio deste intermediário requer condições completamente anidras, pois ocorre liberação de vapores de HCl em contato com qualquer umidade.



Espectro 6 – RMN ^{1}H do dicloreto de succinoíla (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela VI – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H do dicloreto de succinoíla

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
3,27 (s, $H_{4,5}$, 4H)

5.3 Síntese dos pró-fármacos recíproco e duplicados

A partir dos dois intermediários sintetizados, partiu-se para a síntese do pró-fármaco recíproco de cloroquina e primaquina e, também, para a síntese de pró-fármaco duplicado dos antimaláricos.

Todas as reações que envolveram a cloroquina foram extremamente difíceis de realizar. O fato de ela possuir um NH aromático secundário, pouco nuclelofílico e que envolve, ademais, impedimento estérico, dificultou as reações de acilação.

5.3.1 Derivados de cloroquina

A primeira tentativa foi a acilação da cloroquina com o 4-cloro-4-oxobutanoato de metila. Efetuaram-se várias tentativas, mudando-se as proporções dos reagentes e o tempo da reação. Ao se colocar proporção maior entre o agente acilante, a cloroquina e o DMAP (utilizado como catalisador nucleófilo), conseguiu-se obter um produto, com Rf diferente daquele da cloroquina. Efetuada a análise no IV, observou-se a formação de amida terciária. Procedeu-se, então, à extração com água, sendo a fase orgânica rotoevaporada à pressão reduzida. Obteve-se produto extremamente viscoso e escuro, que se mostrou insolúvel nos solventes deuterados disponíveis, dificultando a análise por RMN.

Esta síntese foi repetida por diversas vezes, obtendo-se, então, o produto acilado, porém segundo a análise por RMN, o produto obtido possuía impurezas. Várias tentativas de extração com solventes diversos foram realizadas, porém, não se conseguiu um produto puro.

Outros métodos de síntese foram realizados visando manter o meio extremamente básico para que o H da amina secundária pudesse ser abstraído. Realizaram-se reações com uso de bases

fortes, como NaH, reagente de Grignard, butil-lítio, ou mesmo com trifenilfosfina, porém não se obteve o produto esperado, ou houve apenas indícios, através de CCD, da sua formação em quantidades insuficientes para qualquer outra análise.

É importante ressaltar a carência de dados na literatura a respeito de reações envolvendo a amina secundária aromática da cloroquina, o que dificulta a busca por melhor rota sintética. No trabalho de Elslager e colaboradores (1969), descreve-se a acilação da cloroquina com cloreto de acetila, em meio clorofórmico e refluxo de 48 horas, com rendimento de 33%. No entanto, essa síntese foi repetida em nosso laboratório e os resultados não foram concordantes. Dessa forma, as tentativas foram baseadas no que existe na literatura a respeito de aminas secundárias aromáticas de maneira geral.

A partir do produto impuro da acilação da cloroquina, procedeu-se à reação com novo mol de cloroquina em meio de THF e NaH. Esta resultou em sinais no infravermelho e na RMN que confirmaram a formação do produto, porém o rendimento da reação, após 320 horas, foi baixo, obtendo-se material suficiente apenas para análise espectroscópica no infravermelho. Este método foi repetido diversas vezes e não foi reprodutível.

Partiu-se, então, para a reação com o dicloreto de succinoíla, que foi repetida várias vezes sem sucesso. Variou-se o tempo de reação, mas ainda assim o produto obtido era sempre viscoso, de coloração escura e insolúvel nos solventes deuterados disponíveis. Análise efetuada no infravermelho não mostrou banda característica de amida.

Na tentativa de se obter o produto, partiu-se para o uso de fusão dos reagentes ácido carboxílico e cloroquina, mas a quantidade obtida foi suficiente apenas para análise em RMN, o que constatou

formação do produto com o sinal em 2,52 ppm, referente aos grupos metilênicos do espaçante succinil, e sinais característicos da cloroquina como 0,96-1,00 ppm, referentes às metilas ligadas à amina terciária. Porém, este método não foi reprodutível.

Decidiu-se, então, utilizar reação em microondas, uma vez que o produto havia sido obtido no método de fusão. No entanto, mesmo variando quantidade de reagente, tempo e potência do forno microondas estas reações não resultaram no produto desejado. Uma hipótese para a não obtenção do produto é a falta de controle da temperatura no forno de microondas doméstico onde foram realizadas as reações, causando degradação da cloroquina ou mesmo sua carbonização. Isto não ocorreu com a fusão direta pois esta foi efetuada com temperatura e agitação controladas.

Utilizou-se o ultrassom como nova tentativa de duplicação da cloroquina, porém, mesmo utilizando lítio, com o intuito de se obter um organolítio, no meio reacional e variando tempo até 12 horas, o produto desejado não foi obtido.

Face às dificuldades encontradas, realizaram-se estudos de Modelagem Molecular com respeito à reatividade da cloroquina.

Inicialmente, a análise dos confôrmeros de R e S da cloroquina foi realizada para se selecionar aquele a ser empregado. Como estereoisômeros que são, estes apresentam propriedades físico-químicas como entalpia e energia de HOMO muito próximas. Semelhanças também são observadas nos confôrmeros de menor energia mínima (adotado o estado gasoso), em que os átomos se encontram em posições muito semelhantes e a cadeia lateral na forma estendida e afastada do anel heterocíclico (Figura 16).

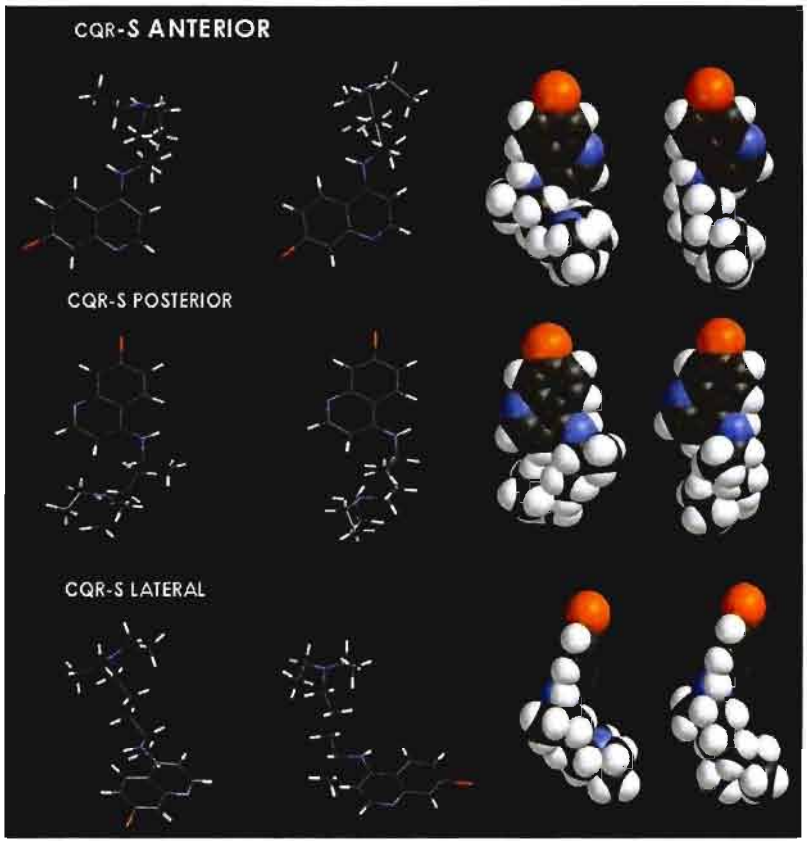


FIGURA 16 – Faces anterior, posterior e lateral dos confôrmeros de menor energia, confôrmeros *R* e *S* da cloroquina (esquerda e direita respectivamente), representados nos modelos tubo (esquerda) e CPK (direita). Átomos nas cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), nitrogênio (azul) e cloro (laranja).

Semelhanças também são observadas nas superfícies eletrônicas, como pode ser visto nos MEPs e de distribuição orbitalar de HOMO (Figura 17). Nestes pode-se observar a maior concentração eletrônica sobre o anel quinolínico (coloração verde a laranja) e, em especial, sobre o nitrogênio heteroaromático N1 (região vermelha), bem como pela concentração da distribuição dos orbitais de HOMO sobre esta região. Estes resultados mostram que esta região da molécula é a mais propensa a ataque eletrofílico.

A análise, em especial, do nitrogênio secundário N_4, em que se espera ocorrer a reação de acilação para formação do pró-fármaco recíproco, ou do pró-fármaco duplicado de cloroquina, mostra, entretanto, efeitos contrários. Impedimento estérico considerável da cadeia lateral sobre este átomo pode ser verificado (melhor visualizado no modelo CPK), o que restringiria em muito sua disponibilidade espacial como reagente. Associa-se a isto, a baixa nucleofilicidade do nitrogênio N_4, decorrente do efeito ressonante doador de elétrons deste átomo em direção ao anel quinolínico. Tal característica, representada nos MEPs pela fraca intensidade de coloração laranja sobre a região deste átomo (melhor visualizada na face posterior apresentada na Figura 17) comprometeria o caráter nucleofílico deste átomo. Ambas as condições tendem a desfavorecer reações por ataque deste átomo sobre centros eletrodeficientes, como o anidrido succínico, o que poderia explicar a grande dificuldade sintética encontrada até este momento para a obtenção do produto desejado.

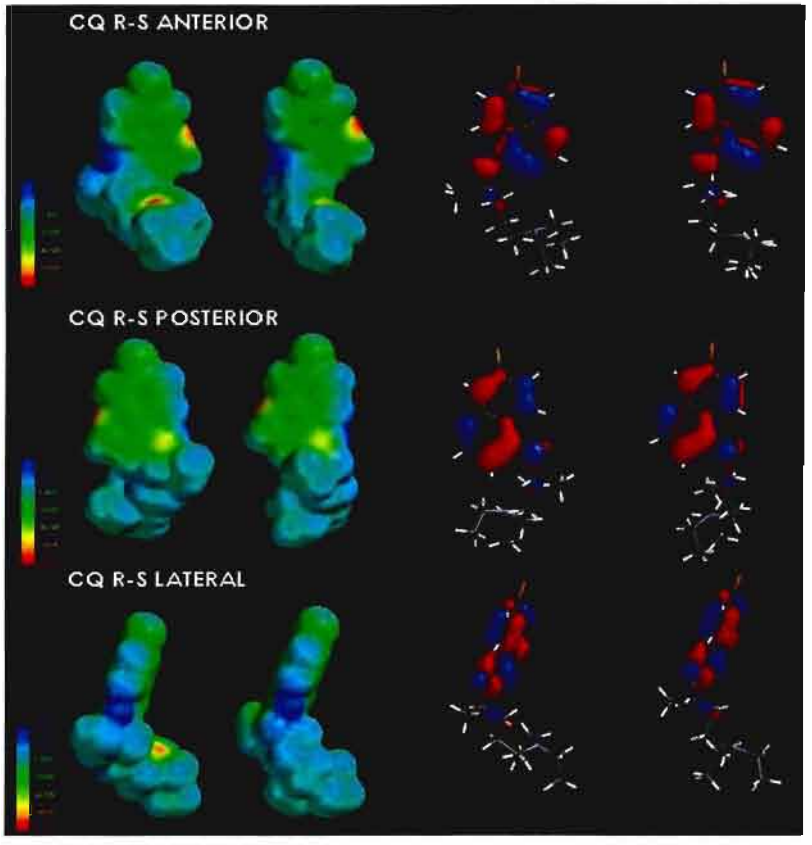


Figura 17 – À esquerda: mapas de potencial eletrostático (MEPs) da cloroquina calculados por AM1 e considerando densidade eletrônica total de 0,002 e/au^3. A distribuição de cores está na faixa −72 (vermelho intenso) a 35 (azul escuro) kcal/mol. À direita encontram-se os mapas de distribuição orbitalar de HOMO, calculados sobre densidade eletrônica de 0,032 e/au^3.

Como subsídio às análises anteriores, procurou-se avaliar o grau de importância de impedimento estérico da cadeia lateral sobre a reatividade do nitrogênio N_4. Para tanto, foram construídos os derivados simplificados da cloroquina: cloroquina desmetilada, 4-isopropilquinolina e 4-isopropilaminoquinolina. A análise dos confôrmeros de menor energia mínima do derivado desmetilado, bem como das estruturas otimizadas dos demais derivados, corrobora a análise de baixa reatividade da cloroquina por comprometimento estérico e eletrônico do nitrogênio N_4. As representações por modelo CPK e por MEPs (Figura 18) destas três estruturas reforçam a baixa reatividade da cloroquina pelo impedimento estérico e distribuição eletrônica desfavorável. Efeito obstrutivo sobre o N_4 é verificado nos 3 derivados que tiveram a cadeia lateral reduzida, o que mostra ser a substituição no átomo de nitrogênio, independente do tamanho da cadeia carbônica, o responsável pelo efeito estérico. Associa-se a este fato a maior densidade eletrônica no anel quinolínico do derivado 4-isopropilaminoquinolínico, quando comparado à do derivado 4-isopropilquinolina. O efeito doador de elétrons do grupo amino secundário torna, por efeito de ressonância, o anel heteroaromático mais rico em elétrons, o que é representado nos MEPs pela maior intensidade de coloração laranja desta região sobre o 4-isopropilaminoquinolínico.

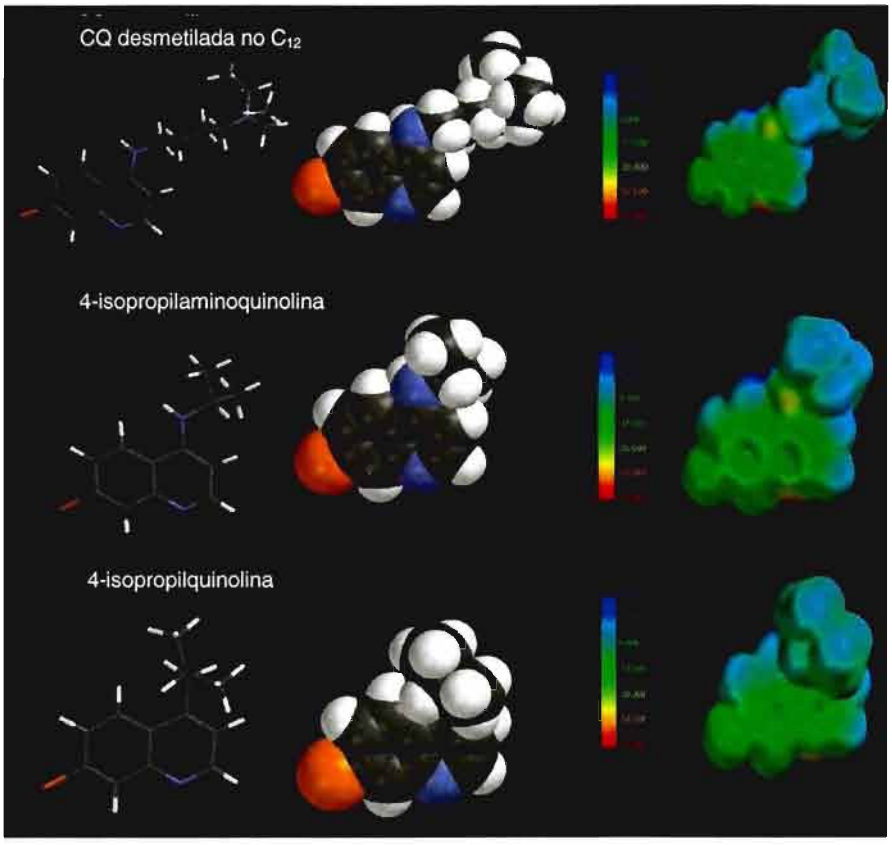
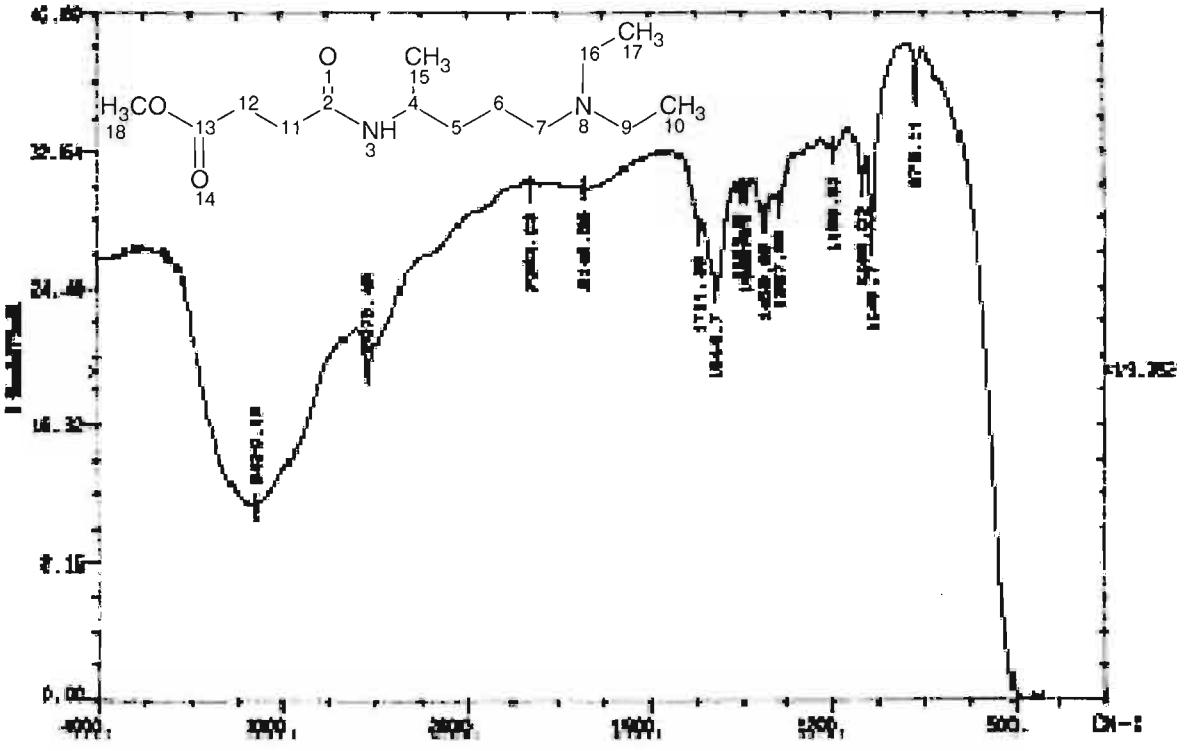


Figura 18 – Estruturas representadas pelo modelo tubo (esquerda), CPK (meio) e mapa de potencial eletrostático (MEP) com densidade eletrônica 0,002 e/au^3 calculadas por AM1 e distribuição de cores −70 (vermelho intenso) a 35 (azul escuro) kcal/mol.

