UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Emprego da modelagem molecular no planejamento de novos
compostos heterocíclicos úteis contra malária resistente

Vanessa Almeida Otelo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Carla Maria de Souza Menezes

SÃO PAULO
Dezembro 2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013419

Ficha Catalográfica

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

O87e Otelo, Vanessa Almeida
Emprego da modelagem molecular no planejamento de novos
compostos heterocíclicos úteis contra malária resistente / Vanessa
Almeida Otelo. -- São Paulo, 2007.
190p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Menezes, Carla Maria de Souza

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Plasmodium
falciparum : Resistência a cloroquina : Medicina I. T. II.
Menezes, Carla Maria de Souza, orientador.

615.19 CDD

VANESSA ALMEIDA OTELO

Emprego da modelagem molecular no planejamento de novos compostos
heterocíclicos úteis contra malária resistente

Comissão Julgadora

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Profa. Dra Carla Maria de Souza Menezes
Presidente e Orientadora

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus pais:

A minha querida mãe, Beatriz de Oliveira Almeida Otelo, PELO AMOR e por tudo que representa em minha vida! Sem o seu incentivo e apoio, incondicional, não teria conquistado este trabalho. TE AMO MUITO!!!

Ao meu saudoso pai, Raimundo Nonato Souza Otelo (in memorian). Como sou feliz ao lembrar de todos os momentos que passamos, de todo amor, de toda dedicação... o Srº sempre esteve tão presente... Deixou-me um exemplo de vida, de sabedoria, de boas condutas e dedicação que estarão sempre vivos em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pela luz, pela força, pelo amparo e por sempre me fazer acreditar na vida e na concretização dos sonhos.

Ao meu querido irmão Alexandre por todo amor, apoio, carinho, e amizade.

Aos meus familiares, em especial a minha prima-irmã Poliana, pela grande amizade, por todo apoio, por ser um exemplo para mim e por estar sempre tão presente em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Carla Maria de Souza Menezes, pela oportunidade de realização deste trabalho, ensinamentos e orientação.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira pela boa acolhida e receptividade, sugestões e ensinamentos, sensibilidade, atenção e respeito!

À Profa. Dra. Dalva Lúcia Araújo de Faria pela oportunidade do estudo em colaboração de UV-VIS e Raman Ressonante, por todo auxílio, ajuda, receptividade, motivação e atenção.

Ao pesquisador Dr. Antonio Carlos Sant'Ana, pelo grande auxílio, paciência e transmissão de ensinamentos que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À técnica e doutoranda Kátia Cilene Alves Botelho, por todo auxílio e assistência, ora no laboratório, ora nos computadores da modelagem. Obrigada por toda ajuda e em especial pela amizade!

Ao técnico Charles de Lima Brito, por todo auxílio, assistência e amizade!

Ao Dr. Zaim, pela contribuição nos experimentos de síntese da molécula do AQ-13, extensivo à Kátia, e busca dos dados cristalográficos, por toda assistência e atenção.

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, do LaCrEMM-DQ da Universidade Federal de São Carlos e ao pesquisador Dr. Antônio Carlos Trindade da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela disponibilidade e busca da molécula clorpromazina no banco de dados Cambridge Structural Database.

A três presentinhos de Deus que ganhei durante o mestrado: Jeanine Giarolla (Miga véia), Daniela Gonçalves Rando (Anjówiski) e Carolina Horta Andrade (Carolzinha), por todo carinho, apoio, incentivo, força, amizade, palavras, conversas e convivência!!! Saibam que cada uma de vocês, com seus jeitinhos próprios, foram muito importantes para mim e moram no meu coração!!!

Ao Prof. Dr. Mauro Aquiles pelo auxílio nos experimentos voltamétricos, esclarecimento de dúvidas e convivência.

À Luciana Scotti e D. Lélia, pelo exemplo de vida, alegria, apoio e amizade!

Aos queridos colegas de laboratório Gustavo Trossini, Guilherme Matsutani, Hamilton, Priscila, Sun e Plínio, pela amizade e agradável convívio.

Às minhas amigas de infância: Ruze, Lindijane e Kennya, pelo incentivo, apoio e pelo que significam para mim!

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Bete, Jorge, Elaine e Susy, pelo auxílio nos problemas burocráticos.

À funcionária Raquel, pelo convívio e alegria, em todos os momentos.

E, finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, me apoiaram e incentivaram no decorrer desses anos e contribuíram para a concretização deste sonho, MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida.”

Bob Marley

RESUMO

A maioria das cepas de *Plasmodium falciparum* mostra-se resistente à cloroquina (**CQ**), considerado o antimalárico ideal. A busca por novos agentes terapêuticos bem como a restauração do efeito antimalárico de fármacos disponíveis, através da associação a agentes moduladores da resistência (**AMR**), vem sendo enfatizada. Entretanto, ausência de efeito modulador da resistência e efeito antiplasmódico intrínseco foram observados quando **AMR** clássicos, como o fenotiazínico clorpromazina e o iminodibenzílico desipramina, foram ensaiados *in vitro* em isolados brasileiros de *P. falciparum* resistentes à **CQ**. Sabe-se que a ação antiparasitária de compostos de natureza tricíclica, como os fenotiazínicos, foi descrita há mais de um século e continua a ser de interesse. Em adição, vale notar a ocorrência de farmacóforo comum, formado por sistema heteroaromático, ligado a átomo de nitrogênio, secundário ou terciário, por cadeia lateral de três a quatro átomos de carbono, entre compostos quinolínicos antimaláricos, fármacos psicotrópicos e **AMR**. Este trabalho teve como objetivo estudar, por emprego da modelagem molecular, características estereo-eletrônicas e lipofílicas e a interação a nível molecular de compostos de natureza tricíclica (fenotiazínicos e iminodibenzílicos) com a hematina (provável sítio de ação da **CQ**) comparando ao antimalárico **CQ**. Semelhanças estereo-eletrônicas e lipofílicas puderam ser visualizadas entre as moléculas da **CQ** e dos compostos tricíclicos. No entanto, algumas distinções ausência de planaridade e maior densidade eletrônica sobre os anéis tricíclicos dos anéis heterocíclicos quando comparadas à **CQ**. Tais características se fizeram refletir na interação com a hematina, como demonstrado nos estudos de ancoramento como também nos estudos de UV-VIS e de Raman Ressonante.

ABSTRACT

The most *Plasmodium falciparum* strains show resistance to chloroquine (**CQ**), yet considered the ideal antimalaric agent. The search for new therapeutic compounds and the restoration of the antimalarial effect of available drugs through the association with modulating agents has been emphasized. However, lack of modulating effect and intrinsic antiplasmodial activity were observed when classic modulating agents, such phenothiazine chlorpromazine and iminodibenzyllic desipramine, were tested *in vitro* against Brazilian isolated resistant of *P. falciparum* to **CQ**. The antiparasitic action of tricyclic compounds as the phenothiazine class has been described for more than a century and continues to be of interest. In addition, it was noted the occurrence of common pharmacophore, formed by a heteroaromatic system, a secondary or tertiary nitrogen atom, linked by a side chain of three to four carbon atoms, present among the quinoline antimalarials, the psychotropic drugs and the modulating agents of chloroquine resistance. The goal of this work was by using molecular modeling to study stereo-electronic features and lipophilic characteristics and the interaction on molecular level of tricyclic compounds (phenothiazines and iminodibenzyllics) with hematin (probable site of action of CQ) in comparison to antimalaric **CQ**. In results, similarities stereo-electronic and lipophilic could be viewed between the molecules of **CQ** and tricyclic compounds. However different features could be noticed such as absence of planarity and a higher electronic density on the tricyclic rings when compared to **CQ**. These features shown to be relevant to interaction with the μ -oxo dimer of hematin, as observed in docking studies and UV-VIS and Resonance Raman.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	13
1.1. INTRODUÇÃO	14
1.2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. MALÁRIA	22
2.1.1. Epidemiologia e Resistência	22
2.1.2. Espécies e Ciclo de Vida do Parasito <i>Plasmodium</i>	24
2.2. CLOROQUINA E OUTROS ANTIMALÁRICOS	27
2.2.1. Mecanismo de Ação	29
2.2.2. Mecanismo de Resistência	32
2.3. ANTIMALÁRICOS EM ESTUDO	33
2.4. AGENTES MODULADORES DA RESISTÊNCIA	39
2.4.1. Emprego de AMR em Cepas Brasileiras de <i>P. Falciparum</i> Resistentes à Cloroquina	41
2.4.2. Relação Estrutura-Atividade	45
2.4.3. AMR para Malária em Estudo	49
2.5. COMPOSTOS TRICÍCLICOS COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS	51
2.6. MODELAGEM MOLECULAR	54
2.6.1. Emprego das Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas	55
2.6.1.1. <i>Métodos de Cálculo</i>	60
2.6.2. Estudos de Ancoramento	64
3. METODOLOGIA	67
3.1. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR	68
3.1.1. Estudos de Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas	68
3.1.2. Estudos de Ancoramento	69
3.1.2.1 <i>Programa Spartan</i>	69
3.1.2.1 <i>Programa GOLD</i>	70
3.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS	71
3.2.1. Materiais	71

3.2.2. Equipamentos e Acessórios	72
3.2.3. Soluções Empregadas	72
3.2.3.1. <i>Soluções-Tampão</i>	72
3.2.3.2. <i>Solução de Hematina</i>	73
3.2.3.3. <i>Solução dos Compostos Tricíclicos e da Cloroquina</i>	73
3.2.4. Métodos para a obtenção do espectro	74
3.2.4.1. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível	74
3.2.4.2. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Raman Ressonante	74
3.2.4.3. Estudo Comparativo da Afinidade de Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível	75
3.2.4.4. Estudo da Complexação do AQ-13 com a Hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível e Raman Ressonante	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR	77
4.1.1. Estudos de Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas	77
4.1.1.1. <i>Compostos da Série 1</i>	77
4.1.1.2. <i>Compostos da Série 2</i>	107
4.1.1.3. <i>Compostos Protótipos e Agentes Antimaláricos</i>	122
4.1.1.4. <i>Agentes Antimaláricos em Desenvolvimento</i>	126
4.1.2. Estudos de Ancoramento	131
4.1.2.1. <i>Programa Spartan</i>	131
4.1.2.2. <i>Programa GOLD</i>	140
4.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS	143
4.2.1. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível	143
4.2.1.1. <i>Estudo Cinético da Hematina</i>	143
4.2.1.2. <i>Estudo Cinético da Associação Composto-hematina</i>	147
4.2.2. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Raman Ressonante	155
4.2.3. Estudo Comparativo da Afinidade de Complexação Composto-	159

hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível

4.2.4. Estudo da Complexação do **AQ-13** com a Hematina por 162
Espectroscopia Ultravioleta-visível e Raman Ressonante

5. CONCLUSÕES 164

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 167

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

A maioria das cepas de *Plasmodium falciparum*, espécie do parasito causador da malária e principal responsável pela morbi-mortalidade associadas à doença, mostra-se resistente à cloroquina (**CQ**), derivado 4-aminoquinolínico considerado como antimalárico ideal (Ginsburg *et al.*, 2005). A restauração do efeito terapêutico dos antimaláricos disponíveis, em especial da **CQ**, através da associação a agentes moduladores da resistência é enfatizada por organismos mundiais de saúde (van Schalkwyk & Egan, 2006). Esforços neste sentido são preconizados como de interesse primordial e urgente, em particular, para países em desenvolvimento como o Brasil, onde a malária é de natureza endêmica, e cujo tratamento pouco interesse desperta aos grandes conglomerados farmacêuticos (WHO, 2007).

Um agente modulador da resistência (**AMR**) é aquele usado em associação a um fármaco ao qual se observa resistência, com a finalidade de restaurar a eficácia terapêutica deste último. Como característica, é necessário que o **AMR** seja destituído da ação terapêutica que se trata, de toxicidade e efeitos adversos, sendo, na maioria das vezes, um fármaco de classe terapêutica distinta ou composto planejado para atuar com esta finalidade (Ford & Hait, 1990).

Entretanto, ausência de efeito modulador da resistência e efeito antiplasmódico intrínseco foram observados quando **AMR** clássicos, como desipramina (composto tricíclico iminodibenzílico) e clorpromazina (composto tricíclico fenotiazínico) foram ensaiados *in vitro* em isolados brasileiros de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Menezes, 1997). Vale considerar que estes efeitos ocorreram em concentrações inferiores às utilizadas em ensaios para modulação da resistência bem como também inferiores às concentrações terapêuticas específicas de cada composto. Em adição, a ação antiparasitária de fenotiazínicos é descrita há mais de um século e continua a ser de crescente interesse (Ademowo *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2007a, 2007b). Ademais, semelhanças estruturais são observadas entre os farmacóforos das classes dos antimaláricos 4-aminoquinolínicos e agentes psicotrópicos fenotiazínicos e iminodibenzílicos, as quais são também comuns a um **AMR** (Menezes & Ferreira, 2005).

Sistema aromático ou heteroaromático (natureza hidrofóbica), ligado a átomo de nitrogênio (amina terciária ou secundária, dotado de natureza eletrônica aceptora de ligação de hidrogênio) através de cadeia lateral contendo três a quatro átomos de carbono são apontadas como requisitos estruturais tanto para a atividade antimalárica de compostos quinolínicos (van Schalkwyk & Egan, 2006), como para a ação de fármacos tricíclicos (Pradines *et al.*, 2005) bem como para a maioria dos **AMR** já conhecidos (Bhattacharjee *et al.*, 2002; van Schalkwyk & Egan, 2006) como também nos recentemente reportados (van Schalkwyk & Egan, 2006; Kelly *et al.*, 2007).

O inesperado efeito antiparasitário observado para **AMR** clássicos em isolados brasileiros de *P. falciparum* resistentes à **CQ**, a conhecida atividade antiplasmódica de derivados fenotiazínicos, a ocorrência de farmacóforos comuns entre compostos antimaláricos, fármacos psicotrópicos e **AMR** faz pensar na possibilidade de ação antiparasitária dos **AMR** ensaiados, como clorpormazina e desipramina, por mecanismo semelhante ao da **CQ**. Este antimalárico e outros da classe da quinolinas são acreditados agir por interação com a hematina, molécula potencialmente tóxica para o parasito, resultante da degradação da hemoglobina (Kumar *et al.*, 2007).

A possibilidade de similaridade quanto ao mecanismo de ação antiparasitário destes compostos com o da CQ pode ser verificada, por exemplo, por uso da modelagem molecular (MM). Esta metodologia faz uso de técnicas computacionais para a investigação de interações intramoleculares entre o ligante e seu receptor como também para a exploração de características estruturais do complexo molécula-ligante relacionadas ao efeito biológico (Carvalho *et al.*, 2003). Em razão disto, a MM vem sendo utilizada com frequência nos processos de avaliação e planejamento de novos fármacos, incluindo os candidatos a agentes antimaláricos (Alibert *et al.*, 2002; Portela *et al.*, 2003, 2004).

Ressalta-se que este projeto de pesquisa integra projeto de modelagem molecular desenvolvido como parte do Programa de Apoio a Projetos Institucionais com a Participação de Recém-Doutores (PRODOC-CAPES 00019-03-8), junto a este Programa de Pós-graduação.

1.2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Em razão do exposto, estudo de modelagem molecular será efetuado com o objetivo de elucidar a possibilidade de interação, ao nível molecular, de **AMR** clássicos contendo sistema tricíclico heteroaromático como o fenotiazínico, presente na clorpromazina, e sistema iminodibenzílico, como apresenta a desipramina, com o provável sitio de ação da **CQ**. Pretende-se assim, avaliar a possibilidade de indicação de novo sistema heterocíclico com conseqüente desenvolvimento de novos candidatos a agentes antimaláricos bem como esclarecer a inesperada atividade antiplasmódica intrínseca e ausência de efeito modulador da resistência observados em isolados de brasileiros de *P. falciparum*.

Para a realização deste estudo, cálculo e análise de propriedades físico-químicas e de superfícies stereo-eletrônicas associada a estudo de simulação da interação a nível molecular (ancoramento) com a hematina serão efetuados. Estudos espectrométricos na região do ultravioleta-visível (UVVIS) e de Raman ressonante (RR) serão realizados em auxílio à interpretação dos resultados teóricos obtidos.

Os compostos em estudo foram divididos de acordo com a atividade biológica apresentada e têm as estruturas químicas apresentadas a seguir:

Série 1: constituída pelos antimaláricos CQ e mepacrina (MPC), derivado da classe das acridinas; compostos iminodibenzílicos (IMN): desipramina (**DSP**) e imipramina (**IMP**), e compostos fenotiazínicos (**FNT**): clorpromazina (**CPZ**), levomepromazina (**LVM**), flufenazina (**FFN**) e trifluoperazina (**TFP**), os quais apresentaram atividade contra cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Menezes *et al.*, 1997, 2002); derivados dibenzosuberanilpiperazina **DBZ** (Osa *et al.*, 2003) e o fenotiazínico **FNT** (Guan *et al.*, 2002), apontados na literatura como candidatos promissores a **AMR**, e pela clorfeniramina, **CFN**, conhecido antagonista de receptor histamínico H1 e o único **AMR** a ser empregado na terapêutica em associação à **CQ** (Sowunmi & Oduola, 1997, Sowunmi *et al.*, 2005).

Série 2: formada por compostos iminodibenzílicos e fenotiazínicos (Tabelas 1 e 2), os quais apresentam variações no comprimento da cadeia lateral e na natureza da

substituição do nitrogênio amínico ligado a esta. Estes compostos apresentaram atividade antimalárica e moduladora da resistência variada e paralela (Osa *et al.*, 2003, Guan *et al.*, 2002). Serão também estudados a tioridazina (**TRD**) (Amaral, Viveiros & Kristiansen, 2005) e o derivado tribásico da clorpromazina (**T-CPZ**) (Kalkanidis *et al.*, 2002), ambos compostos fenotiazínicos com atividade antimalárica e considerados como protótipos em potencial.

Outros dois compostos recentemente reportados na literatura como candidatos a agentes antimaláricos foram adicionados ao estudo com vistas à complementar a análise proposta: o **AQ-13**, derivado sintético da **CQ** e de maior atividade em cepas resistentes (Ramanathan-Girish *et al.*, 2004) e o **RCQ**, composto formado pela junção da **CQ** e da **IMP**, com atividade superior ao seu protótipo em cepas sensíveis e resistentes (Burguess *et al.*, 2006). A inclusão do composto **RCQ** lançou-nos a idéia de substituir o anel iminodibenzílico da **IMP** pelo anel fenotiazínico da **CPZ** e estudar este análogo, que foi denominado **RCQ-CPZ**.

SÉRIE 1

Cloroquina (CQ)

Mepacrina (MPC)

	X	R'	R''	
	CF ₃	H	CH ₂ N(CH ₂) ₄ NCH ₃	Trifluoperazina(TFP)
	Cl	H	CH ₂ N(CH ₃) ₂	Clorpromazina(CPZ)
	OCH ₃	CH ₃	CH ₂ N(CH ₃) ₂	Levomeprazina(LVM)
	CF ₃	H	CH ₂ N(CH ₂) ₄ NCH ₂ CH ₂ OH	Flufenazina(FFN)

Derivado
Dibenzosuberanilpiperazina
(DBZ)

Derivado Fenotiazínico
(FNT)

Composto	X	R ₁ , R ₂
FNT 1	S	CH ₃ , CH ₃
FNT 2	S	C ₆ H ₅ CH ₂ , C ₆ H ₅ CH ₂
FNT 3	S	Pirrolidinil
IMN 1	CH ₂ CH ₂	CH ₃ , CH ₃
IMN 2	CH ₂ CH ₂	C ₆ H ₅ CH ₂ , C ₆ H ₅ CH ₂
IMN 3	CH ₂ CH ₂	Pirrolidinil

Composto	R	R ₁	R ₂
IMP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	N(CH ₃) ₂	H
DSP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	HNCH ₃	H
CLP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	N(CH ₃) ₂	Cl
IMN 4	CH ₂ CH ₂ CH ₂	2-metil-piperazina	H
IMN 5	CH ₂ CH ₂ CH ₂	3-metil piperazina	H
IMN 6	COCH ₂	H	H

PROTÓTIPOS DE ANTIMALÁRICOS EM POTENCIAL

Tioridazina (TRD)

**Derivado tribásico da clorpromazina
(T-CPZ)**

NOVOS CANDIDATOS A ANTIMALÁRICOS

AQ-13

RCQ

RCQ-CPZ
(COMPOSTO MODELO ANÁLOGO AO RCQ)

RCQ-CPZ

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MALÁRIA

2.1.1. Epidemiologia e Resistência

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a malária como a principal doença endêmica tropical do mundo, atingindo regiões da Ásia, África, América Central e do Sul, Oceania e algumas ilhas caribenhas (Figura 1) (WHO, 2007).