Nova tentativa de acilação envolveu o uso de 1-(dietilamino)-4-aminopentano (novoldiamina), uma das matérias-primas utilizadas na síntese de cloroquina. A acilação da novoldiamina ocorre de maneira convencional, após 14 horas de agitação à temperatura ambiente. Sua formação foi confirmada no infravermelho em que apresentou banda de éster em 1711 cm^{-1} e banda de amida em 1644 cm^{-1} (espectro 7). A análise por RMN ^{1}H (espectro 8) confirmou a formação do produto com sinais em 2,44-2,66 ppm referentes aos grupos metilênicos provenientes do monossuccinato de metila e sinais em 1-1,06 ppm referentes aos grupos metilas da novoldiamina. Mistura física foi realizada e análise efetuada para garantir que o produto desejado realmente tinha se formado. Em seguida, reagiu-se a novoldiamina acilada com 4,7-dicloroquinolina e NaH. Inicialmente,

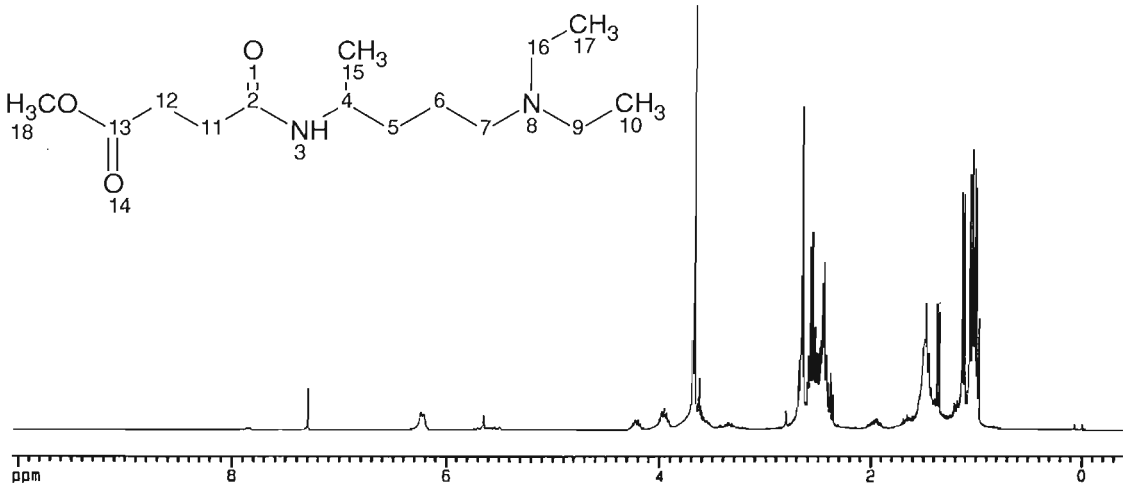
deixou-se por 4 horas, porém não houve formação de produto, variou-se o tempo em 12, 24, 36 e 48 horas, apesar da análise por CCD apresentar mancha diferente em relação aos reagentes. Análises no infravermelho e de RMN de hidrogênio não confirmaram a formação do produto, mas sim a degradação da novoldiamina acilada e formação de cloroquina.



Espectro 7 – IV (em KBr) da novoldiamina acilada.

Tabela VII – Atribuições do espectro no infravermelho da novoldiamina acilada

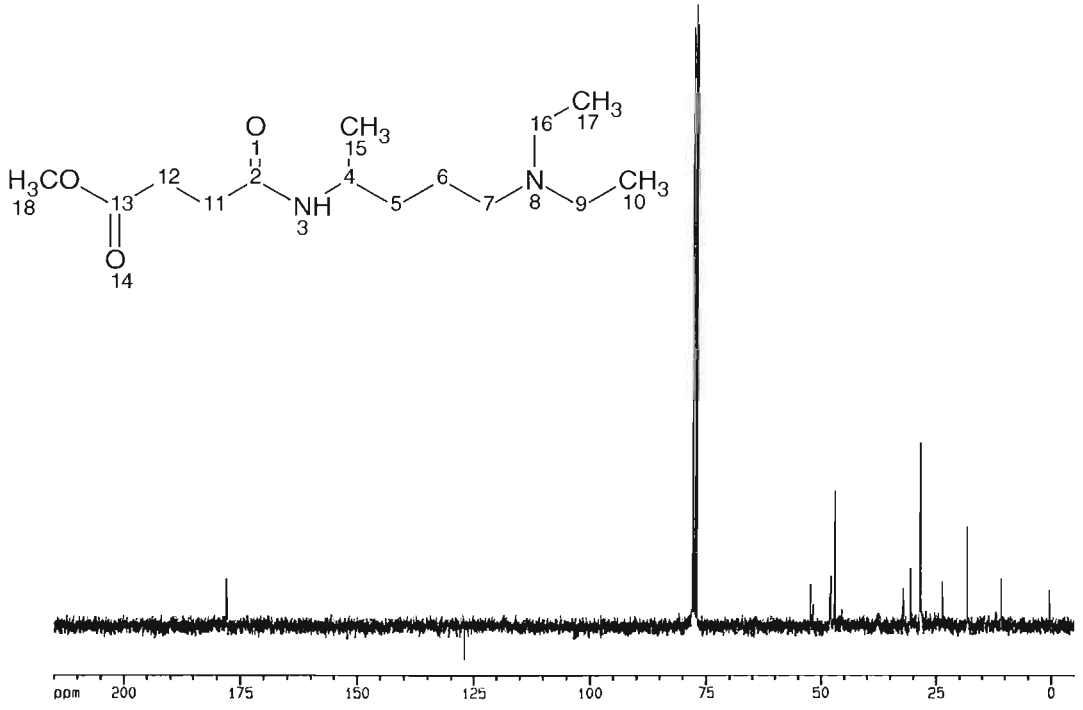
ν (cm^{-1}, KBr)
2978 (νCH_{sim}); 2953 (νCH_{assim}); 1711 (νCOOR); 1644 (νNHCO)



Espectro 8 – RMN ^{1}H da novoldiamina acilada (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela VIII – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da novoldiamina acilada

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1-1,06 (m,$H_{10,17}$,6H); 1,13 (d,H_{15},3H); 1,35-1,38 (m,H_5,2H); 1,48-1,49 (m,H_6,2H);2,44-2,66 (m,$H_{7,9,11,12,16}$,10H); 3,63 (s, H_{18},3H); 3,7-3,98 (m, H_4,1H); 6,23 (d,H_3, 1H)



Espectro 9 – RMN ^{13}C da novoldiamina acilada (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela IX – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C da novoldiamina acilada

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ= ppm
13,2(C_{10}, C_{17}); 20,7(C_{15}); 24,8(C_6); 29,8(C_{11}); 30,2(C_{12}); 35,8(C_5); 44,4(C_4); 49,7(C_9, C_{16}); 51,9(C_{18}); 53,1(C_7); 175,9(C_{13}); 176,3 (C_2)

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

O estudo de modelagem molecular da 4,7-dicloroquinolina foi realizado para verificar se o carbono da posição 4 seria mais reativo que o da posição 7 frente a ataque nucleofílico. Isto se confirmou pela observação de menor densidade eletrônica (azul ligeiramente mais intenso) sobre o carbono da posição 4 quando comparado àquele da posição 7 do anel quinolínico (Figura 19). Desta forma, o carbono da posição 4 é o ponto mais eletrofílico da molécula, o que explica a síntese seletiva da cloroquina por união da novoldiamina à 4,7-dicloroquinolina por esta posição do anel heterocíclico.

A modelagem molecular também mostra ser a acilação da novoldiamina favorecida, levando à formação do derivado amídico, apresentado na Figura 19. Porém, para que ocorra a reação com a 4,7-dicloroquinolina é necessário fazer uso do amideto da novoldiamina. Entretanto, a análise por modelagem molecular deste reagente mostra para o respectivo confôrmero de menor energia mínima haver, também, a combinação de efeito estérico e eletrônico no comprometimento do ataque nucleofílico e, por conseguinte, na formação do produto de acilação. Neste caso, ao efeito obstrutivo da cadeia lateral da novoldiamina se associa o efeito estérico da cadeia do succinil (Figura 19). Por sua vez, o nitrogênio do amideto mostra distribuição eletrônica desfavorável, em decorrência do efeito indutivo da carga negativa entre este átomo e a carbonila amídica, o que diminui a reatividade do nitrogênio, como pode ser visto no MEP através da extensão de coloração vermelho-alaranjada sobre os átomos em discussão (Figura 19). Estas características estéricas e eletrônicas, associadas à baixa estabilidade deste íon em solução, auxiliam a explicar os baixos rendimentos obtidos nos procedimentos desta síntese.

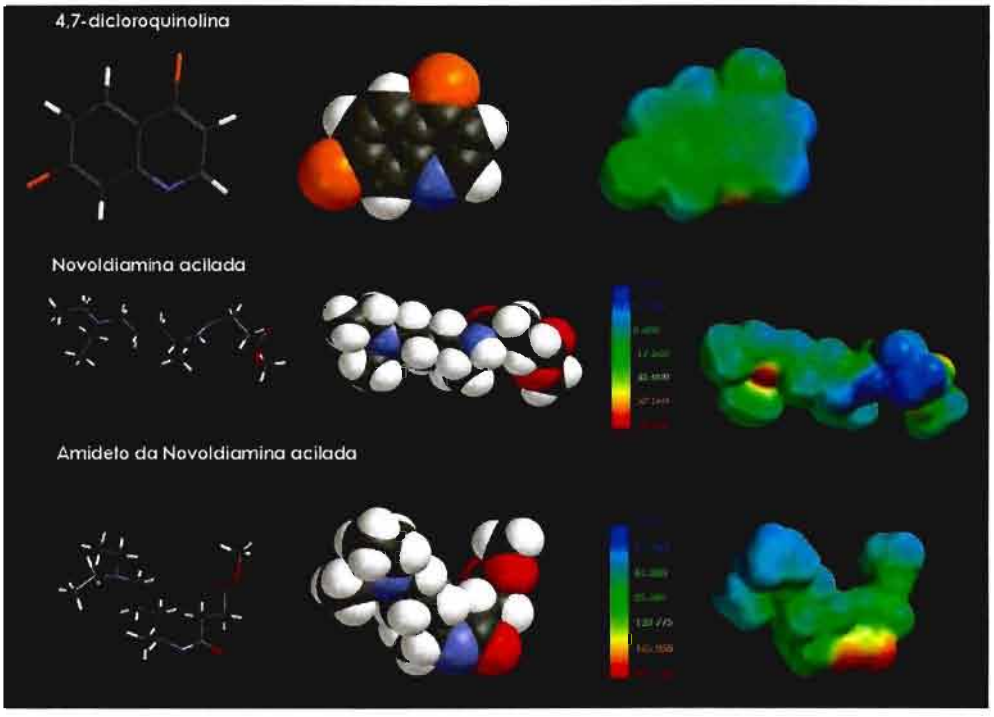


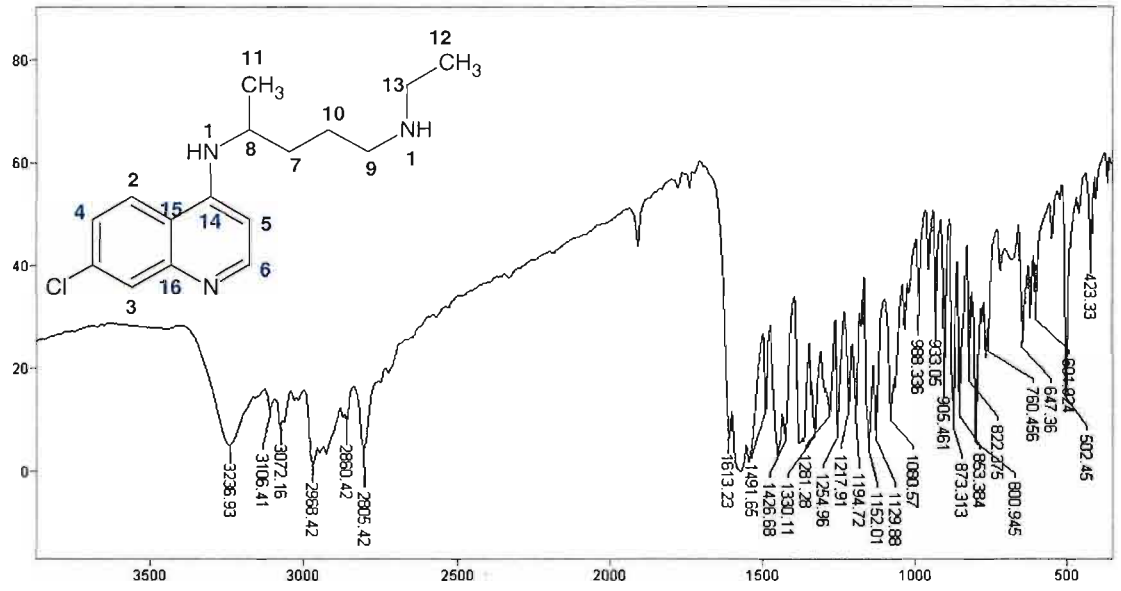
Figura 19 – Estruturas representadas pelos modelos tubo e CPK e mapas de potencial eletrostático (MEP) calculados por AM1 e distribuição de cores –70 (vermelho intenso) a 35 (azul escuro) kcal/mol, para as estruturas 4,7-dicloroquinolina e novoldiamina acilada e –200 (vermelho) a 10 (azul escuro) para o amideto da novoldiamina acilada.

Com base nos estudos de modelagem molecular, realizaram-se então, tentativas de síntese da desetilcloroquina, metabólito ativo do antimalárico (HELLGREN *et al.*, 1989).

A primeira tentativa foi realizada em presença de HBr 48%, porém, apesar de formar o produto desejado, o rendimento era de apenas 15%. Buscou-se, então, nova metodologia, utilizando-se iodo e ácido acético, como descrito por Bakker e Kaspersen, em 1978. Esta técnica é realizada para desalquilação de aminas substituídas. Porém, o produto desejado não foi obtido, ocorrendo cisão da cadeia lateral da cloroquina.

Como descrito por Kapnang e Charles, em 1983, o uso de cloroformatos de metila ou etila promove a cisão de grupos alquílicos de aminas substituídas. Esta síntese foi realizada e sua purificação se deu por cromatografia em coluna com sistema eluente clorofórmio:metanol (5:3). Porém, o rendimento foi muito baixo, de apenas 23%.

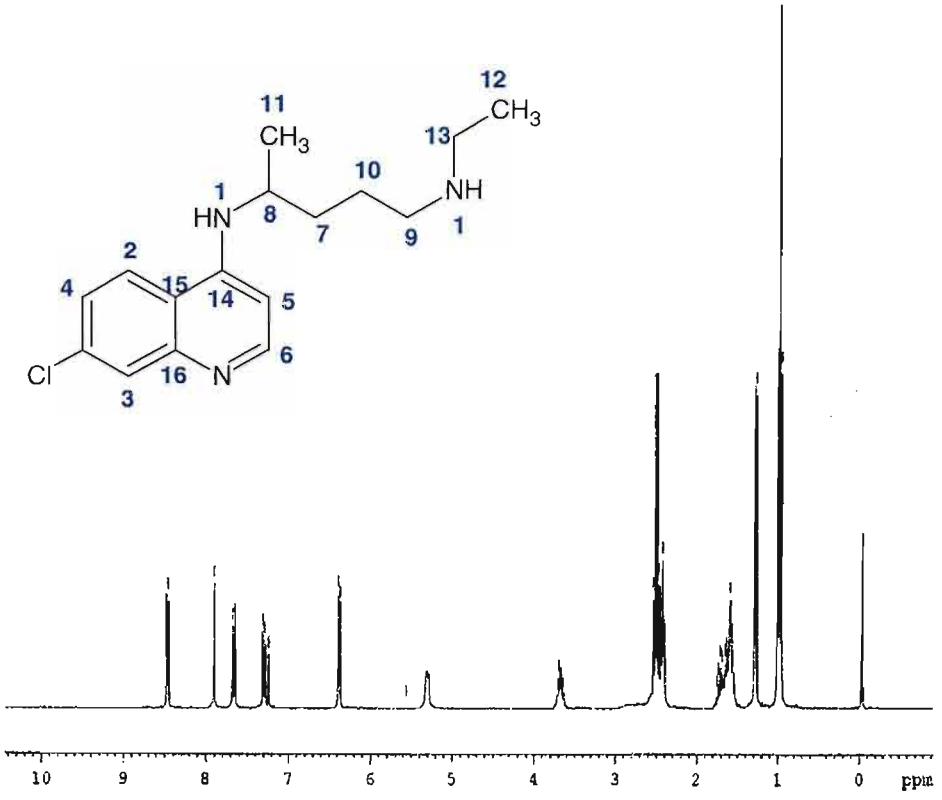
Nova rota de síntese foi realizada, desta vez descrita para a desalquilação da cloroquina por Ansari e Craig, em 1995. Utilizou-se NaH e cloroformato de metila e a formação dos intermediários foi eliminada na cromatografia em coluna, utilizando-se clorofórmio. A seguir, o sistema eluente foi modificado para clorofórmio:metanol (5:1), obtendo-se a desetilcloroquina. A análise no infravermelho (espectro 10) não foi muito eficiente, pois apenas um grupos alquílico foi retirado. Assim, a análise por RMN ^{1}H e RMN ^{13}C foi realizada e confirmou a formação do produto (espectros 11 e 12). Embora os sinais de CH_2 e CH_3 sejam coincidentes tanto para a cloroquina quanto para a desetilcloroquina, a integral destes mostra proporção de 3:1 referente ao CH_3 (C_{12}) e CH (C_6) da cadeia lateral, confirmando a obtenção do produto desejado.



Espectro 10 – IV (em KBr) da desetilcloroquina.