Figura 1 - Mapa epidemiológico da malária no mundo (World Malaria Report 2004).

De acordo com Snow e colaboradores (2005), mais de dois bilhões de pessoas no mundo estão expostas à malária e, em 2002, ocorreram cerca de 515 milhões de casos clínicos do tipo *falciparum*, estimativa quase 50% maior do que a reportada pela OMS.

Estimativa superior também é reportada por Smith e colaboradores (2007), os quais propõem novo cálculo da incidência de casos da doença. Em adição, menos da metade dos países endêmicos da África (22 de 49 países) forneceram informações atualizadas do registro de mortes, diferentes daquelas enviadas para a OMS no ano de 2003. Sabe-se ainda, por exemplo, que o número de morte por malária notificado pelo Kenya em 2002, 135 casos, é menor do que a realidade (Hay & Snow *et al.*, 2006).

Tendo em vista estas dificuldades foi criado o Projeto Atlas da Malária, do inglês *Malaria Atlas Project (MAP)*, financiado durante 5 anos pela *Wellcome Trust* (Reino Unido), sendo oficialmente lançado com o site (<http://www.map.ox.ac.uk>) em maio de 2006. O *MAP* é um projeto conjunto entre o Grupo de Saúde Pública e de Epidemiologia da Malária do Centro de Medicina Geográfica do Quênia e o Grupo de Epidemiologia e Ecologia Espacial da Universidade do Oxford, Reino Unido. Este projeto terá como principal finalidade obter dados atualizados da situação e risco de contrair a malária em diversas regiões do mundo, bem como identificar populações suscetíveis e prever o impacto da doença nas regiões afetadas. A data de 1º de junho de 2009 foi estabelecida para o lançamento da versão integral e apresentação dos primeiros resultados (Hay & Snow *et al.*, 2006).

No Brasil, a área de maior risco epidemiológico encontra-se na região amazônica (Figura 2). Dados do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde (Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2006) apontam que 99,5% dos casos da doença ocorrem na Amazônia Legal. No final de 2004, o Índice Parasitário Anual (IPA) para esta região foi igual a 19,9/1.000, relação consideravelmente elevada, tornando a malária a doença que mais contribui para a decadência sócio-econômica local. Em adição, o grande fluxo migratório desta região para outros estados brasileiros tem causado, nos últimos anos, o surgimento de surtos de malária, como registrado em 2005, no Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Ceará, Minas Gerais e Bahia (Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2006). Entretanto, é importante ressaltar que, conforme destacou Snow e colaboradores (2005), o número de pessoas afetadas pela malária em nosso País seria o triplo daquele registrado pela OMS.

Figura 2 – Mapa epidemiológico da malária no Brasil (ANVISA, 2005).

A resistência ou multi-resistência do plasmódio, protozoário causador da malária, à terapia atualmente disponível é o principal fator responsável em fazer da malária a doença parasitária tropical mais importante no mundo.

A maioria das cepas de *Plasmodium falciparum*, espécie associada à morbimortalidade característica da malária, mostra-se resistente à cloroquina enquanto que decréscimo na sensibilidade do parasito é notificado para antimaláricos de segunda classe como pirimetamina e sulfadoxina (Biagini *et al.*, 2003; White, 2004). Além disso, outras espécies de plasmódio, como o *P. vivax*, também têm se mostrado resistentes aos antimaláricos disponíveis (Ratcliff *et al.*, 2006).

2.1.2. Espécies e Ciclo de Vida do Parasito *Plasmodium* (Tuteja, 2007)

Quatro diferentes espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* são capazes de causar malária ao homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, esta última não presente no Brasil. Dentre estas espécies, as mais disseminadas são a *P. vivax* e *P. falciparum*. A primeira, encontrada na Ásia, África, Oceania, Oriente Médio e nas Américas, é responsável por infecções recorrentes e debilitantes, mas que raramente levam a óbito, uma vez que invadem somente eritrócitos jovens imaturos. As crises

paroxísticas (febres altas e tremores causados com a lise dos eritrócitos) provocadas por esta espécie ocorrem a cada 48 horas. Ambas as características denominam este tipo de como benigna terciária. A infecção causada pela espécie *P. falciparum* é classificada como malária maligna terciária pois é mais agressiva, causando óbito por coma ou anemia. Entretanto seja a espécie mais disseminada em todo o mundo, é mais comumente encontrada na África (NIH, 2007).

Semelhante à *P. vivax*, as espécies *P. ovale* e *P. malarie* não causam malária grave por destruírem somente eritrócitos imaturos ou já envelhecidos, respectivamente. A espécie *P. ovale* causa também a malária classificada como benigna terciária e é prevalente na África, existindo ainda na América do Sul, sendo mais rara na Ásia. A espécie *P. Malarie* causa a malária benigna quartã, com ciclos a cada de 72 horas, é considerada a menos freqüente apesar de ocorrer em todos os continentes (NIH, 2007).

O ciclo de vida do parasito (Figura 3) inicia-se com o repasto da fêmea do mosquito *Anopheles* (hospedeiro invertebrado), infectado, que inocula no homem (hospedeiro vertebrado) uma pequena quantidade de saliva contendo os esporozoítos, formas primárias de infecção. Estima-se que em menos de 60 minutos, estes esporozoítos migram da corrente sangüínea e invadem as células hepáticas, nas quais se transformam em esquizontes teciduais primários, processo denominado esquizogonia tecidual, correspondendo à fase exo-eritrocítica do ciclo de vida do parasito.

Os esquizontes teciduais primários dividem-se assexuadamente (fase assexuada) em merozoítos e, até esta etapa do ciclo, o indivíduo infectado não manifesta qualquer sintoma característico da doença. Apenas sete a 10 dias após a picada, no caso do *P. falciparum*, as células hepáticas se rompem e tem início a fase eritrocítica do ciclo. Nesta fase, os merozoítos entram na corrente sangüínea e infectam os eritrócitos, nos quais assumem a forma anelar denominada trofozoíto. Neste estágio, o trofozoíto degrada a hemoglobina humana para desenvolver-se e atingir o estágio seguinte de esquizonte sangüíneo.

No entanto, os merozoítos podem também permanecer no interior dos hepatócitos transformando-se em formas latentes denominadas hipnozoítos, as quais

são responsáveis pela ocorrência de recidivas da doença dentro de período que varia de seis a 12 meses.

Os esquizontes sangüíneos continuam a se dividir (esquizogonia eritrocítica) até o rompimento do eritrócito e liberação de outros merozoítos na corrente sangüínea, os quais manterão o ciclo assexuado no hospedeiro humano. Nesta fase, com o rompimento e invasão de novos eritrócitos, ocorrem os sintomas típicos da malária tais como febre alta, calafrios e anemia. Após alguns ciclos eritrocíticos uma parcela de merozoítos origina formas sexuadas do parasito, os gametócitos masculinos e femininos.

Em nova picada, o mosquito *Anopheles*, ingere os gametócitos dando início à fase sexuada do ciclo biológico. No interior do estômago do mosquito, ocorre a fecundação e posterior formação do ovo ou zigoto. Este último se transforma em oocineto, que dotado de mobilidade, penetra a parede do estômago e origina o oócito. Esta forma se fixa entre a parede do estômago e a membrana basal, originando os esporozoítos. Quando maduros, os esporozoítos rompem o oócito e migram para as glândulas salivares do mosquito. No ato da picada, estas formas migram para o hospedeiro humano, reiniciando o ciclo.

Figura 3 - Ciclo de vida do parasito *Plasmodium* (http://www.imm.ul.pt/html/Ciclo_Vida.bmp)

2.2. CLOROQUINA E OUTROS ANTIMALÁRICOS

Diversos antimaláricos estão disponíveis na terapêutica (von Seidlein & Greenwood, 2003; Jana & Paliwal, 2007). Estes podem ser apresentados segundo a classe química às quais pertencem ou, segundo o estágio evolutivo do ciclo de vida do parasito em que atuam.

De acordo com a classe química (WHO, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Vangapandu *et al.*, 2007), os antimaláricos disponíveis se dividem em:

- (1) derivados acridínicos, como a mepacrina (Figura 4) e a pironaridina;
- (2) derivados quinolinometanólicos, como a quinina, mefloquina (Figura 4) e halofantrina;
- (3) derivados 8-aminoquinolínicos, como a primaquina e seu análogo tafenoquina (WR 238605) (Krockett & Kain, 2007);
- (4) derivados 4-aminoquinolínicos, como a cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina (Figura 4);
- (5) derivados diaminopirimidínicos, como a pirimetamina (Figura 4) e trimetopima;
- (6) derivados sulfonamídicos tais como a sulfadiazina, sulfapirazina, sulfadoxina (Figura 4) e sulfametoxazol;
- (7) lactonas sesquiterpênicas, como a artemisinina extraída da *Artemisia annua* L., e seus derivados como diidroartemisinina e artesunato.

Figura 4 – Antimaláricos segundo a classificação química

De acordo com o estágio de vida do parasito em que atuam, os antimaláricos se classificam em (Vangapandu *et al.*, 2007):

- (1) esquizonticidas teciduais que, como o próprio nome indica, agem diretamente sobre as formas assexuadas pré-eritrocíticas, impedindo assim o estágio eritrocítico posterior. Desta forma, representam a profilaxia causal, podendo ser utilizados também para prevenir recidivas de hipnozoítos que permanecem latentes. Exemplos de esquizonticidas teciduais são proguanil, pirimetamina e primaquina;
- (2) esquizonticidas eritrocíticos, os quais atuam nas formas assexuadas prevenindo a esquizogonia eritrocítica. O uso desta classe de fármacos se destina à cura clínica ou supressiva. Exemplos de fármacos que atuam neste estágio são cloroquina, quinina e mefloquina;
- (3) gametocitocidas, são fármacos que destroem as formas sexuadas do parasito no sangue impedindo, desta forma, a contaminação do mosquito. Dentre os fármacos que atuam como gametocitocidas, a cloroquina apresenta atividade contra *P. vivax*, a quinina contra *P. malariae* e a primaquina contra todas as espécies de plasmódio incluindo a *P. falciparum*;
- (4) esporontocidas, os quais quando ingeridos pelo hospedeiro vertebrado, impedem a formação de oócitos e esporozoítos. Exemplos de antimaláricos que atuam deste modo são a primaquina e a pirimetamina.

Dentre os antimaláricos usados na terapêutica, o derivado 4-aminoquinolínico cloroquina (**CQ**) merece destaque. Este fármaco é empregado desde a Segunda Guerra Mundial e, a despeito da alta incidência de resistência do plasmódio, nos casos de sensibilidade, é ainda considerado agente terapêutico bastante útil (Ginsburg *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2007).

A **CQ** pode ser utilizada tanto na profilaxia como no tratamento da doença, apresentando excelentes propriedades farmacocinéticas tais como rápida ação, meia-vida relativamente longa e larga margem de segurança, podendo ser administrado inclusive em mulheres grávidas. Em adição, a **CQ** mostra-se como fármaco de baixo custo de produção, característica importantíssima para países em desenvolvimento e usualmente endêmicos (Ginsburg *et al.*, 2005; *Guidelines for treatment of malaria*, 2006).

2.2.1. Mecanismos de Ação

O mecanismo de ação de fármacos quinolínicos é provavelmente relacionado à interferência no processo metabólico de destoxificação da hematina pelo parasito (O'Neill *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2007).

Diferentes estudos demonstram que, durante a fase eritrocítica e no interior de seu vacúolo digestivo, o provável local de ação da **CQ** e de pH entre 5,2 e 5,6, o parasito degrada a hemoglobina humana em busca de suprimento de aminoácidos necessários para sua síntese protéica (Kumar *et al.*, 2007). Neste processo, a hemoglobina é oxidada à metemoglobina e, em seguida, hidrolisada por enzimas aspárticas (plasmepsinas I, II, IV e proteases histo-aspárticas) em grupo heme livre (Fe^{3+}), ferriprotoporfirina ou, ainda, hematina (Figura 5), mais globina desnaturada (Kumar *et al.*, 2007). A globina desnaturada é novamente hidrolisada por ação de cisteinil proteases (como a falcipaina) em peptídeos menores, os quais são transportados para o citoplasma do parasito onde serão hidrolisados e utilizados na síntese de proteínas parasitárias.

A hematina liberada acumula-se no vacúolo digestivo do parasito, atingindo elevada concentração e mostrando-se potencialmente tóxica por formar espécies oxigenadas reativas que podem induzir o parasito ao estresse oxidativo e levá-lo à morte. Em adição, a hematina, por ser muito lipofílica, pode intercalar-se facilmente na membrana do vacúolo digestivo do parasito, causando mudanças na sua permeabilidade como ainda induzir à peroxidação lipídica, ruptura e conseqüente morte do parasito (Kumar *et al.*, 2007). Acredita-se que a hematina se encontre na forma de

dímero μ -oxo, o qual é constituído por ligação de dois monômeros da hematina (Figura 5) unidos através de um átomo de oxigênio através de ligação covalente.

Para se defender da toxicidade da hematina, o parasito utiliza alguns mecanismos, dentre os quais se destaca a formação da hemozoína, espécie microcristalina e insolúvel em água, também reconhecida como o pigmento característico da malária formada (Egan, 2001). A hemozoína é formada por dois tipos de interações simultâneas entre unidades de hematina, sendo uma interação formada entre o átomo de ferro de uma unidade com o grupo carboxilato de outra hematina (Figura 5) e, uma segunda interação, entre os grupos carboxílicos de duas unidades diferentes, por meio de ligação de hidrogênio (Sullivan, 2002).

Figura 5 – Hematina, seu dímero μ -oxo e hemozoína (O'Neill *et al.*, 1998).

Após a digestão da hemoglobina, 30 a 50% da hematina liberada é convertida em hemozoína não-tóxica. A parte remanescente pode atravessar a membrana do vacúolo digestivo e alcançar o citoplasma do parasito. No interior do citoplasma a toxicidade da hematina é neutralizada por outros sistemas de destoxificação (Kumar *et al.*, 2007) como:

- (1) glutathiona redutase, um tripeptídeo presente no citosol do parasito e responsável por sua defesa antioxidante ao manter o estado redox de proteínas contendo grupos tiol (SH). A glutathiona redutase compete com proteínas de membrana do citoesqueleto protegendo o parasito;
- (2) proteínas ligantes com grande afinidade pela hematina, tais como 3-fosfato gliceraldeído desidrogenase e a glutathiona S-transferase, as quais agem por se ligarem

à hematina livre impedindo a formação de espécies oxidativas e desta forma protegendo o parasito ;

(3) degradação da hematina via peróxido de hidrogênio, o qual encontra-se presente no vacúolo digestivo do parasito, levando à formação da espécie intermediária ferril [Fe(IV)], resultante da destruição do anel porfirínico.

A habilidade da **CQ** se ligar à hematina foi sugerida por Fitch e colaboradores, em 1982, e, desde então, vem sendo confirmada por diferentes métodos analíticos como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Dios *et al.*, 2003), de Mössbauer (Adam *et al.*, 1996), fotoacústica (Balasubramanian *et al.*, 1984), espectrofotometria na região do visível (Egan, 2006) bem como Raman Ressonante (Wood & McNaughton, 2007). Tais experimentos físico-químicos sugerem a formação de complexo coplanar do tipo π - π entre o anel aromático da **CQ** e o dímero μ -oxo da hematina. Este complexo ocorreria no interior do vacúolo digestivo do parasito, em que a **CQ** encontra-se diprotonada e a hematina seria a espécie comum em meio aquoso. Outra hipótese sugere-se que a **CQ** poderia se ligar a hemozoína, interferindo no equilíbrio hematina-hemozoína, impedindo a formação adicional de novas unidades de hematina (Egan, 2006; Portela *et al.*, 2004).

Modos de interação complementares são sugeridos ocorrer através da geração de espécies reativas formadas por transferência de elétrons entre o átomo de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e o anel quinolínico da **CQ** (Kumar *et al.*, 2007), bem como por formação de interações hidrofóbicas entre o átomo de Cl da **CQ** e o anel porfirínico (Egan, 2001; 2006).

É importante destacar que estudos *in vitro* em cepas de *P. falciparum* também têm contribuído à elucidação do mecanismo de ação de compotos quinolínicos, uma vez que:

(1) compostos 4-aminoquinolínicos substituídos na posição sete por átomos de halogênio (cloro, bromo, iodo) são os mais ativos, sendo que mudanças do tipo de átomo ou a dissubstituição como, por exemplo, compostos 3-Br, 7-Cl e 5,7-dicloro, tendem a diminuir a atividade destes compostos. No entanto, quando o átomo de cloro na posição 7 é substituído por bromo ou grupo nitro, a atividade é mantida. Sabe-se ainda que a ausência do átomo de cloro na posição 7 não inibe a formação da

hemozoína, apesar de formar complexos com a hematina (De *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2007);

(2) a cadeia lateral de fármacos quinolínicos tem influência significativa sobre a atividade antiplasmodica. Análogos da **CQ** com cadeia lateral mais curta ou mais longa do que esta última apresentam menor atividade (van Schalkwyk & Egan, 2006);

(3) mudanças na cadeia lateral pouco influenciam a atividade em cepas de *P. falciparum* sensíveis à **CQ**, mas interferem na atividade contra cepas resistentes. Estes resultados sugerem que o reconhecimento primário deste composto e, provavelmente de outros fármacos de mesma natureza química ocorreria pela interação da cadeia lateral destes compostos com proteína localizada na membrana do vacúolo digestivo e responsável pela diminuição da concentração do fármaco em seu local de ação (Pradines *et al.*, 2005; van Schalkwyk & Egan, 2006).

(4) a presença do átomo de nitrogênio protonado (N_1) no anel quinolínico é essencial para a atividade antimalárica, por representar ponto adicional de interação com a hematina, mostrando-se inclusive mais importante que o átomo de nitrogênio da cadeia lateral (N_2), por favorecer o alinhamento do anel e a interação do tipo π - π (Cheruku *et al.*, 2003).

Acredita-se que outros mecanismos de ação para a **CQ** envolvem a intercalação de pares de bases do DNA do parasito (Li, 2006), destruição da função do lisossomo e inibição da síntese de proteínas do parasito dependentes da hematina (Vangapandu *et al.*, 2007) e inibição da enzima glutathione redutase (Henry *et al.*, 2006).

2.2.2. Mecanismos de Resistência

Em geral, a resistência biológica a um fármaco ocorre por quatro mecanismos (van Schalkwyk *et al.*, 2006):

(1) a estrutura química do fármaco pode ser alterada tornando-o menos efetivo e conseqüentemente, menos tóxico á célula hospedeira;

(2) a molécula-alvo do fármaco pode ser alterada e este não consegue exercer seu efeito terapêutico;

(3) a molécula-alvo do fármaco pode ser super-expressa, reduzindo assim o efeito do fármaco;

(4) o acúmulo do fármaco pode ser reduzido no interior do seu local de ação devido à presença de proteínas que promoveriam seu efluxo.