Tabela X – Atribuições do espectro no infravermelho da desetilcloroquina

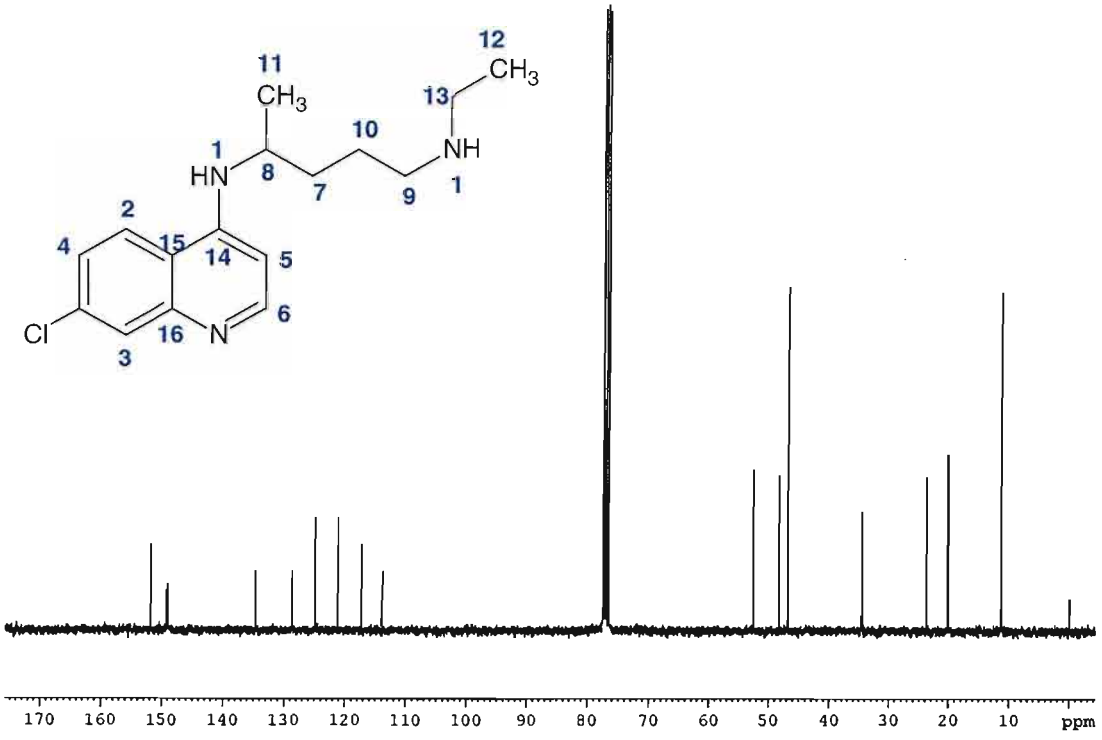
ν (cm^{-1}, KBr)
3236(νNH); 3106 (νCH $_{arom.sim}$); 3072 (νCH $_{arom.assim}$); 2868(νCH $_{alif.sim}$); 2860 (νCH $_{alif\ assim}$); 1613 (νC-NH); 601 (νC-Cl)



Espectro 11 – RMN ^{1}H de desetilcloroquina(300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XI – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da desetilcloroquina

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
0,98 (t, H_{12}, 3H); 1,27 (d, H_{11}, 3H); 1,57-1,74 (m, H_7, H_{10}.4H); 2,40-2,53 (m,H_9,H_{13},4H); 3,68 (m,H_8,1H); 5,55(s,H_1,2H); 6,38 (d,H_5,1H); 7,25(d,H_4, 1H); 7,31 (d,H_3,1H); 7,64 (d, H_2, 1H); 8,46 (d,H_6,1H)

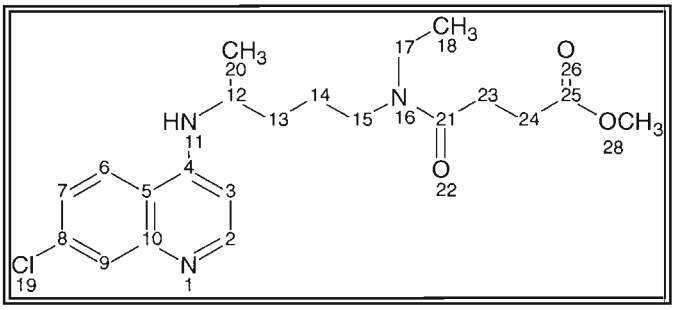


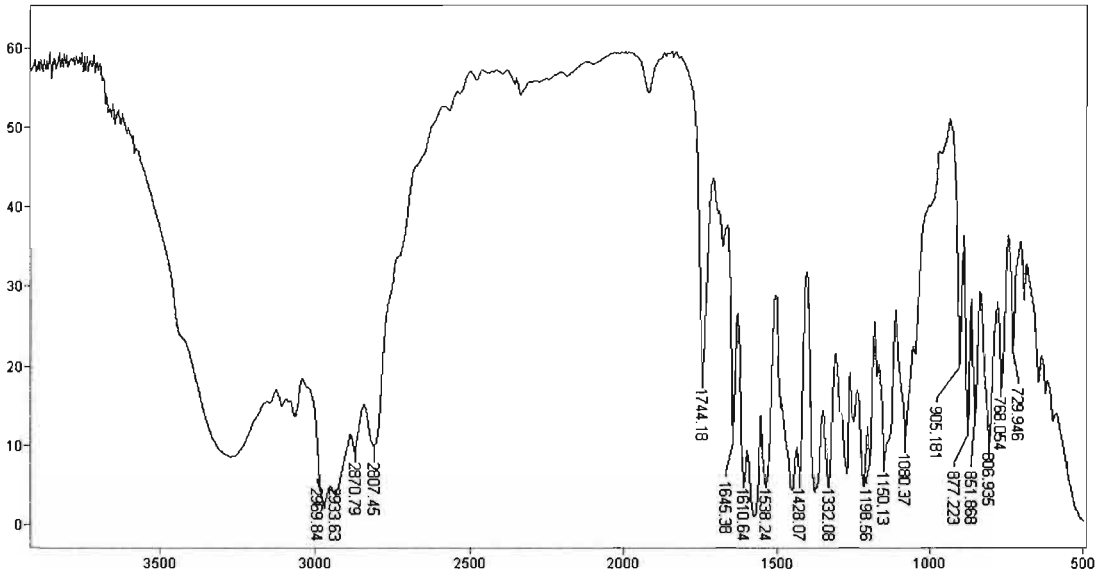
Espectro 12 – RMN ^{13}C de desetilcloroquina (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XII – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C da desetilcloroquina

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75MHz, δ= ppm
11,32(C_{12}); 20,18 (C_{11}); 23,79 (C_{10}); 34,53 (C_7); 46,82 (C_{13}); 48,30 (C_8); 52,55 (C_9); 111,89 (C_5); 117,35 (C_3); 121,25 (C_{15}); 124,96 (C_4); 128,76 ($C_{2,17}$); 134,74 (C_{14}); 149,37 (C_6); 151,99 (C_{16})

A síntese da succinildesetilcloroquina foi, então, efetuada a partir do 4-cloro-4-oxobutanoato de metila e o produto obtido foi analisado no infravermelho (espectro 13), em que as bandas de éster em 1744 cm^{-1} e amida em 1645 cm^{-1} caracterizaram o produto.





Espectro 13 – IV (em NaCl) de desetilcloroquina acilada.

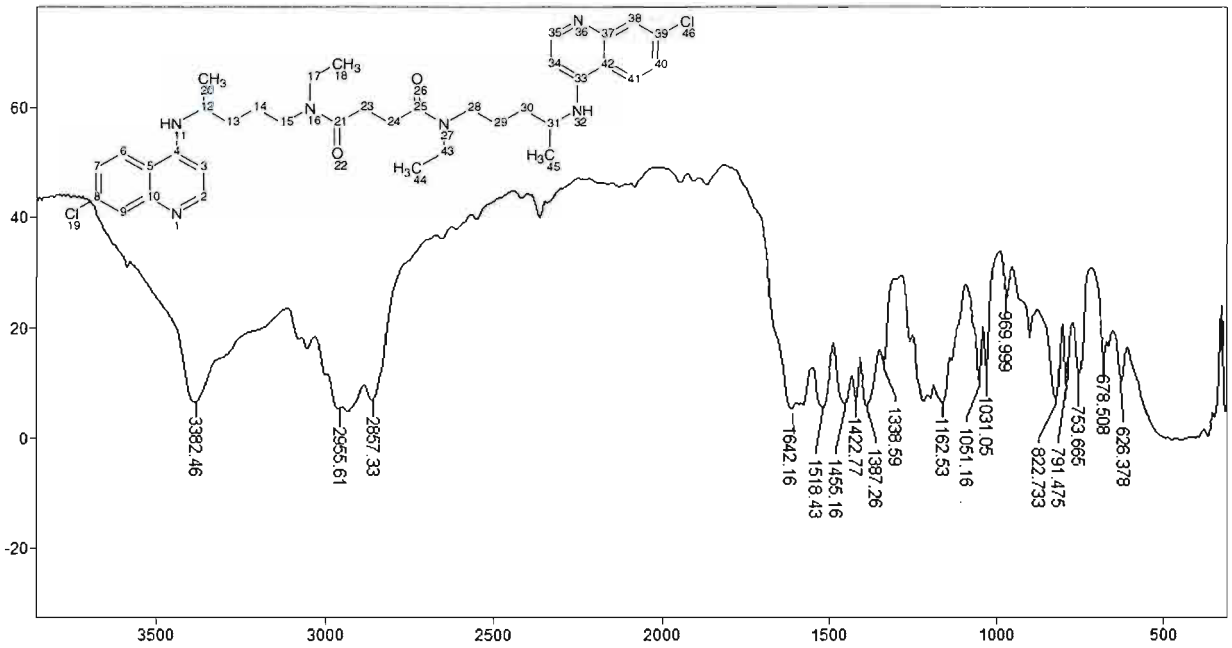
Tabela XIII – Atribuições do espectro no infravermelho da desetilcloroquina acilada

IV ν (cm^{-1}, NaCl)
3300 (νNH); 2969 ($\nu CH_{arom.sim}$); 2933 ($\nu CH_{arom.assim}$); 2870 ($\nu CH_{alif.sim}$); 2807 ($\nu CH_{alif.assim}$); 1744 (νCOOR); 1645 (νNHCO)

5.4 Derivado de desetilcloroquina (DECQSucDECQ)

A partir da succinildesetilcloroquina a obtenção do pró-fármaco derivado de duplicação molecular foi realizada em três etapas: a primeira foi realizada a partir da succinildesetilcloroquina e carbonato de potássio para que ocorresse a hidrólise do éster metílico. Esta etapa foi realizada, pois a reação direta da succinildesetilcloroquina, na forma de éster, com a desetilcloroquina não ocorreu conforme descrito em literatura para reações de formação de amida a partir de ésteres. Mesmo utilizando aquecimento e reação direta com o grupo amino da segunda molécula de desetilcloroquina não se obteve o produto final desejado. A segunda etapa foi a formação do amideto a partir de hidreto de sódio em THF anidro. A reação foi mantida por 4 horas a fim de se garantir a formação do amideto. Utilizou-se hidreto de sódio, pois este é um composto amplamente empregado na formação de amidetos, uma vez que garante o meio extremamente básico. A terceira e última etapa foi realizada com a reação do amideto obtido e o succinildesetilcloroquina com grupo ácido livre. Inicialmente, o tempo reacional foi de 24 horas, porém o baixo rendimento levou ao aumento do tempo reacional para 72 horas. A análise de CCD indicou a presença de alguns produtos diferentes dos materiais de partida, então se procedeu à purificação por coluna cromatográfica com eluente $CHCl_3$: MeOH (5:3). Dos produtos obtidos

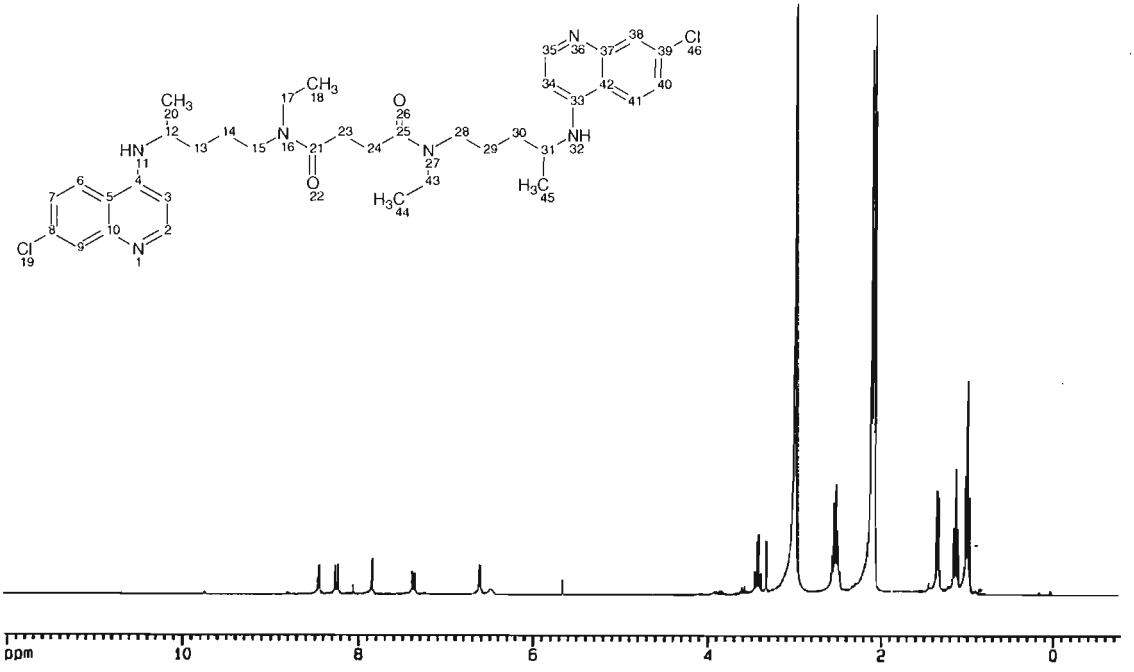
apenas um possuía banda característica de amida em 1642 cm^{-1} e desaparecimento da banda relativa ao éster(SUCDECQ). Procedeu-se, então, à análise por RMN ^{1}H e ^{13}C e o grau de pureza por CLAE, este indicou um produto puro com tempo de retenção em 2,78 minutos, sendo este tempo diferente dos compostos de partida e também da mistura física dos reagentes. O rendimento da reação foi de 17%. A obtenção de produto líquido extremamente viscoso impediu a determinação de faixa de fusão.



Espectro 14 – IV (em KBr) de DECQSucDECQ.

Tabela XIV – Atribuições do espectro no infravermelho da DECQSucDECQ

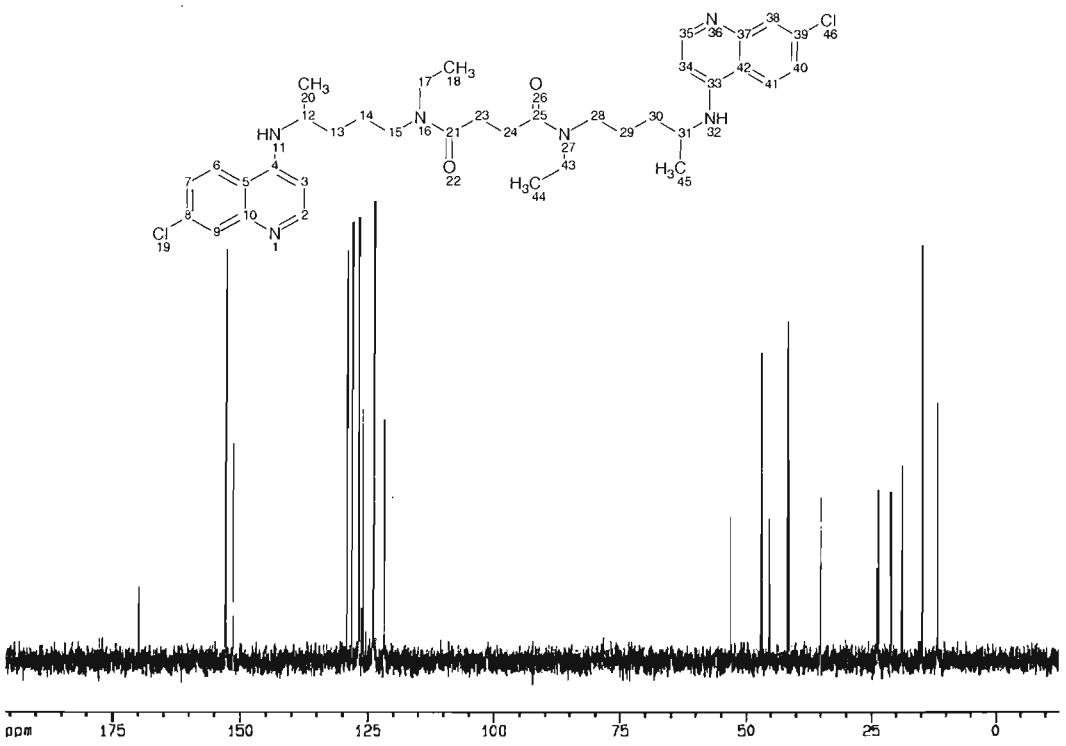
ν (cm^{-1}, KBr)
3382 (νNH), 2955 (νCH $_{arom.\ sim}$), 2857 (νCH $_{alif\ sim}$), 1642 (νNHCO), 1579 (νC=C),



Espectro 15 – RMN ^{1}H de DECQSucDECQ (300 MHz, DMSO-d6, δ ppm).

Tabela XV – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da DECQSucDECQ

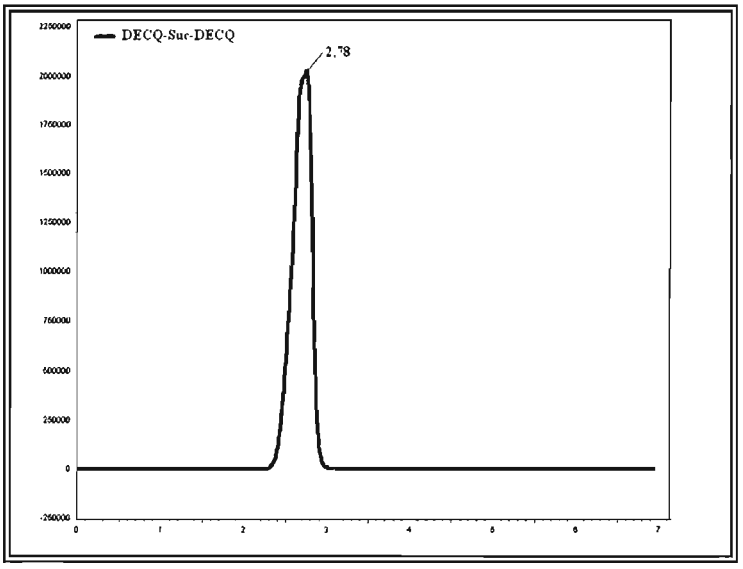
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1,16(d,H_{20}, 3H); 1,18(s, H_{45}, 3H); 1,43 (t, $H_{18,44}$, 6H); 1,52-1,56 (m, $H_{13,14,29,30}$, 8H); 2,83(s,$H_{23,24}$, 4H); 3,28-3,32 (m, $H_{15,17,28,43}$, 8H); 3,39-3,50 (m, $H_{12,45}$, 2H); 5,81(s, $H_{11,32}$, 2H); 6,89 (d,$H_{3,34}$, 2H); 7,32 (d,$H_{7,40}$, 2H); 7,58 (d,$H_{9,38}$, 2H); 8,06 (d, $H_{6,41}$, 2H); 8,21 (d, $H_{2,35}$, 2H)



Espectro 16 – RMN ^{13}C de DECQSucDECQ
(75 MHz, DMSO-d6$_3$, δ ppm).

Tabela XVI – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C de DECQSucDECQ

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75MHz, δ= ppm
14,32 ($C_{18,44}$); 20,42 ($C_{20,45}$); 26,72 ($C_{14,29}$); 31,33 ($C_{23,24}$); 32,46 ($C_{17,43}$); 36,89 ($C_{15,28}$); 48,29 ($C_{12,31}$); 51,52 ($C_{3,34}$); 113,38 ($C_{5,42}$); 121,18 ($C_{9,38}$); 127,05 ($C_{7,40}$); 136,03 ($C_{8,39}$); 143,35 ($C_{6,41}$); 145,28 ($C_{4,33}$); 149,94 ($C_{2,35}$); 151,16($C_{10,37}$); 170,88 ($C_{21,25}$)



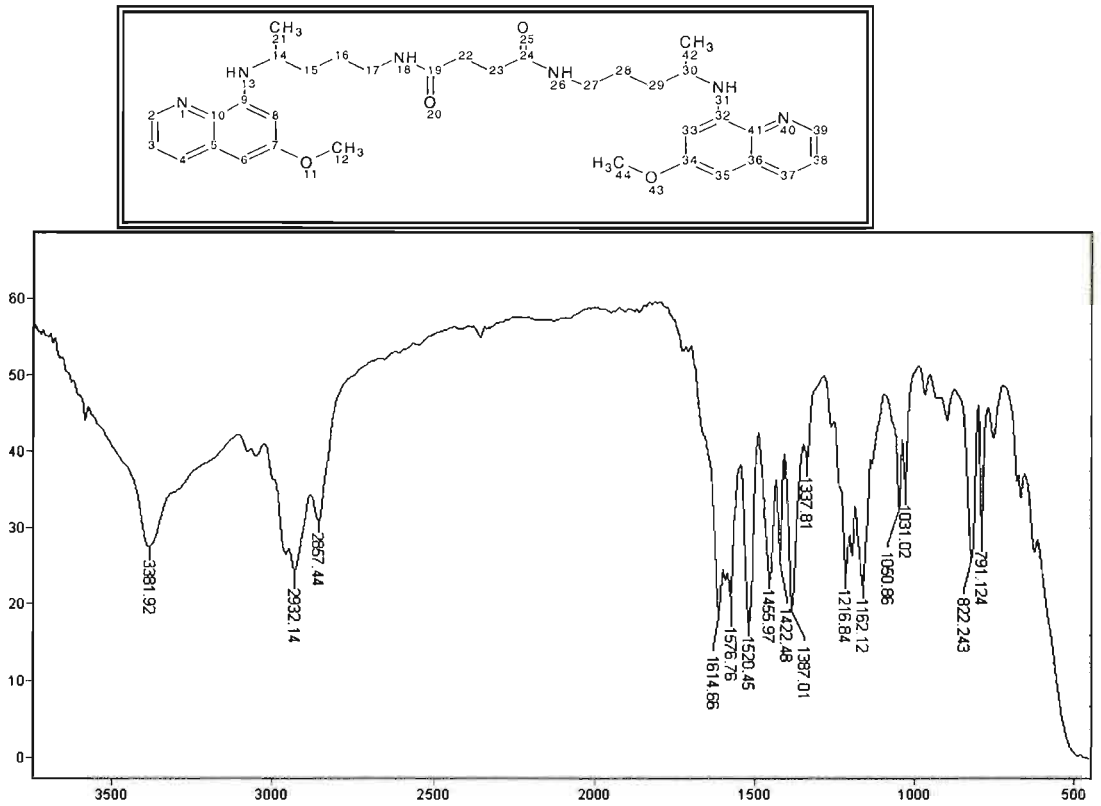
Cromatograma 1: CLAE de DECQSucDECQ Coluna C18 (ODS); fase móvel: metanol-acetonitrila (5:3), fluxo 1,0 mL/min

5.5 Derivado de primaquina

Para o pró-fármaco primaquina-succinilprimaquina três metodologias foram seguidas: a primeira tentativa foi efetuada utilizando-se dicloreto de succinoíla. A análise por CCD mostrou várias manchas e a purificação por coluna cromatográfica não foi eficiente para os sistemas solventes utilizados.