Atualmente, a quarta hipótese é mais considerada para explicar a resistência do plasmódio, em especial do *P. falciparum* à **CQ**. Hipóteses apontam a produção e participação dos genes mutantes *pfcr*t e/ou *pfmdr*1 e suas respectivas proteínas, PfCRT e Pgh (Jiang *et al.*, 2006; van Schalkwyk & Egan, 2006). Estas proteínas de transporte, presentes na membrana do vacúolo digestivo do parasito, estariam envolvidas na diminuição da concentração de **CQ** no interior da organela, o que é característica de cepas resistentes (Krogstad *et al.*, 1987), por processo de efluxo do fármaco ou regulação do pH interno (Duraisingh & Cowman, 2005; Henry *et al.*, 2006), embora evidências recentes apontem controvérsias quanto a esta última hipótese (Bray *et al.*, 2002; Hayward *et al.*, 2006). Salienta-se que o gene mutante *pfmdr*1 não se mostra presente em todas as cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ**, em oposição ao observado para o gene *pfcr*t. Neste último, a mutação K76T tem-se evidenciado como um marcador de resistência em cepas de diversas origens (Lakshmanan *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006), inclusive em cepas brasileiras (Vieira *et al.*, 2004; Viana *et al.*, 2006)

2.3. ANTIMALÁRICOS EM ESTUDO

A prevalência da resistência do plasmódio aos antimaláricos disponíveis na terapêutica tem resultado em esforços para a descoberta de novos fármacos. Instituições acadêmicas ou sem fins lucrativos têm se tornado parceiras de indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novos medicamentos para malária (Gelb, 2007). Dentre os vários fármacos em processo de desenvolvimento alguns podem ser destacados.

A artemisinina tornou-se fármaco utilizado com freqüência no tratamento para malária. Terapias combinadas com este fármaco são atualmente recomendadas pela OMS para o tratamento da malária não severa, em regiões onde a resistência para outros antimaláricos é prevalente. Dentre as combinações destacam-se o Piramax, artesunato combinado a pironaridina; o Coartem, artemeter mais lumefantrina; o DHA-piperaquina, associação da diidroartemisinina com a piperaquina e, ainda, o DCA, composto pelo clorproguanila, dapsona e artesunato. Em adição, é crescente o número

de rotas semi-sintéticas para a obtenção de análogos da artemisinina, tais como o artemeter e o artesunato, bem como mudanças na porção δ -lactona, têm sido desenvolvidas com o objetivo de aperfeiçoar as propriedades farmacocinéticas dos compostos protótipos.

Artemisinina

Em fevereiro de 2002, foi publicado na Revista *Science* um novo candidato a fármaco denominado G25 (Wengelnik *et al.*, 2002), análogo da colina, para agir como seu inibidor competitivo. Durante a fase de crescimento do parasito foi verificado ocorrer aumento da biossíntese de fosfatidilcolina provavelmente devido aos processos de divisão do parasito e síntese de membranas biológicas, Este aumento é dependente da absorção de colina, característica comum apenas para eritrócitos infectados. Entretanto, embora o G25 tenha apresentado boa atividade *in vitro*, ativo em macacos infectados e baixa toxicidade, este composto apresentou baixa biodisponibilidade oral, provavelmente dada à presença de cargas positivas permanentes em sua estrutura química (Figura 6). Para tanto foi criado o T3 (Figura 6), pró-fármaco do G25, estável no estômago e fluido intestinal, mas rapidamente clivado no plasma humano, característica que conduziu ao desenvolvimento do também pró-fármaco TE3. Este mostrou-se estável no trato gastrointestinal e capaz de curar a malária em macacos.

Figura 6 – Estruturas químicas da colina, G25 e T3.

A exploração de fármacos já avaliados para outras doenças como possíveis novos antimaláricos, também é alternativa que vem sendo enfatizada. Este procedimento minimiza o risco de elevada toxicidade e ainda diminui o custo de produção comuns à obtenção de novas entidades químicas. A observação da ocorrência da proteína farnesiltransferase no *P. falciparum* e o fato de inibidores desta terem se mostrados mais tóxicos para o parasito do que para as células humanas, associado ao emprego de inibidores desta enzima como agentes antineoplásicos há 15 anos, conduziram à descoberta de novos inibidores pertencentes à classe das tetraidroquinolinas pela indústria Bristol Myes Squibb, como por exemplo o composto PB-93. Atualmente sabe-se que esta classe de inibidores curam roedores infectados, no entanto estudos adicionais são necessários para reduzir a instabilidade metabólica característica destes derivados.

PB-93

Parasitas tais com o *P. falciparum* são incapazes de sintetizar purinas adquirindo-as do seu hospedeiro. Assim, análogos de purinas poderiam ser utilizados como agentes antimaláricos, com mecanismo de ação similar as sulfas e pirimetamina. Compostos dessa classe apresentaram baixa toxicidade e atividade promissora quando testados *in vitro*, reduzindo a parasitemia *in vivo*. No entanto, estudos complementares se fazem necessários (Too *et al.*, 2007).

Análogo de purina 2-amino-*N*6-amino *N*6-metiladenosina

Com a finalidade de se descobrir novos antimaláricos potencialmente ativos foi criada a *Medicines for Malaria Venture* (MMV), instituição sem fins lucrativos formada por parcerias públicas e privadas. Vários projetos encontram-se em desenvolvimento, com compostos em fase pré-clínica ou clínica, dentre os quais alguns podem ser citados (Biagini *et al.*, 2005; MMV, 2007):

(1) Lapdap^R, uma combinação dos compostos clorproguanil e dapsona, lançado em 2003 como antimalárico efetivo e barato. Estes fármacos agem por inibição das enzimas envolvidas na síntese do ácido fólico, a diidrofolato redutase e a diidropteroato sintase, respectivamente. Em 2001, a OMS recomendou a administração conjunta do artesunato, originando o CDA;

(2) OZ-277, derivado sintético da artemisinina de menor custo e de mais fácil obtenção. Sua estrutura mantém a ponte endoperóxido, responsável pela atividade biológica, protegida por anel de adamantina à reações metabólicas de clivagem;

(3) DB-289, pró-fármaco da DB75, uma diamina aromática desenvolvida originalmente da pentamidina, agente antiprotozoário, com espectro de ação contra vários protozoários tais como *Plasmodium* e *Trypanosoma*, e

(4) isoquinas, derivados da mefloquina, desenvolvidos na tentativa de diminuir a hepatotoxicidade e agranulocitose causadas pela quinonamina, espécie formada por oxidação pelo citocromo P450 sobre a parte *p*-hidroxianilina, altamente reativa, da estrutura do fármaco. As isoquinas podem ser sintetizadas facilmente por precursores de baixo custo comercial e têm mostrado bons níveis de tolerância e eficácia.

Dentre os compostos em estudo pela MMV, merece destaque o **AQ-13** ou *N*1-(7-cloro-quinolina-4-il)-3-(*N*3,*N*3-dietilamino)propilamina, derivado aminoquino-línico homólogo à **CQ** porém, de cadeia lateral simplificada por remoção do grupo metil-metínico, removendo a propriedade estereoquímica presente na **CQ**. (Biagini *et al.*, 2005).

A diminuição da cadeia lateral do **AQ-13** foi planejada na tentativa de evitar o mecanismo de resistência do parasito como, por exemplo, o mecanismo de efluxo da proteína transportadora PfCRT (Biagini *et al.*, 2005). O **AQ-13** mostrou atividade tanto em cepas de *P. falciparum* sensível quanto resistente à **CQ** e, acredita-se, atuar de forma semelhante a seu protótipo, interferindo no metabolismo da hematina. Perfil farmacocinético similar ao da **CQ**, permitiu o encaminhamento deste novo derivado quinolínico a estudo clínico de fase I (Ramanathan-Girish, 2004; Mzayek *et al.*, 2007).

Verificou-se também, que os efeitos adversos encontrados para o **AQ-13**, como cefaléia, tontura ou sintomas gastrointestinais, são similares aos da **CQ** (Mzayek *et al.*, 2007).

Ressalta-se que os compostos quinolínicos continuam entre aqueles mais estudados (Olliaro *et al.*, 2003; Wiesner *et al.*, 2003; Biagini *et al.*, 2005). Atribui-se o interesse e a persistência na descoberta de novos agentes antimaláricos da classe das quinolinas ao fato de, como mostram os resultados experimentais, o mecanismo de resistência do parasito não estar envolvido com o mecanismo de ação destes fármacos (Egan, 2001).

Recentemente, Burgess e colaboradores (2006) apresentaram o composto denominado de **RCQ** (*Reversed Chloroquine*). Este foi formado a partir da junção da **CQ** ao agente modulador de resistência imipramina, sendo considerado uma molécula híbrida ou *multiple ligand* com a finalidade de se obter uma única molécula, capaz de acumular no vacúolo digestivo do parasito para ligar-se a hematina ou hemozoína e ainda interferir na ação da proteína PfCRT. Outra vantagem, seria a menor dose exigida quando comparado às doses da **CQ** e imipramina, dadas separadamente. O **RCQ** mostrou-se ativo em cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ** e, mais ativo do que esta em cepas sensíveis. Apesar da alta lipofilicidade, o **RCQ** apresentou boa biodisponibilidade oral em ratos.

2.4. AGENTES MODULADORES DA RESISTÊNCIA

Concomitante à pesquisa por novos antimaláricos, a restauração do efeito terapêutico de fármacos já disponíveis vem sendo enfatizada (Pradine *et al.*, 2005; van Schalkwyk & Egan, 2006). Com este propósito, agentes moduladores da resistência (**AMR**) têm sido associados, em especial, à cloroquina (Ward & Bray, 2001; Henry *et al.*, 2006).

O verapamil foi o primeiro **AMR** *in vitro* do *P. falciparum* à **CQ** (Martin *et al.*, 1987). Este fármaco cardiovascular foi inicialmente verificado restaurar a eficácia terapêutica de antineoplásicos em células cancerígenas humanas, que se mostravam resistentes a fármacos antineoplásicos de natureza química, funcional e metabolicamente não relacionados (Tsuruo *et al.*, 1981; Rogan *et al.*, 1984).

Este novo conceito de mecanismo de resistência foi denominado multi-fármaco resistente, do inglês *Multi-Drug Resistance*, ou ainda, MDR. Desta forma, um **AMR** é aquele usado em associação ao fármaco no qual se observa resistência, com o objetivo de restaurar a eficácia terapêutica deste último (Ford & Hait, 1990).

AMR advém, em geral, de diversas classes terapêuticas, embora agentes específicos tenham sido planejados e sintetizados, como por exemplo a série de derivados acridonas *N*-10 substituídas, as quais demonstraram habilidade de restaurar a ação terapêutica de diferentes fármacos quinolínicos (Kelly *et al.*, 2007).

Acridonas *N*-10-substituídas

Um **AMR** ideal deve ser potente e seletivo, sem interferir na ação terapêutica ou na farmacocinética do fármaco ao qual foi associado, não causando, ainda, efeitos adversos ou citotoxicidade (Ford & Hait, 1990). Outras denominações comuns a **AMR** são agentes reversores, quimiorversores e quimiossensibilizantes.

A modulação *in vitro* da resistência de cepas de *P. falciparum* à **CQ** pelo verapamil permitiu aventar a hipótese de mecanismo de resistência semelhante ao MDR no plasmódio (Martin *et al.*, 1987), de onde se descobriu posteriormente o gene mutante *pfmdr1*. Em estudos recentes, o efeito modulador do verapamil foi associado à presença do polimorfismo K76T no gene *pfcr1* (Lakshmanan *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006).

Na década de 1980, foi reportada a ação de fármacos fenotiazínicos e de outros compostos tricíclicos, como os derivados iminodibenzílicos como **AMR** úteis no tratamento de células neoplásicas multi-resistentes (Ford & Hait, 1990). Anos mais tarde, o efeito modulador da resistência de compostos tricíclicos como imipramina (**IMP**) e desipramina (**DSP**), com destaque a este último, foi verificado em cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Bitonti *et al.*, 1988; Henry *et al.*, 2006). Fármacos fenotiazínicos como trifluoperazina (**TFP**), clorpromazina (**CPZ**) e levomepromazina

(**LVM**) também demonstraram efeitos *in vitro* e *in vivo* de reversão da resistência à **CQ** (Pradines *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006; van Schalkwyk & Egan, 2006).

O interesse corrente por compostos tricíclicos como **AMR** permanece tanto para neoplasias (Amaral *et al.*, 2007a) e infecções multi-resistentes de naturezas bacteriana (Zavascki *et al.*, 2007) e antifúngica (Slisz *et al.*, 2007) como para a malária resistente (Egan & Kaschula *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2007). Em estudo comparativo realizado por Guan e colaboradores (2002) entre derivados iminodibenzílicos e fenotiazínicos, estes últimos mostraram-se mais promissores em malária *falciparum* multi-resistente.

2.4.1. Emprego de **AMR** em Cepas Brasileiras de *P. falciparum* resistentes à **CQ**

Com o propósito de avaliar a sensibilidade de isolados brasileiros de *P. falciparum* à modulação da resistência à **CQ**, Menezes (1997) ensaiou 19 compostos reportados na literatura como **AMR** em malária e/ou neoplasias resistentes. A série foi constituída por fármacos cardiovasculares, psicofármacos, antibióticos e anestésico local.

Para o ensaio *in vitro* destes compostos foi utilizado o microteste de sensibilidade descrito por Rieckmann (1978). Este foi realizado com isolados frescos de *P. falciparum* resistentes à **CQ**. As concentrações dos compostos em estudo foram escolhidas considerando suas concentrações plasmáticas nas respectivas terapias e, para a **CQ**, adotou-se a concentração eficaz em cepas sensíveis, ou seja, 30 µg/L. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente.

Na análise estatística descritiva, gráficos da proporção da parasitemia em função do logaritmo natural da concentração foram construídos com a finalidade de avaliar o comportamento da parasitemia em função do aumento da concentração. Para a análise estatística inferencial, foi realizado o ajuste das curvas de proporção da parasitemia em função do logaritmo natural da concentração para os compostos puros e quando associados à **CQ**. Neste tipo de análise, foram considerados os modelos logísticos, linear e quadrático, empregando-se os modelos de curvas coincidentes, paralelas e concorrentes (Menezes, 1997).

Na avaliação dos resultados obtidos verificou-se decréscimo na taxa de parasitemia em decorrência do aumento da concentração para todas as associações de **AMR** à **CQ**, bem como para os **AMR** puros, indicando que todos os compostos mostraram efeito antimalárico inesperado, como pode ser verificado à Tabela 1. Apenas o nitrendipino apresentou efeito reversor, validado por análise estatística inferencial.

Tabela 1 - Classificação dos compostos segundo o modelo estatístico ajustado e valores de IC₅₀ estudados por Menezes (1997).

Composto ^(a)	Modelo Logístico	Curvas Ajustadas	ln IC ₅₀ [intervalo de confiança]
Nitrendipino-N	Linear	coincidentes	3,07 [2,77; 3,76]
Nifedipino			4,39 [4,05; 4,72]
Haloperidol			2,61 [2,30; 2,92]
R-Verapamil			4,49 [4,22; 4,77]
Imipramina			4,43 [4,14; 4,72]
Desipramina			3,79 [3,46; 4,12]
R,S-Verapamil	Quadrático	Coincidentes	4,87 [0,22; 9,52]
S-Verapamil			4,80 [1,03; 8,57]
Trifluoperazina			0,19 [-0,062; 0,44]
Nitrendipino	Linear	Paralelas	3,09 [1,51; 7,68]
Nitrendipino*			2,05 [-2,55; 6,64]
Eritromicina			4,30 [-0,30; 8,91]
Eritromicina*			3,60 [-1,01; 8,20]
Propranolol			4,36 [-0,69; 9,41]
Propranolol*			3,64 [-1,41; 8,70]
Nifedipino-N	Quadrático	Paralelas	4,29 [0,55; 8,04]
Nifedipino-N*			4,55 [-0,26; 9,36]
Diltiazem	Linear	Concorrentes	3,41 [3,00; 3,81]
Diltiazem*			4,08 [3,52; 4,63]
Flufenazina	Linear	Concorrentes	-1,94 [-3,03; -0,85]
Flufenazina*			-0,10 [-0,52; 0,32]
Levomepromazina			2,14 [1,19; 3,08]
Levomepromazina*			3,71 [3,25; 4,17]
Clorpromazina	Quadrático	Concorrentes	2,96 [1,33; 4,59]
Clorpromazina*			3,75 [0,68; 6,81]

* Associação da cloroquina ao composto; (a) Os fármacos quinidina e procaina foram excluídos da análise inferencial; IC₅₀: Concentração que inibe em 50% o crescimento do parasito.

Nesta tabela, pode-se ver que o valor de IC₅₀ (concentração responsável por inibir em 50% o crescimento do parasito). Encontra-se na forma de logaritmo natural) e o resultado da análise estatística inferencial que apontaram o modelo de linhas coincidentes como o mais ajustado para a maioria dos **AMR** e suas respectivas associações à **CQ**. Exemplos são a imipramina (**IMP**), desipramina (**DSP**) e trifluoperazina (**TFP**). De acordo com este modelo, o efeito antiplasmodico de cada **AMR** se sobreporia ao da **CQ**, uma vez que ambas as curvas se mostram próximas.

Modelo de linhas separadas concorrentes foi o mais ajustado para outros fármacos fenotiazínicos como **CPZ**, **LVM** e **FFN**, conforme pode ser visto à Tabela 1 e ilustrado na Figura 7. Tal modelo sugere que a associação destes compostos à **CQ** causou aumento da parasitemia (Menezes *et al.*, 2002a). Efeito modulador foi observado somente para a eritromicina (Menezes *et al.*, 1999) e nitrendipino (Menezes *et al.*, 2003).

Figura 7 - Taxa de parasitemia em função da concentração para a flufenazina (A) e clorpromazina (B) isoladas (▲) e quando associadas à CQ (■) (Menezes *et al.*, 2002a).

A observação do efeito antiplasmódico intrínseco foi inesperada, uma vez que as concentrações ensaiadas eram inferiores às aquelas reportadas para promover efeito inibitório, como por exemplo, para o verapamil (Martin *et al.*, 1987; Scheibel *et al.*, 1987; Tanabe *et al.*, 1989), imipramina (Kanno & Sasaki, 1982; Reynolds & Claxton, 1982; Honegger *et al.*, 1983), clorpromazina e outros fenotiazínicos (Panijpan & Kantakanit, 1983; Tanabe *et al.*, 1989; 1990; Domínguez *et al.*, 1997).

Entretanto, a ação antiparasitária observada poderia estar relacionada a outras comuns à **CQ**, como por exemplo, a interferência do metabolismo da hematina, como verificado para a clorpromazina (Panijpan & Kantakanit, 1983) e, mais recentemente, para novos derivados fenotiazínicos (Kalkanidis *et al.*, 2002); ação lisossomotrópica (Honegger *et al.*, 1983); interação com fosfolípidos (Kanno & Sasaki, 1982); inibição da calmodulina (Reynolds & Claxton, 1982; Scheibel *et al.*, 1987; Tanabe *et al.*, 1989); estabilização da membrana (Kristiansen & Jepsen, 1985); distúrbio na função da mitocôndria (Geary *et al.*, 1986) e inibição da glutatona redutase (Lound *et al.*, 1998;

Ginsburg & Krugliak, 1999). Estes efeitos são reconhecidos para a maioria dos **AMR** ensaiados, como verapamil, trifluoperazina e desipramina.

2.4.2. Relação Estrutura-Atividade

Em respeito aos resultados observados por Menezes (1997), merece atenção o fato de a **CQ** e a maioria dos **AMR** ensaiados apresentarem semelhanças estruturais (Menezes & Ferreira, 2005): sistema aromático ou heteroaromático (natureza hidrofóbica), ligado a átomo de nitrogênio (amina terciária ou secundária, dotado de natureza eletrônica aceptora de ligação de hidrogênio) através de cadeia lateral contendo três a quatro átomos de carbono são apontadas como requisitos tanto para a atividade antimalárica de compostos quinolínicos (van Schalkwyk & Egan, 2006), como para a ação de fármacos tricíclicos (Pradines *et al.*, 2005) bem como para a maioria dos **AMR** já conhecidos (Bhattacharjee *et al.*, 2002; van Schalkwyk & Egan, 2006) como também nos recentemente reportados (van Schalkwyk & Egan, 2006; Kelly *et al.*, 2007).

Estas similaridades estruturais estão expressas no modelo farmacofórico proposto por Bhattacharjee e colaboradores (2002) e recentemente reafirmado por van Shalkwyk e Egan (2006) (Figura 8) para **AMR** à **CQ** assim como no modelo farmacofórico sugerido por Langer e colaboradores (2004) para diferentes classes de **AMR** a antineoplásicos. Estas semelhanças poderiam elucidar a ocorrência da atividade intrínseca dos **AMR** observados nos isolados brasileiros, o que justificaria os resultados da análise estatística e explicaria a provável competição destes compostos e a **CQ** por provável mesmo sítio de ação (Menezes & Ferreira, 2005).