A segunda tentativa foi realizada partindo-se da separação dos produtos formados. Ainda que utilizando succinilprimaquina, cuja síntese já foi bem estudada em nosso laboratório, utilizando o agente condensante EDC, variando tempo e quantidade de reagentes, o rendimento, após purificação em coluna cromatográfica não foi suficiente para análise em RMN. Por fim, utilizou-se o agente condensante carbonildiimidazol e ácido succínico. O produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica com sistema eluente clorofórmio:metanol (5:3). A análise no infravermelho (espectro 17) indicou a presença de amida em 1614 cm^{-1}, e os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C (espectros 18 e 19) confirmaram a obtenção do

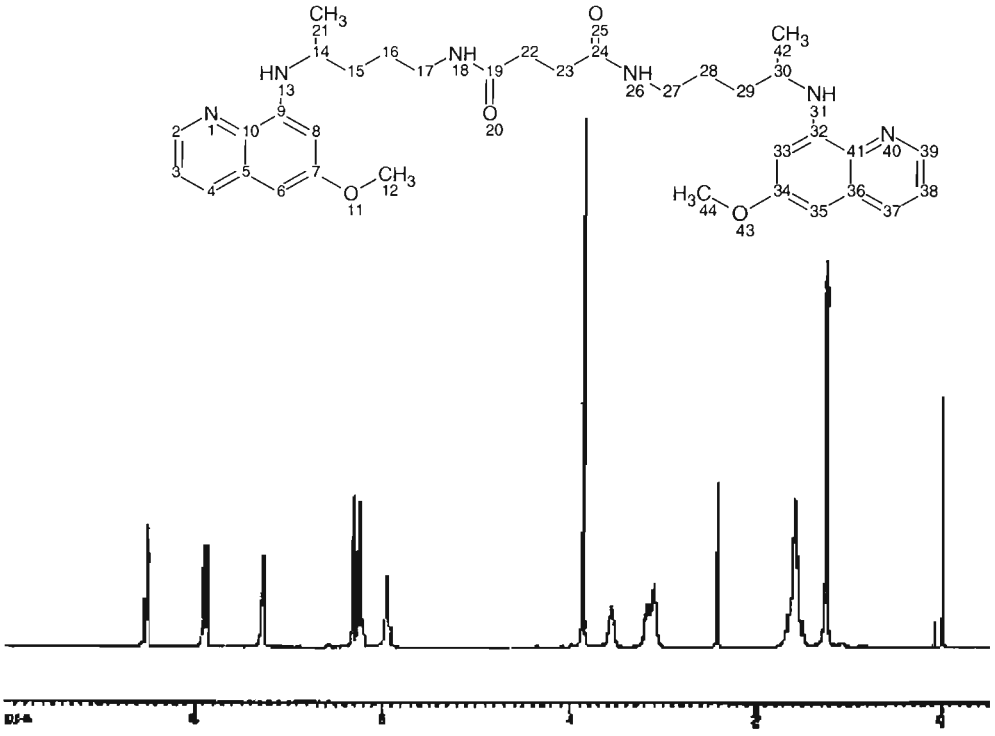
produto. Realizou-se, também, análise por DSC, que mostra eventos térmicos, que podem ser associados à quebra de ligação, ao rearranjo molecular e/ou à transição de fase. A curva DSC do pró-fármaco primaquina-succinil-primaquina (Figura 20), por exemplo, mostra duas endotermas: uma em 131,5 °C e outra em 144 °C. A primeira refere-se à degradação do pró-fármaco em succinilprimaquina e a segunda, em primaquina (Figura 20).



Espectro 17 – IV (em KBr) de primaquina-succinilprimaquina.

Tabela XVII – Atribuições do espectro no infravermelho da primaquina-succinilprimaquina

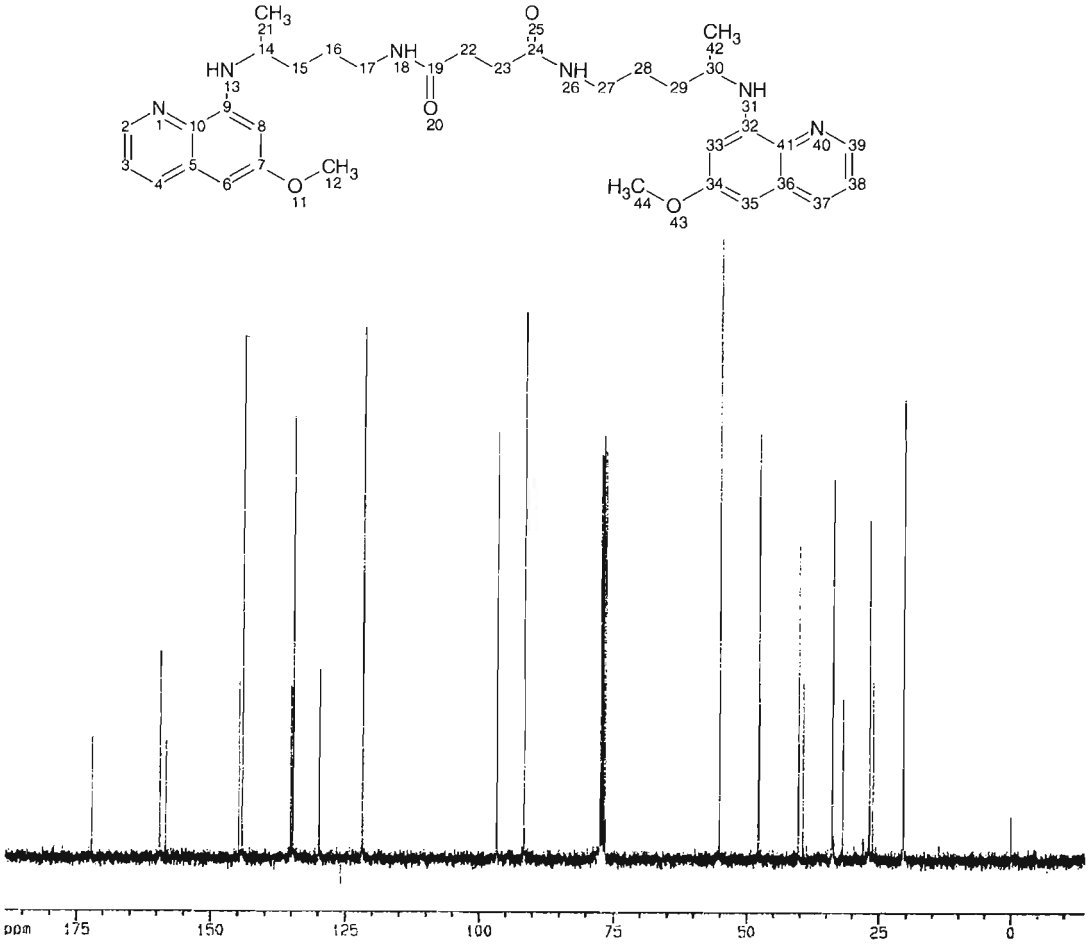
ν (cm^{-1}, KBr)
3381 (νNH), 2932 (νCH arom. sim), 2857 (νCH alif sim), 1614 (νNHCO), 1576 (νC=C), 1520 (νCOC)



Espectro 18 – RMN ^{1}H de primaquina-succinilprimaquina (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XVIII – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da primaquina-succinilprimaquina

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1,26 (d, $H_{21,42}$, 6H); 1,60-1,62 (m, $H_{15,16,28,29}$, 8H); 2,42 (s, $H_{22.23}$, 4H); 3,15 (q, $H_{17,27}$, 4H); 3,56-3,62 (m, $H_{14,30}$, 2H); 3,86 (s, $H_{12,44}$, 6H); 5,95 (d, $H_{13,31}$, 2H); 6,32 (d, $H_{8,33}$, 2H); 7,27 (d, $H_{3,6,35,38}$, 4H); 7,89 (d, $H_{2,17}$, 4H); 8,50 (d, $H_{2,39}$, 2H).



Espectro 19– RMN ^{13}C de primaquina-succinilprimaquina (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XIX – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C de primaquina-succinilprimaquina

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75MHz, δ= ppm
20,52($C_{21,42}$); 26,51($C_{16,28}$); 31,92 ($C_{22,23}$); 33,80 ($C_{15,29}$); 39,42 ($C_{17,27}$); 47,81($C_{14,30}$); 55,20 ($C_{12,44}$); 91,66 ($C_{6,35}$); 96,74 ($C_{8,33}$); 121,88 ($C_{3,38}$); 129,91 ($C_{5,36}$); 135,06 ($C_{10,41}$); 144,30 ($C_{9,32}$); 144,89 ($C_{2,39}$); 159,87 ($C_{7,34}$); 172,31 ($C_{19,24}$).

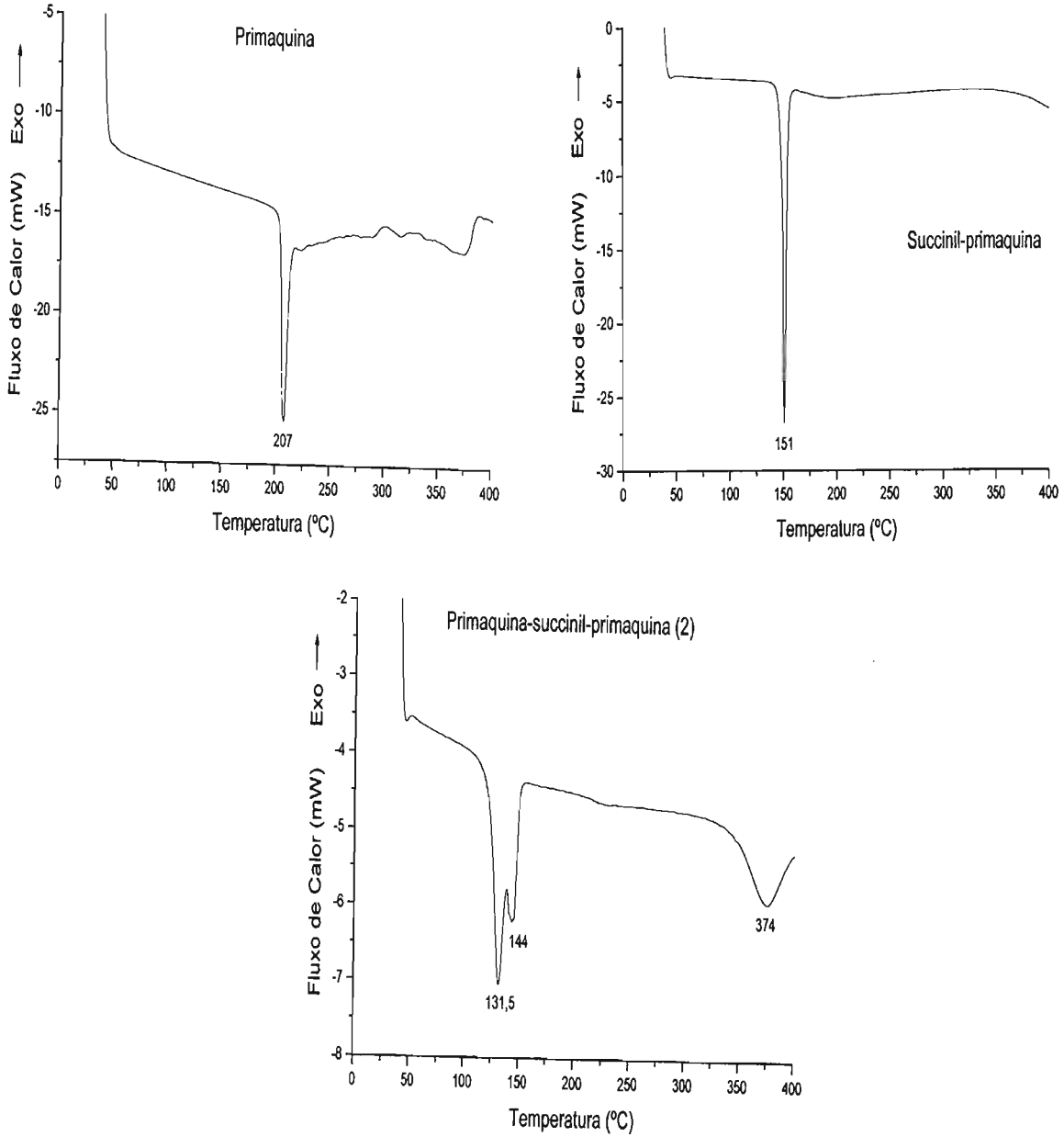


Figura 20 – Curvas de DSC de primaquina, succinilprimaquina e primaquina-succinilprimaquina. Atmosfera de nitrogênio, na vazão de 100 mL/min, razão de aquecimento: 10 °C, cadinho de alumínio e faixa de aquecimento 40-400 °C.

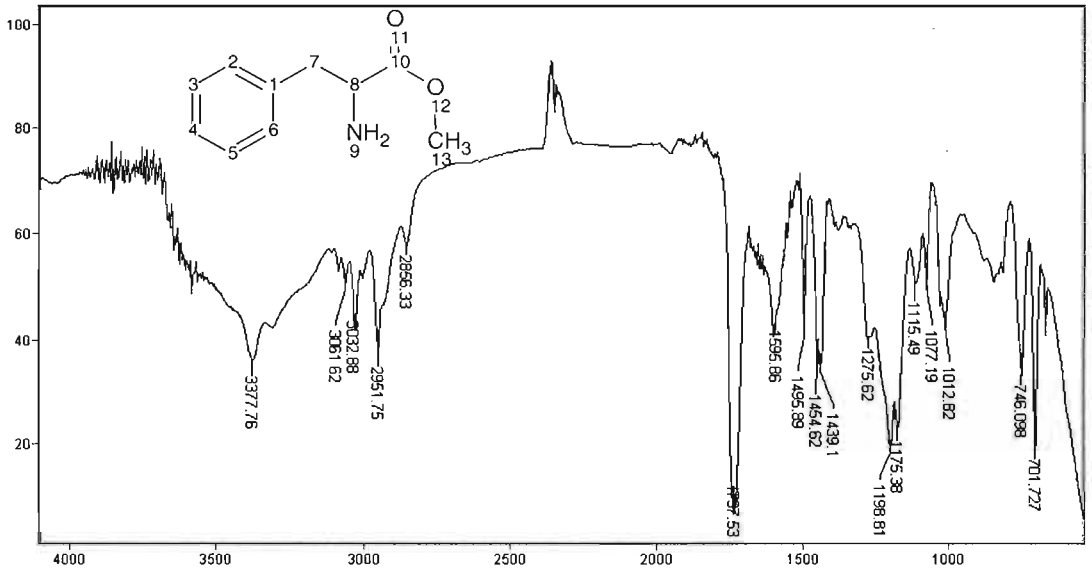
B I B .
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

5.6 Pró-fármacos peptídicos

Para o pró-fármaco dirigido de desetilcloroquina foram escolhidos 3 peptídeos relacionados à cisão seletiva pela falcipaína: AlaPhe, LeuPhe e LysArg.

Para que as sínteses pudessem ser realizadas, grupos protetores foram utilizados. Para a fenilalanina (Phe), utilizou-se o éster metílico, obtido a partir de metanol e cloreto de tionila. Esta reação se processa de maneira eficiente, com bom rendimento, porém o produto não pode ser estocado por mais de 2 semanas.

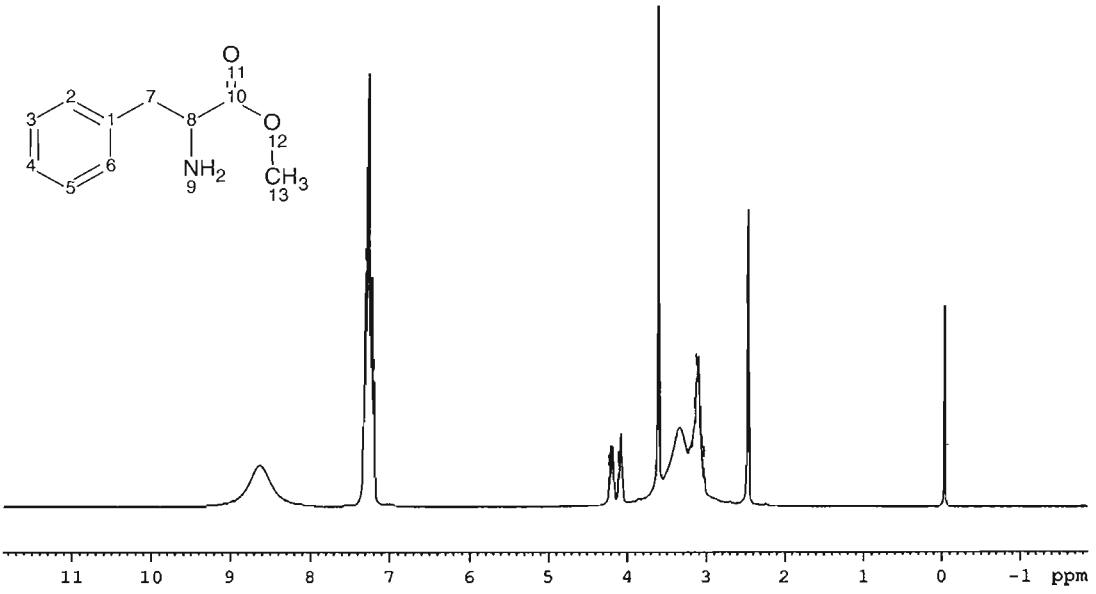
Os espectros de 20 a 22 mostram, respectivamente, as análises no infravermelho e de RMN ^{1}H e ^{13}C.



Espectro 20 – IV (KBr) do éster metílico da fenilalanina.

Tabela XX – Atribuições do espectro no infravermelho do éster metílico da fenilalanina

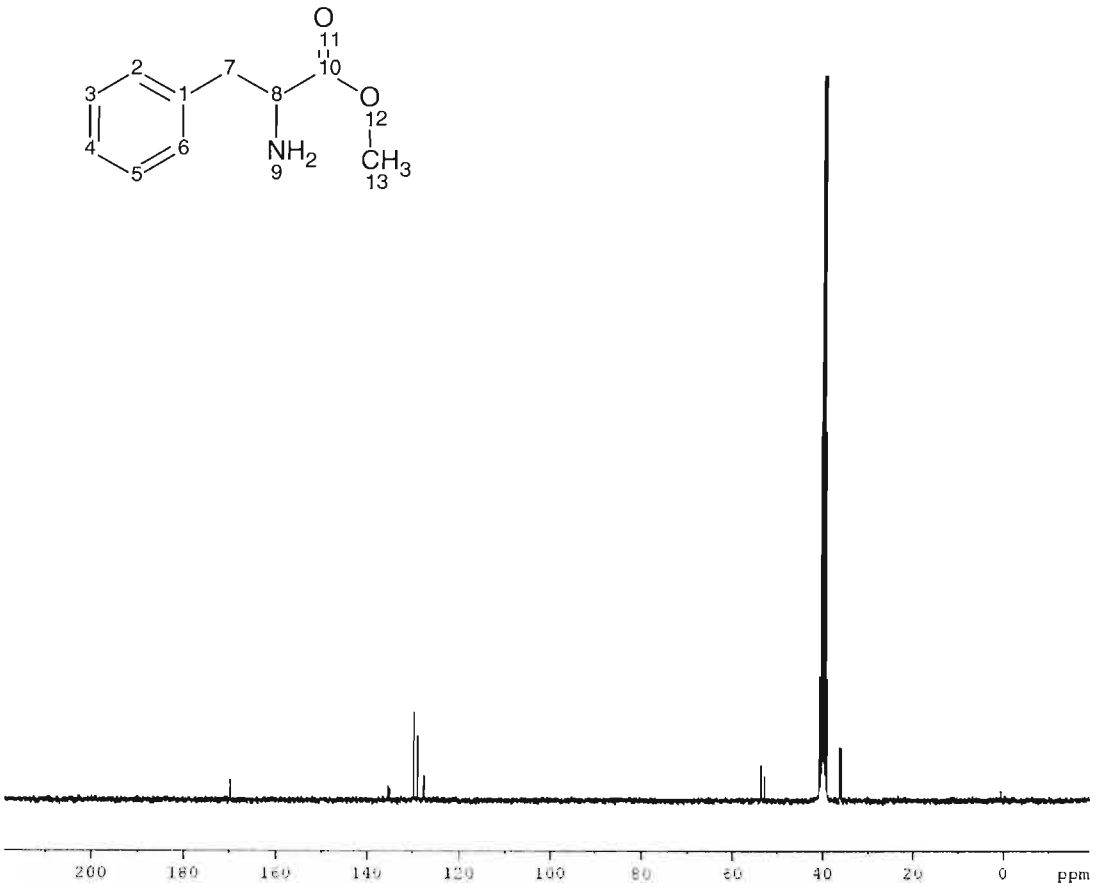
ν (cm^{-1}, KBr)
3377 (νNH2); 3061 ($\nu CH_{arom.sim}$); 3062 ($\nu CH_{arom.assim}$); 2961 ($\nu CH_{alif.sim}$); 2956 ($\nu CH_{alif.assim}$); 1737 (νCOOR)



Espectro 21 – RMN ^1H do éster metílico da fenilalanina (300 MHz, DMSO-d_6, δ ppm).

Tabela XXI – Atribuições do espectro de RMN ^1H do éster metílico da fenilalanina

RMN ^1H (DMSO-d_6), 300 MHz, δ = ppm
3,04-3,10 (m, H_7,2H); 3,47 (s, H_{13}, 3H); 4,12-4,24 (m,H_8,1H); 7,15-7,28 (m, $H_{2,3,4,5,6}$,5H); 8,75 (s, H_9, 2H);



Espectro 22 – RMN ^{13}C do éster metílico da fenilalanina (75 MHz, DMSO-d6, δ ppm).

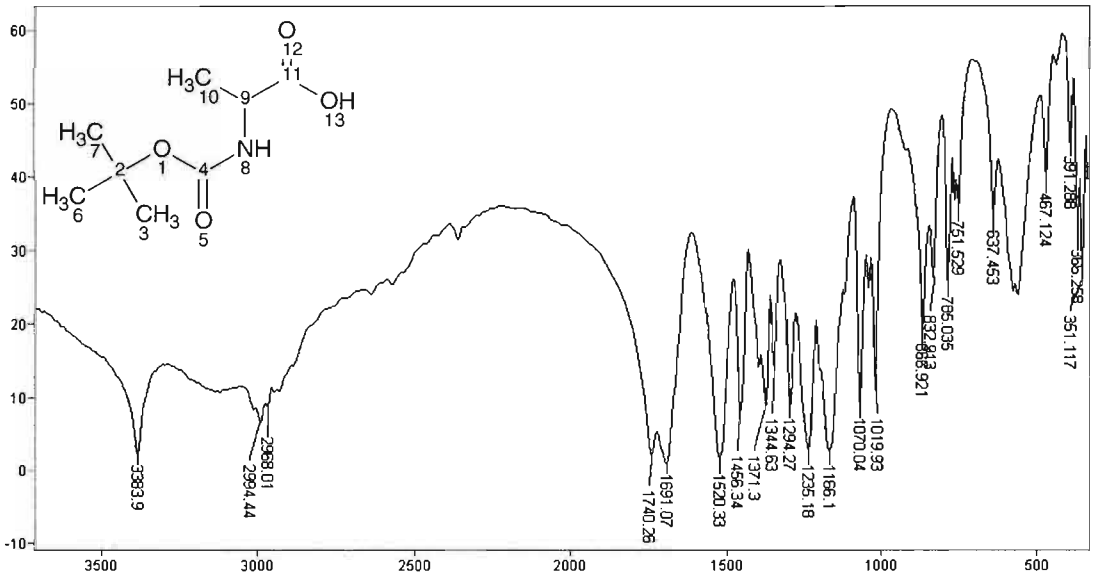
Tabela XXII– Atribuições do espectro de RMN ^{13}C do éster metílico da fenilalanina

RMN ^{1}H (DMSO-d6), 75 MHz, δ= ppm
39,16 (C_7); 53,01 (C_{13}); 53,70 (C_8); 127,12 (C_4); 129,86 ($C_{2,6}$); 131,47 ($C_{3,5}$); 135,50 (C_1); 170,75 (C_{10})

Alanina e leucina tiveram seus grupos amínicos protegidos com BOC. A lisina é protegida com grupo BOC no grupo amino ε e cloro-Z no grupo amino α e a arginina é protegida com tosil no grupo amino ω. Alternativamente, utilizaram-se os grupos *p*-nitrofenílico e CBz para proteção das aminas de alanina e leucina.

Várias sínteses foram efetuadas até se conseguir os aminoácidos BOC-Ala e BOC-Leu. Apesar de os métodos serem descritos na literatura por diversos autores, a temperatura do ambiente influencia na reação, e não pode ultrapassar 23 °C tal fato não foi descrito por autor algum.

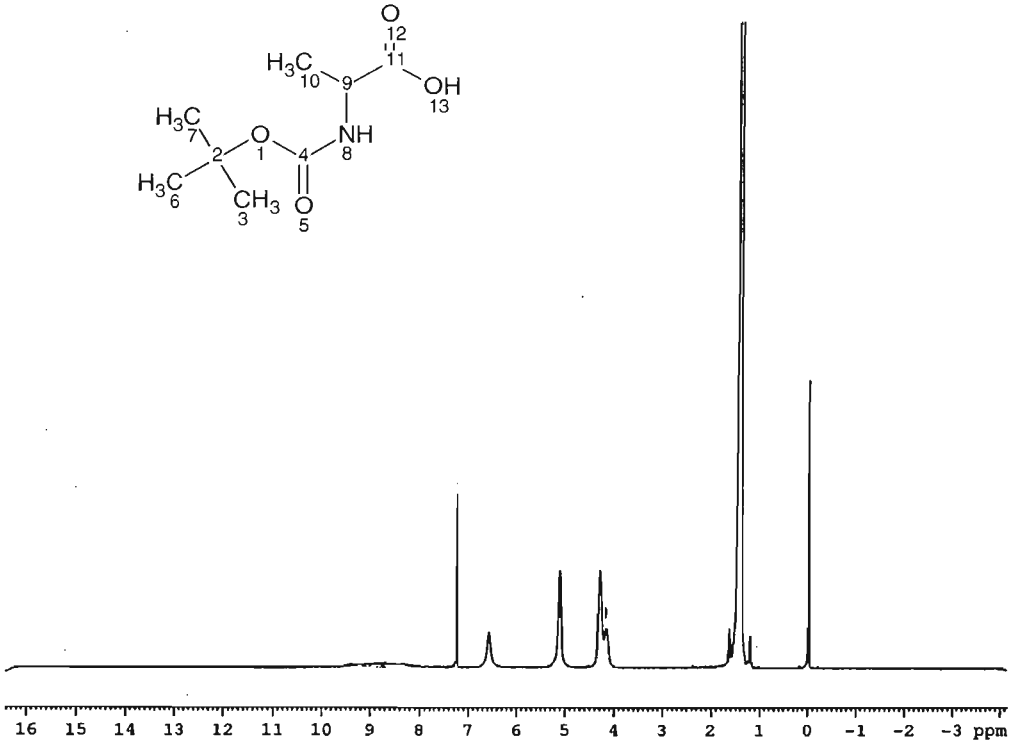
Os espectros no IV e de RMN ^{1}H e ^{13}C encontram-se a seguir.



Espectro 23 – IV(KBr) de BOC-Ala.

Tabela XXIII – Atribuições do espectro de infravermelho do BOC-alanina

ν (cm^{-1}, KBr)
3383 (νNH); 2994 (νCH$_{alif.sim}$); 2868 (νCH$_{alif.assim}$); 1740 (νNHCOO); 1691(νCOOH)

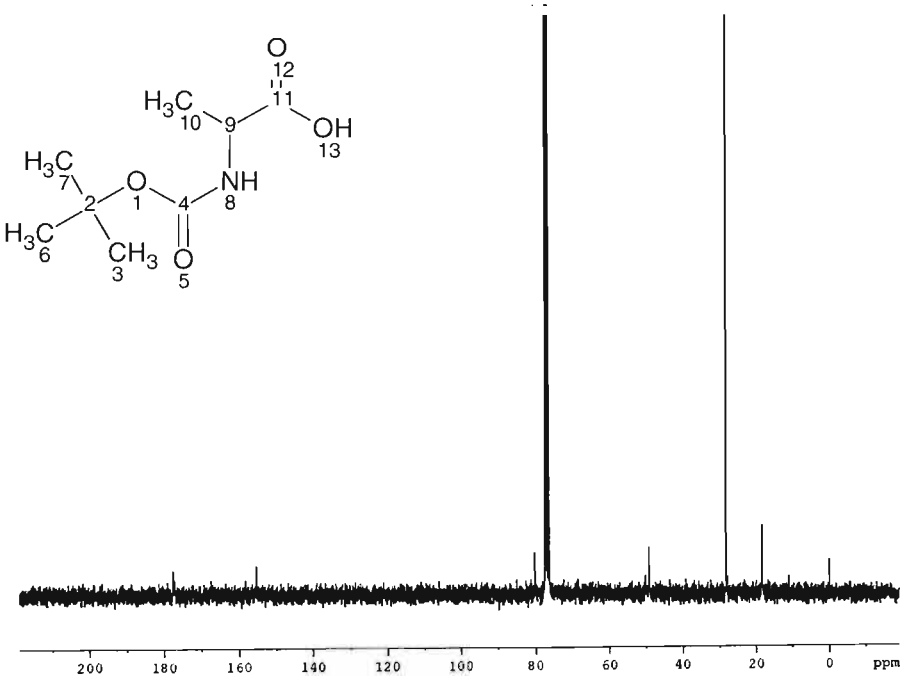


Espectro 24 – RMN ^{1}H da BOC-Ala (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XXIV – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da BOC-alanina

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1,42 (sl, $H_{3,6,7,10}$, 12H); 4,15-4,29 (m, H_9, 1H); 5,12 (s, H_8, 1H)

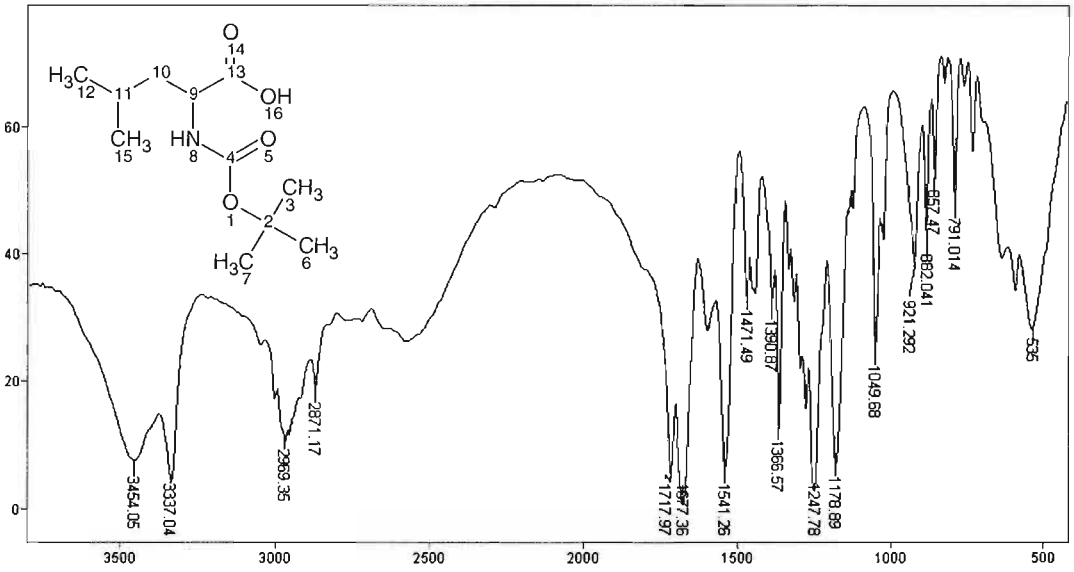
BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo



Espectro 25 – RMN ^{13}C da BOC-Ala (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XXV– Atribuições do espectro de RMN ^{13}C BOC-alanina

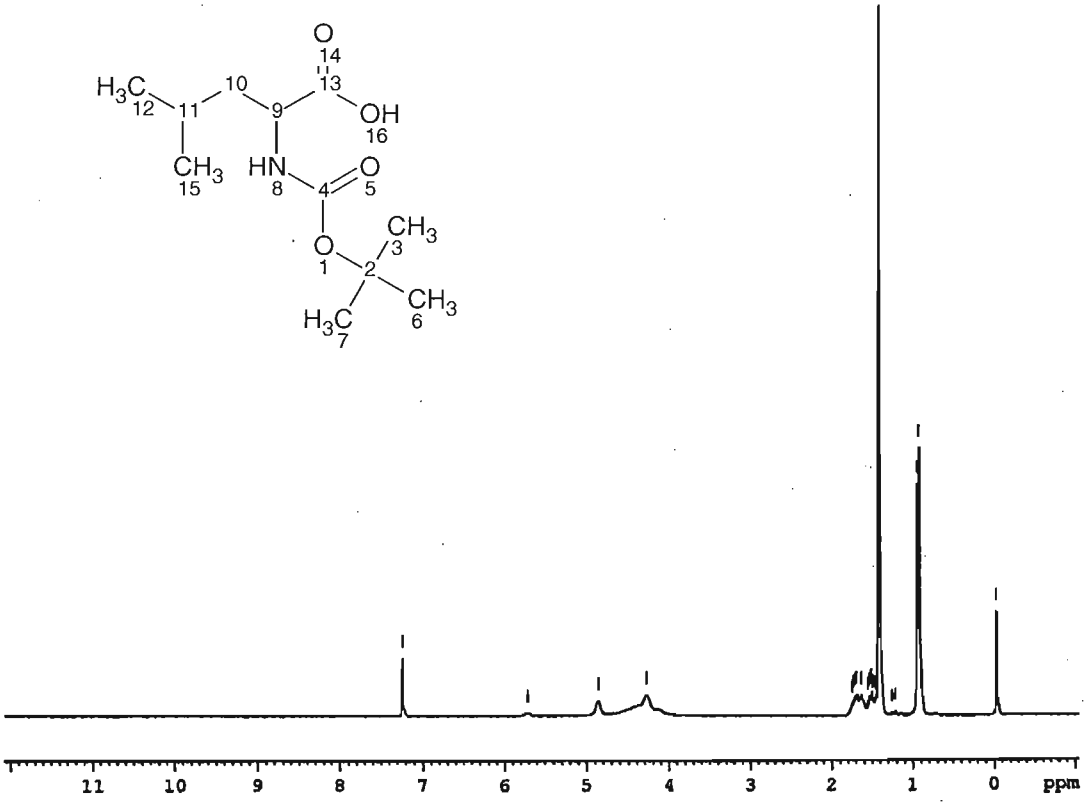
RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 75 MHz, δ= ppm
18,36 (C_{10}); 28,30 ($C_{3,6,7}$); 49,24 (C_9); 81,03 (C_2); 155,52 (C_4); 177,82 (C_{11})



Espectro 26– IV (em KBr) da BOC-leucina.

Tabela XXVI – Atribuições do espectro no infravermelho da BOC-leucina

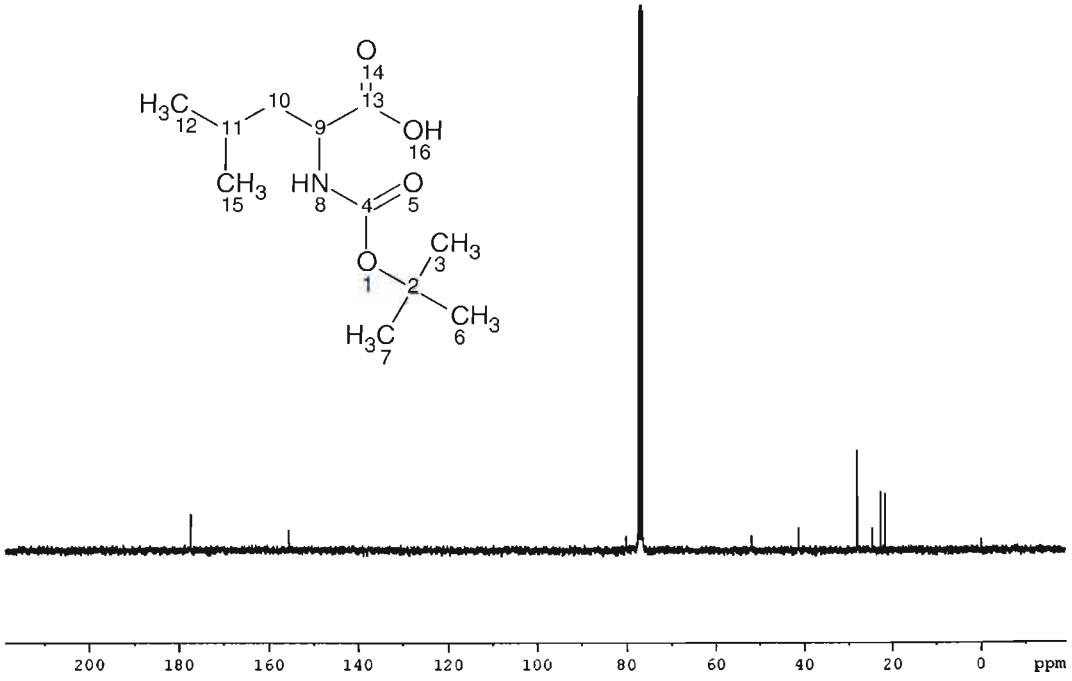
ν (cm^{-1}, KBr)
3337 (νNH); 2968 ($\nu CH_{alif.sim}$); 2871 ($\nu CH_{alif.assim}$); 1717 (νNHCOO); 1687(νCOOH).