Figura 8 - Farmacóforo para **AMR** à **CQ** proposto por van Shalkwik & Egan, (2006).

Associa-se a estas observações a análise dos resultados de atividade antiplasmódica e do efeito modulador de resistência de derivados do núcleo fenotiazínico (Tabela 2, Guan *et al.*, 2002) e iminodibenzílico (Tabela 3, Bhattacharjee *et al.*, 2001; 2002) planejados como **AMR** à **CQ** (Guan *et al.*, 2002; Osa *et al.*, 2003; Bhattacharjee *et al.*, 2001; 2002).

Nota-se que os valores equivalentes à atividade antimalárica dos compostos, representado pela porcentagem de supressão de isolados de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Tabela 2) e pelo valor de IC₅₀ (Tabela 3), cresce paralelamente aos valores de atividade moduladora da resistência, representado pelos valores do índice de modificação da resposta RMI (do inglês *Response Modification Index*).

Bhattacharjee e colaboradores (2001; 2002) verificaram que a introdução de grupos volumosos na cadeia lateral dos derivados iminodibenzílicos mostrou-se prejudicial ao efeito modulador da resistência como pode ser visto pelo aumento do índice de RMI apresentado à Tabela 3. De forma análoga, no estudo de Guan e colaboradores (2002), verificou-se que, independente do núcleo tricíclico, tanto a atividade antimalárica como reversora diminuíram quando o comprimento da cadeia lateral entre os átomos de nitrogênio aumentou de quatro para seis átomos de carbono (dado não mostrado à Tabela 3) bem como quando o tamanho dos substituintes da

amina terminal aumentou de dimetil (**FNT1** e **IMN1**) e dietil para metilbenzil (dado não mostrado) e dibenzil (**FNT2** e **IMN2**), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Atividades antiplasmódica e moduladora da resistência *in vitro* de compostos fenotiazínicos (FNT) e iminodibenzílicos (IMN) em linhagem de células resistentes de *P. falciparum* TM 91C235.

Composto	X	R ₁ , R ₂	Controle (% sup.) ^a	Composto + CQ (% sup.) ^b
FNT 1	S	CH ₃ , CH ₃	17	30
FNT 2	S	C ₆ H ₅ CH ₂ , C ₆ H ₅ CH ₂	7	12
FNT 3	S	Pirrolidinil	38	99
IMN 1	CH ₂ CH ₂	CH ₃ , CH ₃	59	99
IMN 2	CH ₂ CH ₂	C ₆ H ₅ CH ₂ , C ₆ H ₅ CH ₂	11	06
IMN 3	CH ₂ CH ₂	Pirrolidinil	58	99

^a Porcentagem de supressão de células em crescimento para o composto isolado (50 ng/mL); ^b Porcentagem de supressão de células em crescimento para a associação do **AMR** (50 ng/mL) e **CQ** (10 ng/mL – nenhum efeito na inibição do crescimento de células), adaptado de Guan *et al.*, 2002.

Tabela 3 – Atividades antiplasmódica e moduladora da resistência *in vitro* de compostos iminodibenzílicos (IMN) em clones W2 de *P. falciparum*.

Composto	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ ^a (ng/mL)	RMI ^b
IMP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	N(CH ₃) ₂	H	2,3	0,05
DSP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	HNCH ₃	H	2,4	0,05
CLP	CH ₂ CH ₂ CH ₂	N(CH ₃) ₂	Cl	4,6	0,09
IMN 4	CH ₂ CH ₂ CH ₂	2-metil-piperazina	H	43,1	0,89
IMN 5 ^c	CH ₂ CH ₂ CH ₂	3-metil piperazina	H	5,2	0,11
IMN 6	COCH ₂	H	H	49,7	1,02

^a Equivalente à **CQ** + 500ng/mL do composto; ^b RMI = IC₅₀(**CQ** + Composto)/IC₅₀ **CQ**, adaptado de Bhattacharjee *et al.*, 2002 e ^c Bhattacharjee *et al.*, 2001.

Considera-se ainda importante informar que:

- (1) as similaridades estruturais das diferentes classes de **AMR**, apontadas por Menezes & Ferreira (2005), e a **CQ** poderiam explicar tanto a atividade moduladora da resistência de antimaláricos quinolínicos como a **CQ** (Fan *et al.*, 2006; Briceno *et al.*, 2007) e **MPC** (Reyes *et al.*, 2001) em células neoplásicas multi-resistentes, como a atividade reversora da primaquina em cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Bray *et al.*, 2005b);
- (2) sabe-se que a resistência à **CQ** pode ser classificada como total ou parcial ao verapamil, variando de acordo com seqüências específicas dos alelos do gene que codifica a proteína PfCRT. É conhecido ainda que a ação reversora do verapamil é mais pronunciada em clones que expressam mutação na proteína PfCRT ou em cepas do “Velho mundo” que possuem o haplotipo PfCRT CVIET do que em cepas do “Novo mundo” com haplotipo SVMNT (Pradines *et al.*, 2005). Assim, cepas de *P. falciparum* da América do Sul resistentes à **CQ** são menos suscetíveis à ação do verapamil como **AMR**, conforme verificado inicialmente por Melhota e colaboradores (2001) e confirmado em outras avaliações (Guan *et al.*, 2002). Recentemente, foi realizado estudo para investigar as bases moleculares da resistência do *P. falciparum* à **CQ** em

isolados da região amazônica brasileira. Identificaram-se mutações nos genes *pfmdr1* (codons TYR184, PHE, ASN1042ASP e ASP1246TYR), *cg2* (regiões *kappa* e *gamma*) e *pfprt* (K76T) apontando-os como marcadores genéticos importantes para a resistência *in vitro* do *P. falciparum* à CQ (Viana *et al.*, 2006);

(3) em oposição ao observado na terapia de neoplasias multi-resistentes (Raderer & Scheithauer, 1993), a clorfeniramina (**CFN**), conhecido antagonista de receptor histamínico H₁, apresenta atividade reversora da **CQ** *in vivo* em cepas de *P. berghei* e *P. yoelli* e em macacos *Aotus sp.* infectados por parasitas resistentes à **CQ** (Bhattacharjee *et al.*, 2002; Narkonchai & Konthiang, 2006). Este composto é o único **AMR** empregado na terapêutica em associação à **CQ** com bons resultados (Sowunmi *et al.*, 2006). No entanto, é importante considerar o polimorfismo entre genes, ou seja, mudanças na sequência de aminoácidos que ocorre em protozoários de diferentes áreas geográficas do mundo como, por exemplo, a mutação K76T, anteriormente referida. Nesta, o aminoácido lisina é substituído por uma treonina, presente no códon 76 de parasitos resistentes à **CQ** (Henry *et al.*, 2006). Estas diferenças poderiam explicar as susceptibilidades distintas, como a anteriormente citada para o verapamil, entre as espécies de *Plasmodium*, em diferentes regiões do mundo (Pradines *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006);

Clorfeniramina (**CFN**)

(4) estudos recentes comprovam novos candidatos à **AMR** como de fraco efeito esquizotíca (Bray *et al.*, 2005a, Henry *et al.*, 2006) em concordância aos resultados observados por Menezes (1997).

2.4.3. **AMR** para Malária em Estudo

Como mencionado, diversas classes de compostos com características estruturais semelhantes são capazes de reverter à resistência *in vitro* do *P. falciparum* à **CQ**. Diferente dos **AMR** clássicos reportados na literatura, compostos utilizados como tensoativos sintéticos vêm sendo estudados, como o nonilfenoxilatos (**NPE**) e o **NP30**, usados para aperfeiçoar a absorção de fármacos de uso oral, quando associados à **CQ**. Estes agem sinergicamente, apesar de existirem ainda sub-grupos de isolados de *P.falciparum* resistentes à **CQ** que são insensíveis ao **NP30**, o que poderia ser explicado pelo polimorfismo nos genes *pfcr*t e *pfmdr*1 (Pradines *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006).

Outra classe de compostos estudados como **AMR** são os derivados 9,10-diidroantracênicos. Estudos demonstraram que estes aumentam o acúmulo de **CQ** em parasitos resistentes e que quando comparado à prometazina, este efeito é de cinco a oito vezes maior. Um destes compostos, o **BG958**, é capaz de reverter a resistência de isolados de *P. falciparum* resistentes à **CQ** de diferentes países, provavelmente devido a presença de seu átomo de nitrogênio protonável em pH fisiológico que poderia formar interação iônica com a PfCRT (Pradines *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006).

BG958

Sabe-se ainda que mutações nos codons 75 e 76 consistem com modelos de interação entre um ligante e aminoácidos e que cinco mutações na PfCRT são resultantes de mudanças nos aminoácidos K76T, M74I, N75E, A220S e R371Y e identificados como reversores da resistência em regiões da Ásia, África e Brasil, este último com haplotipo PfCRT CVIET. Além disso, quando o BG958 é combinado à **CQ**, a atividade desta última aumenta nos parasitos contendo mutação em N86Y da proteína PfMDR1 o que sugere a capacidade desta antracenona em interagir com as duas proteínas mutantes PfCRT e PfMDR1, o que poderia explicar sua ação em diferentes regiões do mundo (Pradines *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006).

Derivados tricíclicos da xantona também têm mostrado atividade como **AMR**. Estudo realizado por Wu e colaboradores (2005) reportou maior atividade dos compostos que tiveram um átomo de hidrogênio introduzido na cadeia lateral. Isso deve-se à formação de derivados mais básicos, como maior habilidade de acúmulo no vacúolo digestivo do parasito. Dentre os compostos deste estudo, o derivado PW3 destacou-se por apresentar maior efeito sinérgico quando administrado junto à **CQ**, apresentando valor de RMI igual a 0,36. Isso proporcionou acúmulo quatro vezes maior deste antimalárico em cepas de *P. falciparum* resistentes. Em adição, o PW3 apresentou atividade antimalárica intrínseca (Wu *et al.*, 2005).

Outros compostos tais como antibióticos (Sidhu *et al.*, 2007), antifúngicos (Lokesh *et al.*, 2007), derivados pirrolidínicos (Henry *et al.*, 2006) e precursores hormonais (Safeukui *et al.*, 2004) têm-se mostrado efetivos como AMR em sobrepor a resistência à CQ *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* e *in vivo* contra cepas de *P. berghei* e *P. yoelli*.