Espectro 27 – RMN ^{1}H da BOC-leucina (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XXVII – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H da BOC-leucina

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1,23 (d, $H_{12,15}$, 6H); 1,43(s, $H_{3,6,7}$,9H); 1,63-1,75 (m, $H_{10,11}$,3H); 4,28-4,35 (m,H_9,1H)



Espectro 28 – RMN ^{13}C da BOC-leucina (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XXVIII – Atribuições do espectro de RMN ^{13}C do BOC-leucina

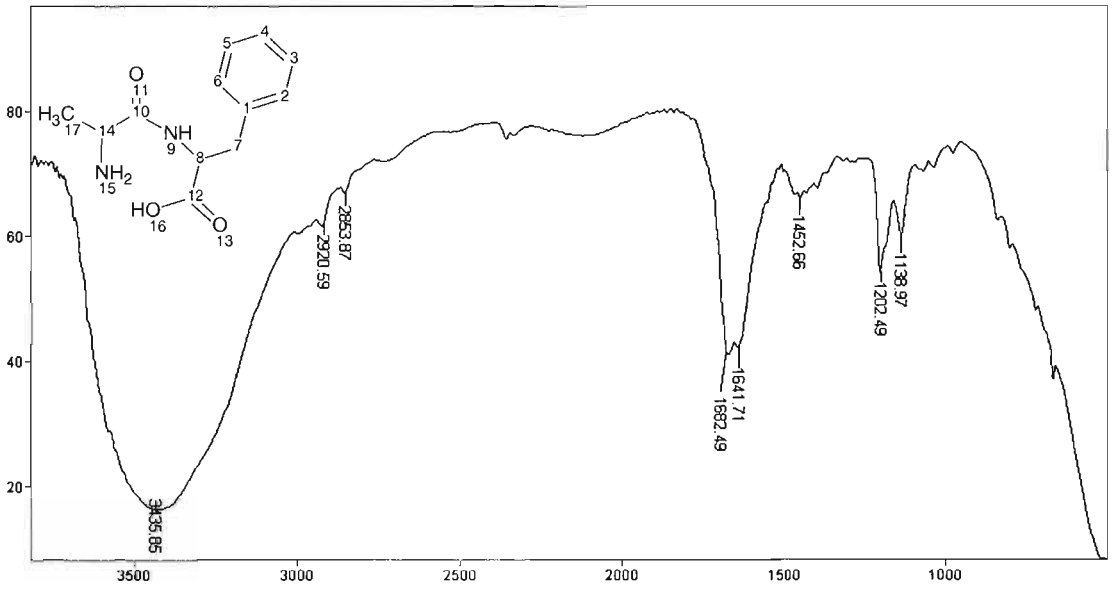
RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ = ppm
21,78 (C_{11}); 22,83 ($C_{12,15}$); 28,29 ($C_{3,6,7}$); 41,36 (C_{10}); 51,99 (C_9); 80,27 (C_2); 155,79 (C_4); 177,64 (C_{13})

5.7 Síntese dos peptídeos

Para as sínteses dos peptídeos Ala-Phe e Leu-Phe, duas rotas foram seguidas: a primeira, relatada por Sewald e Jakubke (2002), utilizava caminho mais simples, mas a desproteção do grupo benzil não foi eficiente e o uso de HBr/HAc para essa reação tornou difícil o isolamento do peptídeo formado, mesmo com a neutralização do meio e as tentativas de extração efetuadas.

A segunda rota escolhida foi descrita por Bodansky (1984), embora mais trabalhosa, por incluir maior número de etapas, mostrou ser o caminho mais viável por apresentar sempre altos rendimentos. A etapa de desproteçâo do grupo Boc ocorreu de maneira satisfatória, como apresentado nos espectros de RMN , em que não se observa o sinal em 1,2 ppm, referente ao grupo metila do *t*-butila (grupo BOC). Ainda por RMN de ^{1}H e ^{13}C, tem-se todos os sinais característicos da formação do peptídeo. Estes espectros mostram mistura racêmica nos dois peptídeos formados e isto se deve a não purificação por CLAE, única técnica disponível para separação da mistura formada.

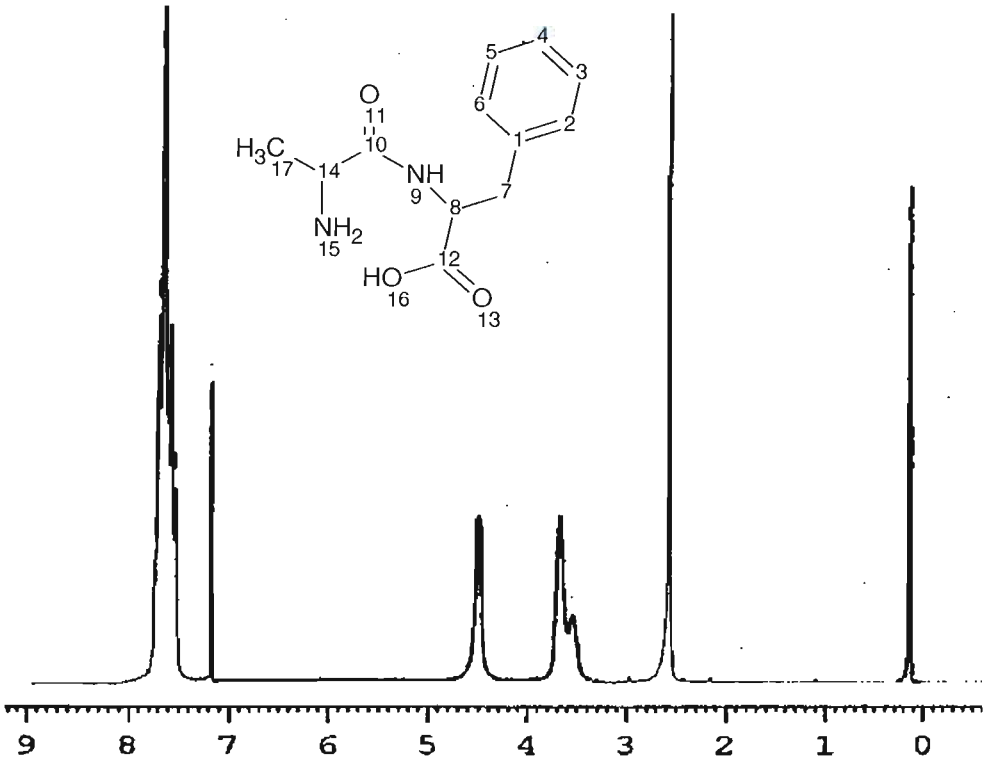
Os espectros correspondentes aos peptídeos Ala-Phe e Leu-Phe encontram-se a seguir, no espectro de infravermelho a banda relativa ao NH não aparece, pois se efetuou a análise em pastilha de NaCl contaminada com água, por isto vemos a banda de hidroxila sobreposta a banda de NH.



Espectro 29 – IV (em NaCl) de Ala-Phe.

Tabela XXIX – Atribuições do espectro de infravermelho de Ala-Phe

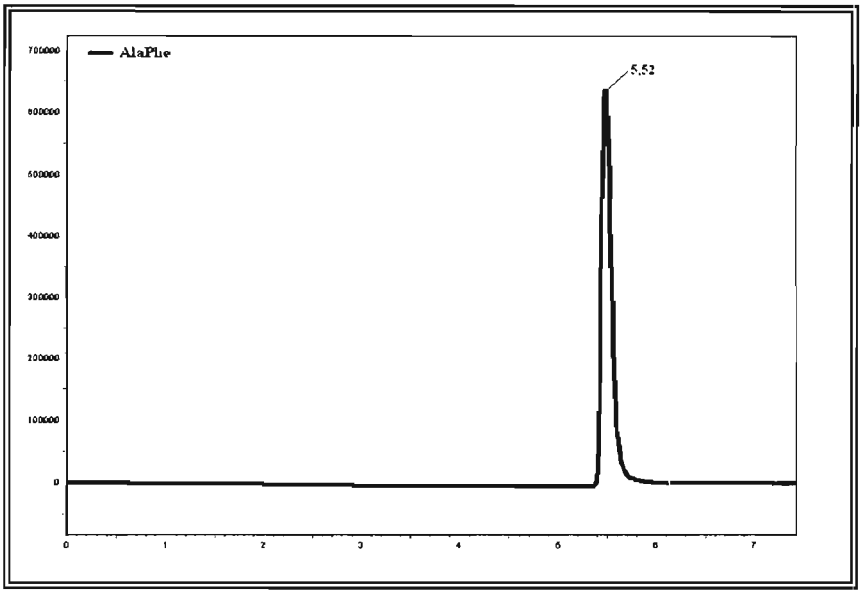
ν (cm^{-1}, NaCl)
2920 ($\nu CH_{alif.sim}$); 2853 ($\nu CH_{alif.assim}$); 1692 (νCOOH); 1641(νNHCO)



Espectro 30 - RMN ^{1}H de Ala-Phe (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

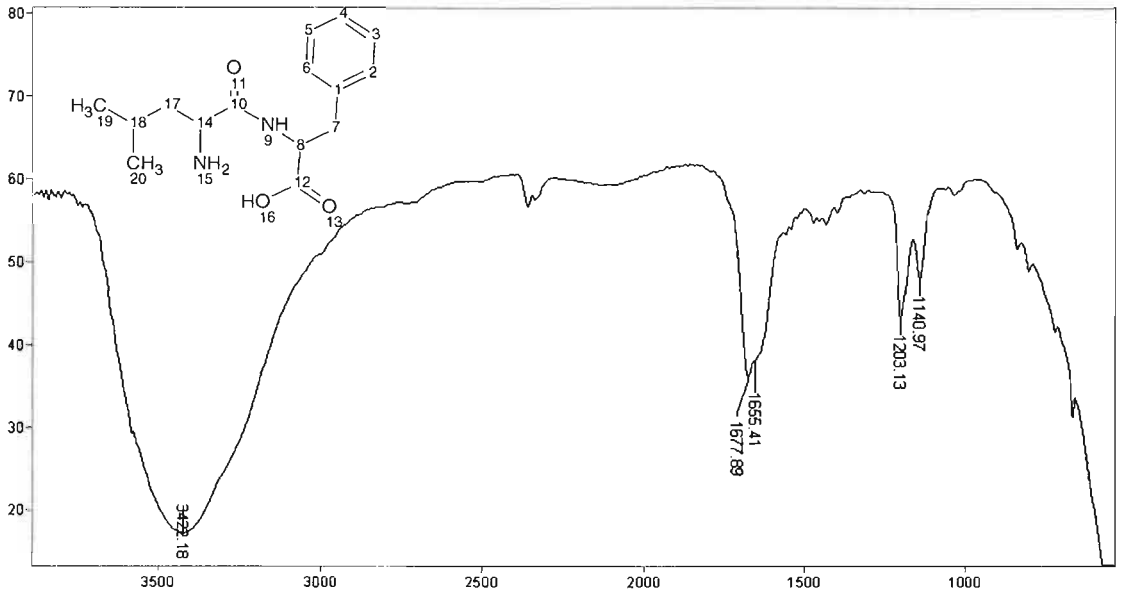
Tabela XXX – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H do peptídeo Ala-Phe

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
2,42 (s, H_{17}, 3H); 2,74-2,83 (m, H_7, 2H); 3,74-3,87 (m, H_{14}, 1H); 4,33-4,8 (m, H_8, 1H); 7,19-7,25 (m, $H_{2,3,4,5,6}$, 5H)



Cromatograma 2: CLAE do peptídeo Ala-Phe Coluna C18 (ODS); fase móvel: metanol-acetonitrila-ácido-trifluoracético (5:3:0,1), fluxo 1,0 mL/min

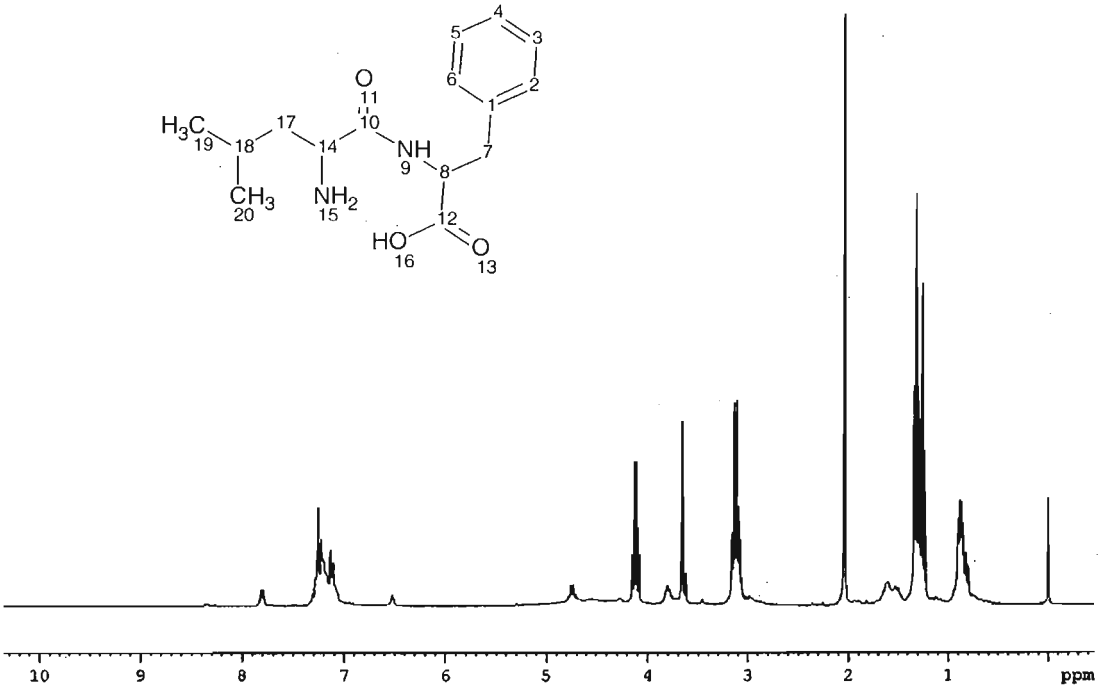
O cromatograma mostra um tempo de retenção de 5,52 minutos, diferente dos tempos apresentados para os reagentes, porém pelos resultados de RMN, concluiu-se que o produto é formado por mistura racêmica entre as duas formas *D* e *L* dos aminoácidos de origem, isto foi visto com o deslocamento de sinais em RMN ^{1}H.



Espectro 31 – IV (em NaCl) de Leu-Phe.

Tabela XXXI – Atribuições do espectro no infravermelho de Leu-Phe

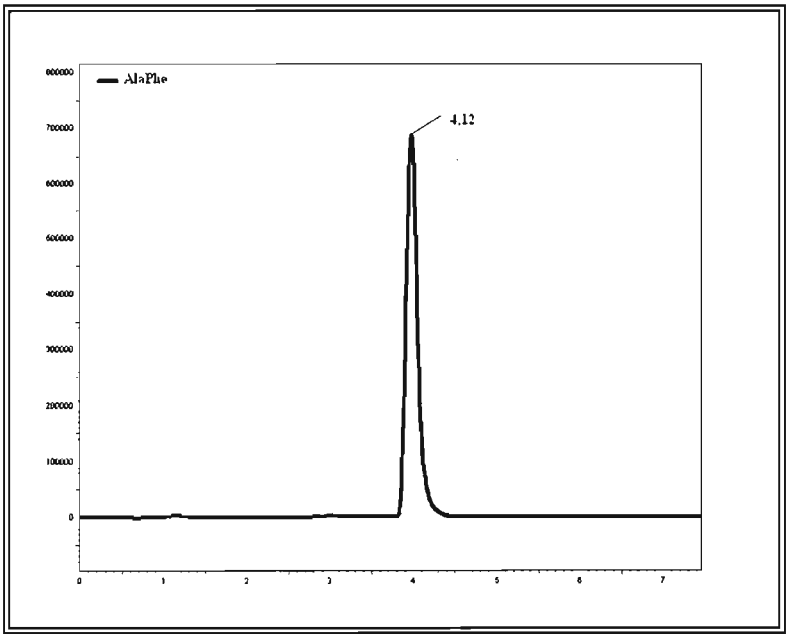
ν (cm^{-1}, NaCl)
3471 (νOH e $νNH_2$ superpostas); 1687 (νCOOH); 1655(νNHCO)



Espectro 32 - RMN ^{1}H de Leu-Phe (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm)

Tabela XXXII – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H do peptídeo Leu-Phe

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
0,80-0,89(m, $H_{19,20}$,6H); 1,23-1,29, (m,H_{18} 1H); 2,04 (s,H_7,2H); 2,98-3,16 (m,H_{14},1H); 4,08-4,26 (m, H_8,1H); 4.98 (s, H_{15}, 1H); 7,11-7,79 (m, $H_{2,3,4,5,6}$,5H); 7,97 (s, H_9,1H).



Cromatograma 3: CLAE do peptídeo Leu-Phe Coluna C18 (ODS); fase móvel: metanol-acetonitrila-ácido-trifluoracético (5:3:0,1), fluxo 1,0 mL/min

O cromatograma segue o mesmo padrão para o peptídeo AlaPhe, apresentando um tempo de retenção de 4,32. Da mesma forma, o peptídeo se apresenta como mistura racêmica.

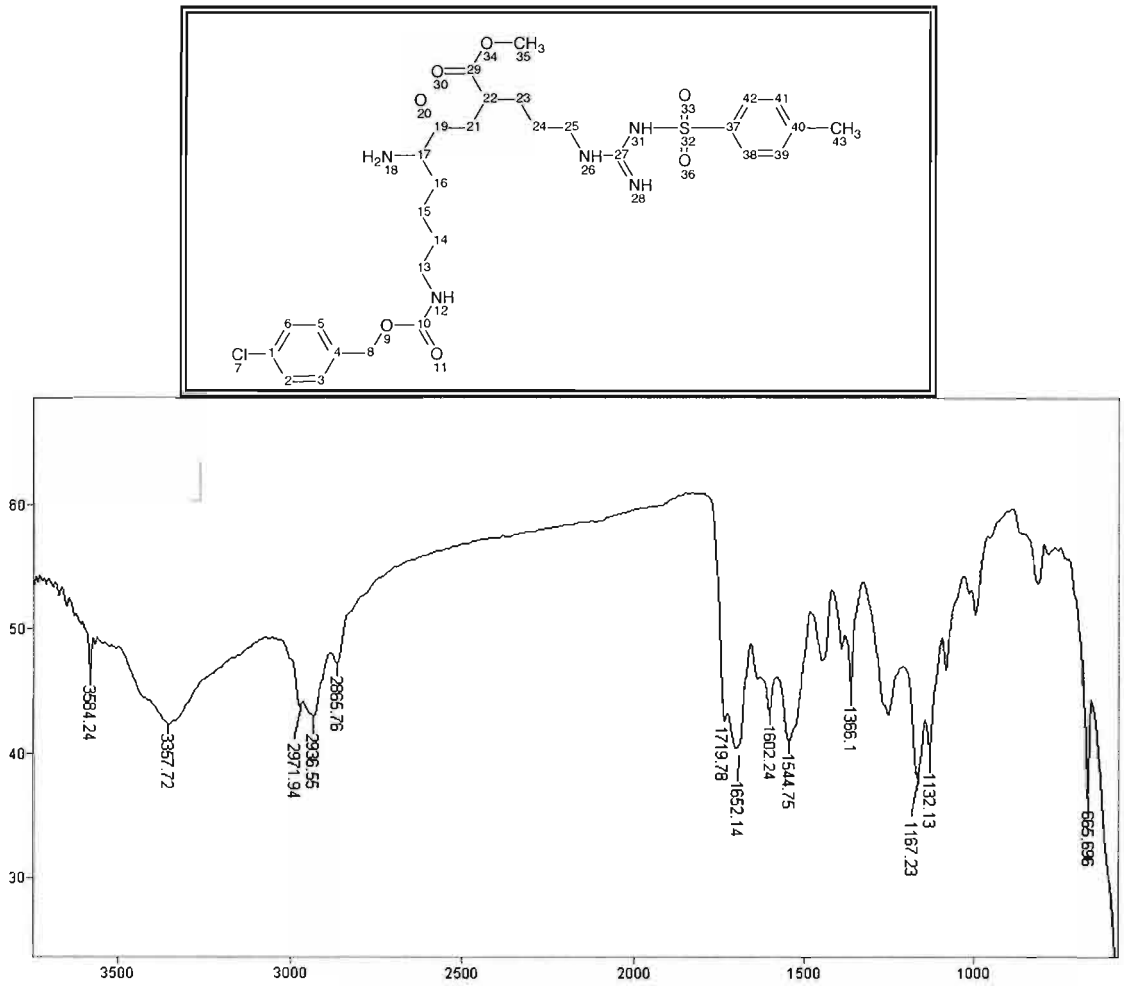
Para o peptídeo LysArg foi seguida metodologia já desenvolvida em nosso laboratório por Trossini (2004) e Chung (1996). A dificuldade está na desproteção dos grupos tosil e Cl-Z, que deve ser efetuada sob HF.

Como os peptídeos formados apresentavam mistura racêmica, uma alternativa foi o método de síntese em fase sólida. Para se determinar o acoplamento dos aminoácidos à resina foi utilizado o teste colorimétrico com 4-nitrobenzilpiridina (NBP). feito com 10 mg do produto obtido na reação, comparativamente a 10 mg da resina. Após o teste, o produto mantém coloração branca, indicando o acoplamento, e a resina se mantém na cor violeta devido à interação entre o corante e os átomos de cloro livres presentes na resina.

Este método, embora eficiente, requer várias etapas de lavagem dos produtos formados e, com isto, torna-se desvantajoso, quando se quer quantidade suficiente para outras sínteses: dos 400 mg de reagente utilizado apenas 8 mg do produto se formam.

Para a continuidade do trabalho com os pró-fármacos, optou-se pela síntese em solução, pois, apesar de necessitar um tempo reacional maior, ela fornece um produto com massa suficiente para diversas reações posteriores, enquanto que na síntese em fase sólida, várias repetições da mesma síntese devem ser efetuadas.

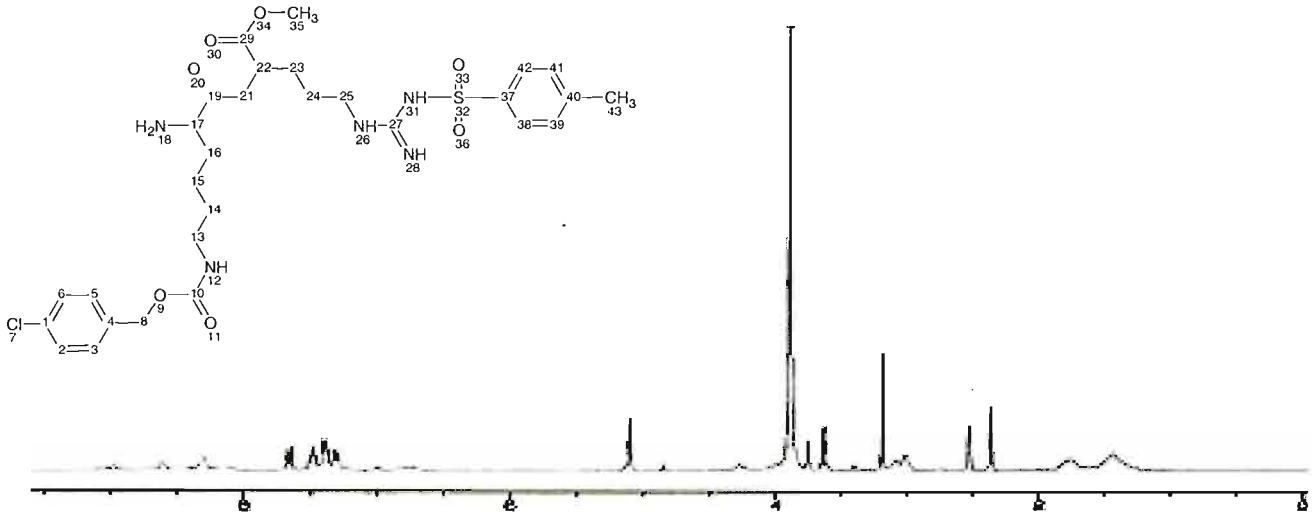
Os espectros do derivado obtido encontram-se a seguir.



Espectro 33 – IV (em NaCl) de Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe.

Tabela XXXIII – Atribuições do espectro no infravermelho de Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe

ν e δ (cm-1), NaCl
3584 (νNH); 3357 (νOH - H2O); 2971 ($\nu CH_{arom\ sim}$);2936 ($\nu CH_{arom\ assim}$); 2865($\nu CH_{alif.sim}$); 1719 (νCOOH); 1652(νNHCO)



Espectro 34 – RMN ^{1}H de Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm).

Tabela XXXIV – Atribuições do espectro de RMN ^{1}H de Lys-ClZ-Arg(Tos)-OMe

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ= ppm
1,40-2,33 (m, H_{16}, H_{15}, H_{14}, H_{23}, H_{24} H_{25}, 12H); 2,33 (s, H_{43}, 3H); 3,75 (s, H_{35}, 3H); 5,07 (s, H_8, 2H); 7,28 (d, H_{41}, H_{39}, 2H,); 7,35-7,46 (m , H_2,H_3, H_5, H_6, 4H); 7,63 (d, H_{42}, H_{38}, 2H)

As reações entre a succinildesetilcloroquina e o peptídeo Ala-Phe e Leu-Phe foram realizadas utilizando-se primeiro como agente condensante de escolha o DCC, porém os resultados não foram como esperado. Dessa forma, utilizaram-se outros agentes como EDC, HOBt, e mesmo mudando as condições estequiométricas entre reagente e agente condensante, tempo reacional e variação de temperatura, não se obteve o pró-fármaco peptídico desejado. Ou a reação não ocorria ou o baixo rendimento dos produtos impediam análises espectroscópicas mais detalhadas.

5.8 "Docking"

Foram realizados estudos de *docking* do pró-fármaco de desetilcloroquina-peptídeo-desetilcloroquina, para que se pudesse predizer a possível interação entre os pró-fármacos e a falcipaína, o favorecimento de clivagem dos pró-fármacos e a liberação da desetilcloroquina para exercer sua atividade biológica.

A primeira parte do trabalho de *docking* consistiu na extração e preparação da estruturas de PDB da falcipaína. Optou-se por trabalhar com a estrutura 1yvb, por ser cristalizada, com definição de 2,7 Å. Esta preparação ocorreu utilizando-se o programa *deepview* (http://www.expasy.org/spdbv/), sendo retirado o ligante, co-cristalizado com a enzima, e as moléculas de água. A superfície da estrutura da falcipaína com seus respectivos bolsos de ligação com os ligantes é mostrada na Figura 21.

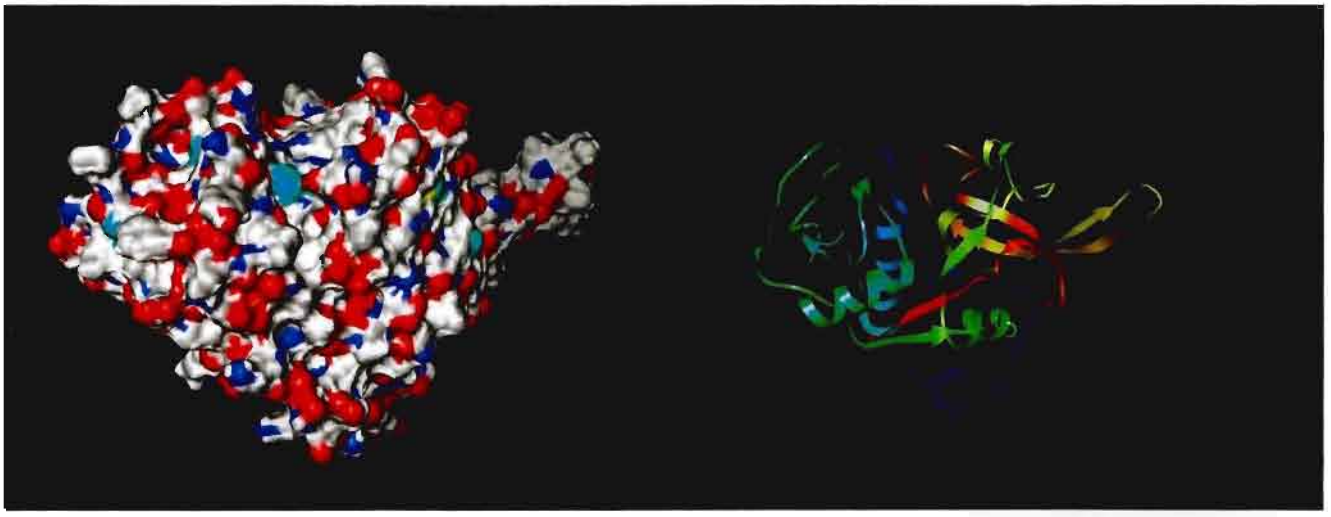


Figura 21 – Estrutura 1YVB da falcipaína. À esquerda representada pelo mapa de potencial eletrostático e à direita por modelo em fitas.

Os confôrmeros de menor energia foram obtidos através de cálculos A*b Initio* Hartree-Fock 3-21G, utilizando-se o programa Gaussian. Seguindo o *default* do programa, obtiveram-se os confôrmeros de menor energia.

Para o *docking* utilizou-se o programa GOLD, conforme metodologia descrita, utilizando-se o átomo 42 da cisteína 25 da falcipaína como ponto de docagem.

Os resultados obtidos são apresentados nas figuras que seguem.

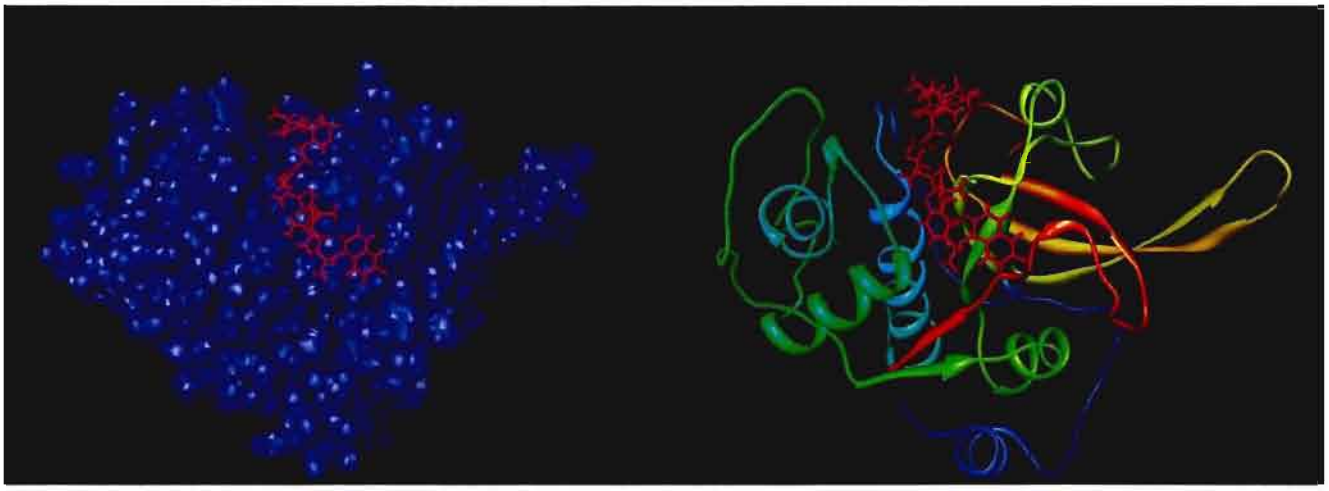


Figura 22 - *Docking* do DECQ-AlaPhe-DECQ na falcipaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2, e aproximação da carbonila à Cys25 da falcipaína. Figura à esquerda representada por superfície e figura à direita representada por fitas.

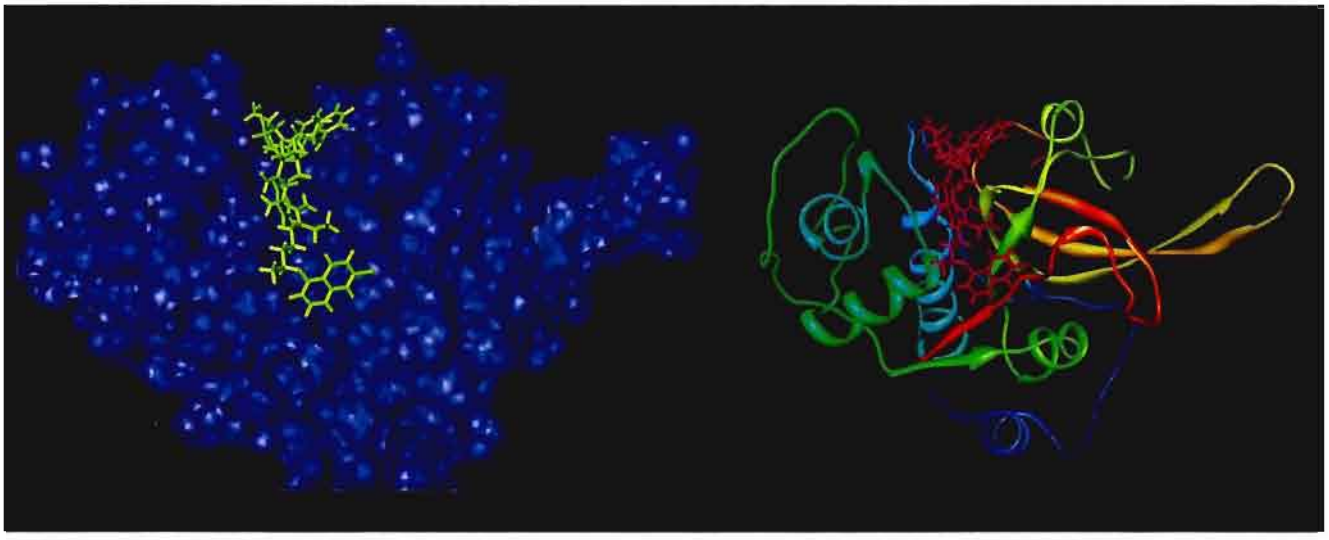


Figura 23 - *Docking* do DECQ-LeuPhe-DECQ na falcipaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2, e aproximação da carbonila à Cys25 da falcipaína. Figura à esquerda representada por superfície e figura à direita representada por fitas.

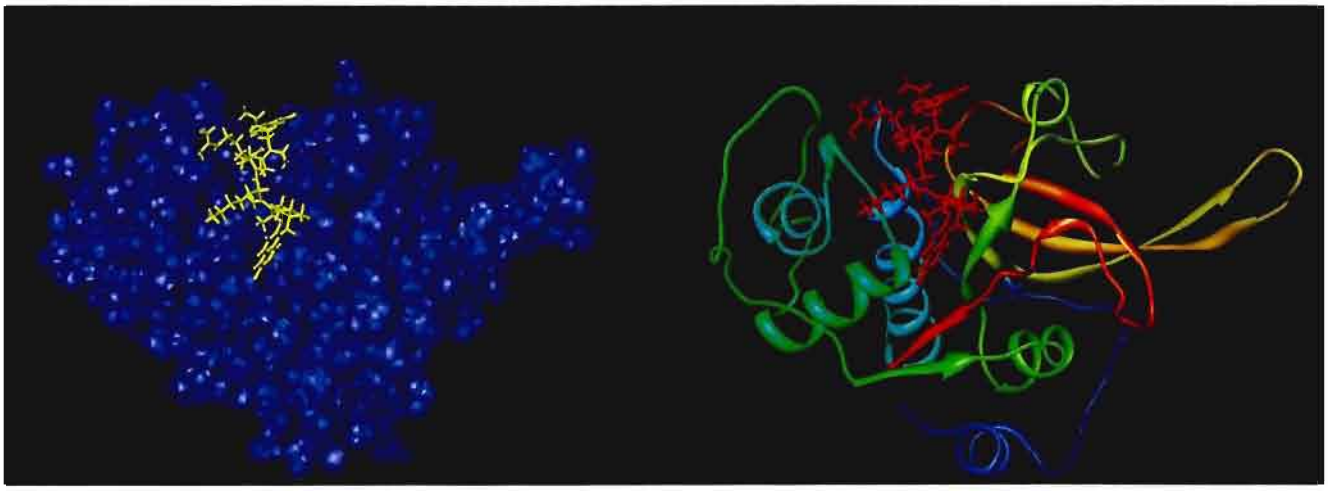


Figura 24 - *Docking* do DECQ-LysArg-DECQ na falcipaína, indicando a afinidade por Phe no bolso S2, e aproximação da carbonila à Cys25 da falcipaína. Figura à esquerda representada por superfície e figura à direita representada por fitas.

Para os três pró-fármacos DECQ-dipeptídeos-DECQ docados observou-se a importância de um grupo hidrofóbico em contato com o sítio S2 da falcipaína. O aminoácido fenilalanina acomoda-se no sítio S2, para os três pró-fármacos estudados. Neste, também se observa a aproximação da carbonila da ligação peptídica à Cys25 da falcipaína. A possibilidade de ataque nucleofílico ao carbono carbonílico pelo enxofre da Cys foi corroborada pela a distância entre esses átomos, 3,80 Å para a AlaPhe, 3.33 Å para a LeuPhe e 5,01 Å para a LysArg.

Com estes resultados concluiu-se que a presença do aminoácido fenilalanina é importante na cisão do pró-fármaco frente à falcipaína, enquanto que com o peptídeo LysArg, também ocorre interação, porém a distância observada do ponto de cisão foi a maior.

Estes resultados corroboram, preliminarmente, a teoria proposta por Sabnnis e colaboradores (2003) de que este aminoácido (fenilalanina) é importante no planejamento de novos alvos para a falcipaína.

Há, ainda, necessidade de se realizar o *docking* com outros programas, para que se efetue a validação do procedimento e do modelo de interação obtido.

6. CONCLUSÕES

- ★ As sínteses relacionadas à cloroquina não se processaram de maneira eficiente. A modelagem molecular mostrou a baixa reatividade do antimalárico devido ao impedimento estérico e ao caráter eletrônico do grupamento amínico secundário do antimalárico.
- ★ As sínteses de derivados não-peptídicos com o metabólito ativo desetilcloroquina, efetuadas em razão da baixa reatividade da cloroquina, tiveram êxito, embora os derivados tenham sido obtidos com baixo rendimento.
- ★ Os derivados peptídicos de desetilcloroquina não foram obtidos, ainda que se utilizassem diversas rotas sintéticas.
- ★ A sínteses envolvendo primaquina ocorreram dentro do esperado, pelo fato de o fármaco possuir amina primária livre.
- ★ Pelos estudos de *docking,* observou-se que ter um aminoácido fenilalanina é importante para a cisão da falcipaína, visto que este se acomoda no bolso S2, facilitando o ataque nuclelofílico da falcipaína à ligação amídica. Os estudos de *docking* devem, no entanto, ser validados por meio da utilização de outros métodos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, H.A; BESKID, G.; CHAN, K.K. Cephalosporin 3'-quinolone esters with a dual mode of action. *J Med. Chem.*, v.33, p.77-86, 1990.

ALBRECHT, H.A.; BESKID, G.; CHRISTENSON, J.G. Dual-action cephalosporins: cephalosporin 3'-quinolone carbamates. *J. Med. Chem.*, v.34, p.2857-2864, 1991.

ANSARI, M.M. Convenient short synthesis of desethylchloroquine[7-chloro-4-(4'-ethylamino-1'-methyl-butylamino)quinoline]. *Synthesis*, v. 8, p.147-149,1995.

AVENDAÑO, M.C. coord. *Introducción a la Química Farmacéutica.* Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 2001, 930 p.

BAKKER, C.N.M.; KASPERSEN, F.M., Labeling with ^{131}I of chloroquine-analogues for the detection of ocular melanoma. *J. Labelled. Compd. Radiopharm.*, v.15, p. 681-691, 1978.

BALANT, L.P.; DOELKER, E. Metabolic considerations in prodrug design. In: ABRAHAM, D.J. *Burger's Medicinal Chemistry and discovery*. Vol. 2: *Drug discovery and drug development* , 2003, New York: Wiley-Interscience, p. 499-532.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Quim. Nova*, v.20, n. 3, p. 300-310, 1997.

BIA, F.J. Malaria prophylaxis: taking aim at constantly moving targets. *Yale J. Biol. Med.,* v. 65, n. 4, p. 329-336, 1992.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

BJORKMAN, A.; PHILLIPS-HOWARD, P.A. Adverse reactions to sulfa drugs: implications for malaria chemotherapy. *Bull. WHO*, v. 69, n. 3, p. 297-304, 1991.

BLAU L.; MENEGON RF.; FERREIRA EI.; FERREIRA AG.; BOFFO EF.; TAVARES LA.; HELENO VC, CHUNG MC. Synthesis and total ^{1}H- and ^{13}C-NMR assignment of cephem derivatives for use in ADEPT approaches. *Molecules.* v.13, n.4, p. 841-854, 2008.

BODANSZKY, M.; BODANSZKY, A. *Principles of peptide synthesis.* Berlin: Springer-Verlag, 1984. 284p.

BODOR, N. Novel approaches in prodrug design. *Drugs Fut.,* v. 6, p. 165-182, 1991.

BOSIA, A.; GHIGO, D.; TURRINI, F.; NISSANI, E.; PESCARMONA, G.P.; GINSBURG, H. Kinetic characterization of Na^{+}/H^{+} antiport of *Plasmodium falciparum* membrane. *J. Cell. Physiol.*, v.154, p.527-534, 1993.

BOUREE, P. Aspects actuels du paludisme. *Rev.Francophoned Lab.*, v. 385, p. 25-38, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 6. ed. Brasília, 2005, 816 p. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/epi/malaria/pdfs/pncm.pdf. Acesso em maio de 2008.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.,* v. 16, n. 5, p. 443-453, 1991.

BUNDGAARD, H. Design of prodrugs: Bioreversible derivatives for various functional groups and chemical entities. In: BUNDGAARD,

H., Ed. *Design of prodrugs*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985, p. 1-92.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quím. Nova*, v.26, p.428-438, 2003.

CASTEEL, D.A. Antimalarial Agents. In: ABRAHAM, D.J., ed. *Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery.* 6 ed. New York: Willey-Interscience Publication, 2003. v.5, p.881-918.

CHANG, C.; LIN-HUA, T.; JANTANAVIVAT, C. Studies on a new antimalarial compound: pyronaridine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg,* London, v. 86, n. 1, p. 7-10, 1992.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cien. Farm.,* v.41, p. 155-179, 2005.

CHUNG, M.C; FERREIRA, E.I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.22, n. 1, p. 75-84, 1999.

CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo. 1996, 135 p. [Tese de Doutorado].Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

CHUNG, M. C.; GONÇALVES, M. F.; COLLI, W.; FERREIRA, E. I; MIRANDA, M. T. M. Synthesis and *in vitro* activity of dipeptide prodrugs of primaquine potentially antichagasic. *J. Pharm. Sci.,* v. 86, p. 1127-1131, 1997.

COHEN, N.C. The molecular modeling perspective in drug design. In:_____. *Guidebook on molecular modeling in drug design*, California: Academic Press, 1988, p.1-17, 60-61.

COLLINS, F.H.; PASKEWITZ, S.M. Malaria: current and future prospecty for control. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 40, p. 195-219, 1995.

COWMAN, A.F.; FOOTE, S.J. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int. J. Parasitol.,* Oxford, v. 20, n. 4, p. 503-513, 1990.

DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, v.107, p.3902-3907, 1985.

DI SANTI, M.S.; BOULOS, M. Protozoários – Malária. *In*: Cimerman, B.; Cinerman, S. *Parasitologia Humana,* Atheneu: São Paulo, 2001, p.139-155.

DIVISION OF CONTROL OF TROPICAL DISEASE/WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Malaria prevention and control* [on line].http://who.int. Acessado em maio de 2008.

FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P., *Farmacologia*, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 1163-1172.

FERREIRA, E.I. *Malária: aspectos gerais e quimioterapia*, São Paulo: Atheneu-Edusp, 1982. 179 p.

FERREIRA, E.I. Trends in the research for new antimalarial agents. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v. 29, n. 1, p. 1-15, 1993.

FITCH, C.D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci.*, v. 74, n. 16, p. 1957-2083, 2004.

FOSTER, S.D. Pricing, distribution, and use of antimalarial drugs. *Bull. WHO,* v. 69, n. 3, p. 349-363, 1991.

FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. *The textbook of drug design and development,* 2.ed. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p. 351-385.

FURNISS, B.S.; HANNAFORD, J.; SMITH, P.W.G.; TATCHEL, A.R, eds. *Vogel's texbook of pratical organic chemistry,* 5.ed. Logman Scientific & Technical, 1989, 1376p.

GINSBURG, H.; KRUGLIAK, M. Quinoline-containing antimalarials - mode of action, drug resistance and its reversal: an update with unresolved puzzles. *Biochem. Pharmacol.*, v. 43, n. 1, p. 63-70, 1992.

GIRARD,M.P.; REEDB,Z.H.; FRIEDE, M.; KIEN, M.P. A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine*, v.25, p.1567–1580, 2007.

GREENWOOD, B. The use of anti-malarial drugs to prevent population of malaria-endemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.70, n.1, p.1–7, 2004.

HALGREN, T.A. Merck molecular force Field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comp. Chem.*, v.17, p. 490-519, 1996.

HAWLEY, S.R.; BRAY, P.G.; O'NEILL, P.M.; NAISBITT, D.J.; PARK, B.K.; WARD, S.A. The role of drug accumulation in 4-aminoquinoline antimalarial potency. The influence of structural substitution and physicochemical properties. *Biochem. Pharmacol.*, v.52, .5, p.723-733, 1996.

HELLGREN, U; KIHAMIA C.M.; MAHIKWANO L.F.; BJÖRKMAN A.; ERIKSSON O.; ROMBO L. Response of Plasmodium falciparum to chloroquine treatment: relation to whole blood concentrations of chloroquine and desethylchloroquine. *Bull World Health Organ.*, v.67. n.2, p.187-202, 1989.

HOWARD, R.J.; GILLADOGA, A.D. Molecular studies related to pathogenesis of cerebral malaria. *Blood*, v.74, p. 2603-2618, 1992.

HOWELLS, R.E. The antimalarial action of chloroquine and mechanisms of resistance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 81, p. 629-637, 1987.

ILLUM, L.; DAVIS, S.S., eds. *Polymers in controlled drug delivery,* Bristol: IOP Publishing, 1987, p. 60-72.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALARIA IN AFRICA: CHALLENGES AND OPPORTUNITES FOR COOPERATION. *Antimalarial drugs focus group report* [on line]. http://www.niaid.nih.gov/dmid/malafr/antimalal.htm> Acessado em maio de 2008.

INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS ASSOCIATIONS – Malaria strategy means global struggle. *Health horizons*, v. 16, p. 14-15, 1992.

JAIN, M.; KHAN, S.I.; BABU L. TEKWANI, B.L.; JACOB, M.R.; SINGH, S.; SINGH, P.P.; RAHUL JAIN, R. Synthesis, antimalarial, antileishmanial, and antimicrobial activities of some 8-quinolinamine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 13, p. 4458-4466, 2005.

JAMES, D.M.; GUILLES, H.M. Principles of drug treatment in parasitic diseases. In: JAMES, D.M.; GUILLES, H.M. Eds. *Human antiparasitic drugs. Pharmacology and usage*. New York: John Wiley & Sons, 2000, p.14-38.

JULIANO, R.L. Controlled delivery of drugs: an overview and prospectus. In: JULIANO, R.L., *Drug delivery systems: characteristics and biomedical application.* New York: Oxford University, 1980, p. 3-10.

KARBWANG, J.; WHITE, N. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. *J. Clin. Pharmacokinet.,* v. 19, n. 4, p. 264-279, 1990.

KARLE, J.; BHATTACHARJEE, A.K. Stereoelectronic features of the *Cinchona* alkaloids determine their diferential antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem.* v.7, 1769-1774, 1999.

KARLE, J.M.; BHATTACHARJEE, A.K.; VENNERSTROM, J.L. Crystal structure of the potent bisquinoline antimalarial agent (±)-*trans*-*N*1,*N*2-bis(7-chloroquinolin-4-yl)cyclohexane-1,2-diaminedimethane sulfonate salt hydrate in relation to its biological properties. *J. Chem. Crystal.*, v. 32, Ns. 5–6, 2002.

KATZUNG, B.G.. *Farmacologia básica e clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006. 992 p.

KEYSTONE, J.S. Prevention of malaria. *Drugs,* v. 39, p. 337-354, 1990.

KOLATA, G. The search for a malaria vaccine. *Science*, v. 226, p. 679-682,1992.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara 2007/2008*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. n.p.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2. ed., New York: Wiley-Interscience, 1988, 1204p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4a. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.pt1.

KROGSTAD, D.J.; GLUZMAN, I.Y.; KYLE, D.E.; ODUOLA, A.M.; MILHOUS, W.K.; SCHLESINGER, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: Mechanism of chloroquine resistance. *Science,* v. 238, p. 1283-1285, 1987.

LIÑARES, G.E.; RODRIGUEZ, J.B. Current status and progresses made in malaria chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, v.14, n.3, p.289-314, 2007.

LOIOLA, C.C.P.; SILVA, C.J.M.; TAUIL, P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev. Panam. Salud Publica/Panam. J. Public Health,* v.11, p.235-244, 2002.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B. ; RUIZ, C.M.R.; MIRANDA, M.T.M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quím. Nova*, v. 27, p. 781-789, 2004.

MCKERROW, J.H. Parasite proteases. *Exp. Parasitol.,* v.68, n.10, p.111-5, 1989.

MELTON, R.G.; KNOX, R.J.; CONNORS, T.A. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Drugs Fut.,* Barcelona, v. 21, n. 2, p. 167-181, 1996.

MENÉNDEZ, J. C.; AVENDAÑO, C. Diseño de fármacos por modulación de su farmacocinética: estrategias y aplicaciones. In: AVENDAÑO, M.C., Ed. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1993. p. 197-227.

MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modulating agents in resistant malaria. *Drugs Design Rev-Online*, v.2, p.409-418, 2005.

MILLER, L.H; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v. 415, p.673-679, 2002.

MILLER, L.H. The challenge of malaria. *Science*, v. 257, p. 36-37, 1992.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIONS DISEASES/NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. *Epidemiology focus group report* [on line]. http://www.niaid.nih.gov/dmid/malafr/epidemio.htm> . Acessado em maio de 2008.

NODIFF, E.A.; CHATTERJEE, S.; MUSALLAM, H.A. Antimalarial activity of the 8-aminoquinolines. *Prog. Med. Chem.,* London, v. 28, p. 1-40, 1991.

NORTH, M.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Cysteine Proteinases of Parasitic Protozoa. *Parasitol. Today*, v. 6, p. 270-275, 1990.

OGA, S.; FERREIRA, E.I. Parasitoses intestinais e malária. In: ZANINI, A.C., OGA, S., eds. *Farmacologia Aplicada*, 5. ed., São Paulo: Atheneu, 1994. p.481-501.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharm. Ther.,* v. 89, p. 207-219, 2001.

OLUMESE, P. Guidelines for t he treatment of malaria. Geneve: World Health Organization, 2006. 266 p.

ORLOV, V.S.; RABINOVICH, S.A. A new approach to overcoming the drug resistance of the causative agents of malaria. *Med. Parazitol.* v. 5, p. 18-21, 1990.

OTELO, V.A. *Emprego da modelagem molecular no planejamento de novos compostos heterocíclicos úteis contra malária resistente.* São Paulo, 2008. 185 p. [Dissertação de Mestrado].Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

PANISKO, D.M.; KEYSTONE, J.S. Treatment of malaria. *Drugs*, v. 39, n. 2, p. 160-189, 1990.

PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today,* v. 3, p. 241-246, 1987.

PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D.R. *Purification of laboratory chemicals.* 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1980, p.167-168 e 320-32.

PETERS, W. Mefloquine/sulfadoxine/pyrimethamine for malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, n. 6, p. 699, 1995.

PETERS, W. New answers through chemotherapy? *Experientia*, Basel, v. 40, n. 12, p. 1351-1357, 1984.

PETERS, W. *Plasmodium*: resistance to antimalarial drugs. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.,* v. 65, n. 1, p. 103-106, 1990.

PHILLIPS-HOWARD, P.A.; BJORKMAN, A.B. Ascertainment of risk of serious adverse reactions associated with chemoprophylactic antimalarial drugs. *Bull. WHO,* v. 68, n. 4, p. 493-504, 1990.

PHILLIPSON, J.D.; WRIGHT, C.W. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J. Ethnopharmacol,* v. 32, n. 1-3, p. 155-165, 1991.

POZNANSKY, M.J.; CLELAND, L.G. Biological macromolecules as carriers of drugs and enzymes. In: JULIANO, R.L., ed. *Drug*

delivery systems: characteristics and biomedical applications. New York: Oxford University, 1980. p. 253-315.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África,* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.

RIDLEY, R.G.; WHITE, J.H.; McALEESE, S.M.; GOMAN, M.; ALANO, P.; de VRIES, E.; KILBEY, B.J. DNA polymerase δ: gene sequences from *Plasmodium falciparum* indicate that this enzyme is more highly conserved than DNA polymerase α. *Nucl. Acids Res.*, v.19, p.6731-6736, 1991.

RODRIGUES, C.R. Processos Modernos no desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. *Quím. Nova na Escola*, n. 3, p. 43-49, 2001.

ROSENTHAL, P.J. Antimalarial drug discovery: old and new. *The J. Exp. Biol.*, v.206, p.3735-3744, 2003.

SABNIS, Y.A.; DESAI, P.V.; ROSENTHAL, P.J.; AVERY, M.A. Probing the structure of falcipain-3, a cysteine protease from *Plasmodium falciparum*: Comparative protein modeling and docking studies. *Protein Sci.*, v.12, p. 501-509, 2003.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, v. 415, p.680-685, 2002.

SANCHEZ, C.P.; WUNSCH, S.; LANZER, M. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Diferences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.2652-2658, 1997.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Quim. Nova,* v.25, n.3, p.505-512, 2002.

SAUER, D.R.; KALVIN, D.; PHELAN, K.M.; Microwave-Assisted Synthesis Utilizing Supported Reagents: A Rapid and Efficient Acylation Procedure *Org. Lett.*; v.5, n.24, p.4721-4724., 2003.

SCHACHT, E.H.; VANSTEENKISTE, S.; SEYMOUR, L. Macromolecular carriers for drug targeting. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic, 2003. p.587-600.

SEWALD, N.; JAKUBKE, H.D. *Peptides: Chemistry and Biology*, Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 135-256.

SHENAI, B.R.; SIJWALI, P.S.; SINGH, A., ROSENTHAL, P.J. Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteíne protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, 29000-29010, 2000.

SIJWALI, P.S; BRINEN, L.S.; ROSENTHAL P.J. Systematic Optimization of Expression and Refolding of the *Plasmodium falciparum* Cysteine Portease. *Prot. Expres. Purific.*, v. 22, p. 128-134, 2001.

SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. *Mini Rev. Med. Chem.*, v.5, p.893-914, 2005.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, W.B.; Conformational Analyses of the antimalarial agent quinidine. *Bioorg. Med. Chem.*, v.5. p.353-361, 1997.

SINGH, G., SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in

prodrug design. *Indian J. Pharm. Sci.*, v.56, n.3, p.69-79, 1996.

SINKULA, A.A. Sustained drug action accomplished by the prodrug approach. In: BUNDGAARD, H. ed. - *Design of prodrugs.* Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 157-176.

SIRI, J.G.; LINDBLADE, K.A.; ROSEN, D.H.; ONYANGO, B.; VULULE, J.; SLUTSKER, L.; WILSON, M.L.. Quantitative urban classification for malaria epidemiology in sub-Saharan Africa. *Malaria J.*, v.7, p. 1-9, 2008.

SRIVASTAVA, I.K.; VAIDYA, A. A mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, v.43, p. 1334-1339, 1999.

STEWART, J.M. Solid phase peptide synthesis, Rockford, III: Pierce Chemical Co., 1984. 176 p.

TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v.18, n.3, p.207-231, 1995.

THE MALARIA FOUNDATION. Fact pack [on line]. Disponível na Internet: http://www.malaria.org, acesso em maio de 2008.

TRACY, J.W.; WEBSTER JR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoa infections: malaria. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics.* 9 ed. New York: Pergamon-Press, 2003. p.803-822.

TRIGG, P.I.; KONDRACHINE, A.V. *Commentary: malaria control in the 1990s. Bull.World Health Organ.*, v. 76, p.11-6, 1998.

TRIPATHI, R.; DUTTA, G.P.; VISHWAKARMA, R.A. Gametocytocidal activity of alpha/beta arteether by the oral route of administration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 54, p. 652-654, 1996.

TRIPATHI, R.; PURI, S.K.; DUTTA, G.P. Sodium beta – artelinate - a new potential gametocytocide. *Exp. Parasitol.,* v. 82, n. 3, p. 251-254, 1996.

TROSSINI, G.H.G. *Antichagásicos potenciais: síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural.* São Paulo, 2004, 130 p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

TUTEJA R. Malaria - an overview. *FEBS J.*, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G.; WOOLDRIGE, K.R.M. *Drug Design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. p.47-72.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____ *The practice of Medicinal Chemistry.* London: Academic Press, 2003. p.561-586.

WERNSDORFER, W.H. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop. (Basel)*, v. 56, n. 2-3, p. 143-156, 1994.

WIESNER, J.; ORTMANN, R.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. New antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed Engl.*, v.42, n. 43, p.5274-5293, 2003.

WINSTANLEY, P.A. Chemotherapy for *falciparum m*alaria: the armoury, the problems and the prospects. *Parasitol. Today*, v.16, n.4, p.146-153, 2000.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, n.4, p. 209-218, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *Management of severe and complicated malaria: a practical handbook*. WHO, Geneva, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *Vector control for malaria and mosquito borne diseases, report of a WHO study group*, WHO, Geneva, 1995.

ZARCHIN, S.; KRUGLIAK, M.; GINSBURG, H. Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. *Biochem. Pharmacol.*, v.35, n.14, p.2435-2442, 1986.