2.5. COMPOSTOS TRICÍCLICOS COMO AGENTES ANTIPARASITÁRIOS

A ação antiparasitária de compostos tricíclicos é conhecida desde 1891, quando Guttman e Ehrlich descreveram a atividade antimalárica do cloreto de metiltionínio (Wainwright & Amaral, 2005). Este derivado era conhecido por corar, propriedade que deriva o nome azul de metileno, e promover neuralgia. O emprego terapêutico como potente agente antimalárico foi, entretanto, restrito pelo exército norte-americano em decorrência do baixo índice terapêutico e por induzir resistência cruzada em camundongos (Atama *et al.*, 1996; Vennestrom *et al.*, 1995).

Contudo, o efeito antiplasmódico do cloreto de metiltionínio foi de primordial contribuição ao desenvolvimento dos antimaláricos sintéticos, através da junção da cadeia lateral deste derivado tiazínico ao núcleo quinolínico da quinina, dando origem à pamaquina (1923) e, posteriormente, à **CQ** (1934) (Olliaro & Taillor, 2003; Schlitzer *et al.*, 2007). A substituição do anel tiazínico pelo núcleo quinolínico pode ser classificada como bioisosterismo, processo empregado com sucesso no planejamento e obtenção de novos compostos bioativos. Neste, átomos ou grupos substituintes com mesmas características físicas e químicas são substituídos produzindo ou não efeitos biológicos similares (Wermuth, 2004).

Em 1930, foi descoberta a prometazina, derivado contendo o sistema tricíclico fenotiazínico, com atividade anti-histamínica, e a partir desta outros derivados com ação neuroléptica se destacaram como a trifluoperazina, clorpromazina, levomepromazina, e flufenazina (Korolkovas, 1988; Booth *et al.*, 2002).

Entretanto, embora o maior interesse da indústria farmacêutica tenha se direcionado a favor do efeito neuroléptico dos fenotiazínicos, a ação inibitória destes compostos sobre parasitos, associada à emergente necessidade de fármacos ativos contra cepas resistentes prosseguiu.

Novos derivados fenotiazínicos têm sido reportados como candidatos promissores, por exemplo, para tratamento da doença de Chagas (Bustamante *et al.*, 2007), leishmaníose (Volpini *et al.*, 2006), tuberculose (Amaral *et al.*, 2007b) e outras infecções (Amaral *et al.*, 2007a). Diversos também são os derivados fenotiazínicos ativos contra a malária (Vennestrom *et al.*, 1995; Atamma *et al.*, 1996; Domínguez *et al.*,

1997; Amaral *et al.*, 2001; Kalkanidis *et al.*, 2002; Wainwright & Amaral, 2005; Ademowo *et al.*, 2007).

Dentre os fenotizínicos descobertos recentemente com ação antiplasmodica merecem destaque a tioridazina (**TRD**) (Amaral *et al.*, 2001) e o derivado tribásico da clorpromazina (**T-CPZ**) (Kalkanidis *et al.*, 2002). Problemas de toxicidade impediram o uso terapêutico da **TRD**, porém esta permanece como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antimicrobianas (Thanacoody *et al.*, 2007). Testes *in vitro* de inibição da hemozoína evidenciaram atividade da **T-CPZ**, derivado da **CPZ** de cadeia lateral duplicada, contendo três átomos de nitrogênio, similar à da **CQ** enquanto resultados espectroscópicos indicaram a possibilidade desta interação ocorrer de modo mais intenso do que observado para o protótipo **CPZ**. Em adição, quando utilizado como **AMR**, objetivo original do estudo, a **T-CPZ** promoveu menor sinergismo do que a **CPZ**, quando associada à **CQ** (Kalkanidis *et al.*, 2002).

Tioridazina (**TRD**)

Derivado tribásico da CPZ (**T-CPZ**)

A continuidade da busca por compostos fenotiazínicos de ação antiparasitária foi recentemente reforçada pelo fato de a toxicidade relativa do cloreto de metiltionínio ter sido reavaliada. As concentrações utilizadas *in vitro* contra os organismos causadores de parasitoses como a malária são clinicamente irrelevantes e aceitáveis, associado ao fato de ser a quimioterapia de curta duração quando comparada à terapia usada em

neuroses graves, que é por toda a vida (Amaral *et al.*, 2001; Wainwright & Amaral, 2005).

Por estes resultados positivos, o cloreto de metiltionínio permanece na atualidade como composto possivelmente útil como protótipo na pesquisa por novos fármacos antimaláricos ou adjuvantes (Meissner *et al.*, 2006). Nesta perspectiva, estudo recente demonstrou a capacidade deste composto, em inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à **CQ**. Ação sinérgica a outros antimaláricos como **CQ**, mefloquina, primaquina e quinina foi também observada, sugerindo o emprego do cloreto de metionínio como terapia antimalárica de baixo custo (Garavito *et al.*, 2007).

2.6. MODELAGEM MOLECULAR

A Modelagem Molecular (MM) apresenta-se nos dias atuais como uma das ferramentas mais amplamente utilizadas no processo de desenvolvimento de novos fármacos (Singh *et al.*, 2006; Ekins *et al.*, 2007). É definida pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, através do uso da química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (Sant'Anna, 2002). Desta forma, a MM, que é metodologia classificada como de planejamento racional, torna possível a construção de modelos químicos e/ou biológicos, os quais, submetidos a programas computacionais específicos, permitem visualizar, simular e interpretar sistemas inter-relacionados, como os envolvidos na interação fármaco-receptor/sítio ativo (Henckel & Billings, 1995).

Na década de 1980, o desenvolvimento e barateamento de novos programas e computadores (Loewe, 2002), associados aos avanços do conhecimento bioquímico sobre as bases moleculares das doenças (Ekins *et al.*, 2007) permitiram à MM avanço significativo, que proporcionou grande contribuição na descoberta de novos fármacos. Desta forma, o planejamento racional auxiliado por MM tem se mostrado como abordagem de amplo emprego na descoberta de novos compostos, promovendo rápidos avanços em pesquisas e despertando o interesse tanto no meio acadêmico

como em indústrias farmacêuticas (Henkel & Billings, 1995; Gund *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2006).

Atualmente, o processo de planejamento racional para obtenção de novos fármacos tem-se mostrado como dos mais promissores, uma vez que considera aspectos morfológicos ou bioquímicos do sistema biológico ou doença em questão (Barreiro *et al.*, 1997), conduzindo assim à descoberta de novo e, pressupostamente, melhor fármaco a custo e em tempo menores do que o observado correntemente, cerca de 802 milhões de dólares (Giaccotto *et al.*, 2005). Em adição, técnicas de MM estão sendo empregadas no planejamento de bioligantes em etapas finais de procedimentos da pesquisa genômica, em busca do que poderá vir a ser a terapia do terceiro milênio (Dahl & Sylte, 2005).

A aplicação da MM em Química Farmacêutica ou Química Medicinal pode ser realizada de forma indireta ou direta. A abordagem indireta se dá quando a estrutura do alvo biológico não está disponível e é realizada através da tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos com o objetivo de elucidar a relação estrutura química-atividade biológica. A abordagem direta é realizada quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico (receptor ou enzima). O alvo isolado é caracterizado, por exemplo, por cristalografia de raios-X possibilitando a visualização tridimensional de sua estrutura e, a partir desta, a construção de modelos estruturais específicos, denominados ligantes (Henkel & Billings, 1995; Ekins *et al.*, 2007).

2.6.1. Emprego das Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas

O cálculo das propriedades estruturais de uma série de compostos permite avaliar, de forma quantitativa e qualitativa, os aspectos estéricos, eletrônicos e lipofílicos, fornecendo subsídios para prever determinado tipo de interação com o receptor, conhecido ou não (Höltje & Folkers, 1996; Leach, 1996; Heher *et al.*, 1998). Assim, propriedades físico-químicas como calor de entalpia, energias dos orbitais moleculares de HOMO e LUMO, momento de dipolo molecular, volume molecular e lipofilicidade, entre outras, são frequentemente empregadas com tal finalidade, como recentemente reportado por Camargo e colaboradores (2007), Kurihara e colaboradores (2007) e Musa e Eriksson (2007).

A variação de entalpia fornece informação a respeito da estabilidade do composto, sendo também útil quando se deseja calcular modificações químicas, como por exemplo, a protonação de átomo de nitrogênio em compostos de natureza amínica, como são muitos fármacos. No caso dos compostos antimaláricos, sabe-se que quanto menor for a diferença energética de entalpia entre as espécies protonada e a de forma neutra, mais facilmente o nitrogênio da cadeia lateral sofrerá oxidação, o que poderá ser útil ao mecanismo de ação deste como agente antimalárico (Bhattacharjee *et al.*, 2002).

Considerando, por exemplo, o modelo farmacofórico proposto por Bhattacharjee e colaboradores (2002), apresentado na figura 8, a **CQ**, antimalárico escolhido como referência neste estudo, encontra-se diprotonada quando no interior do vacúolo digestivo. A diprotonação da **CQ** pode influenciar não apenas a interação desta última com a hematina, mas também pode representar fator importante no gradiente de concentração e permanência desta última no interior do vacúolo digestivo do parasito (O'Neill *et al.*, 1998; Silva, 2002).

De acordo com a IUPAC (Sant'Anna, 2002), a energia do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) se relaciona com o potencial de ionização de uma molécula ou com sua reatividade como nucleófilo. A energia do orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) representa a afinidade eletrônica de uma molécula ou a sua reatividade como eletrófilo. A análise das diferenças entre as energias moleculares orbitais e as respectivas distribuições gráficas podem auxiliar na alaviação da importância das interações de transferência de cargas entre dois reagentes para a ocorrência de um processo químico, o qual na química medicinal é representado pelo ligante e o seu local de interação ou, receptor, para a ocorrência da atividade biológica (Bhattacharjee *et al.*, 2002).

Exemplo recente da contribuição destes parâmetros ao desenvolvimento de novos fármacos é observado em estudo de compostos antiinflamatórios não esteroidais de diferentes classes químicas: ácido fenilacético (diclofenaco de sódio), ácido salicílico (valeril salicilato), fenoximetanossulfanilida (nimesulida), ácido propiônico (ibuprofeno e naproxeno) e ácido indolacético (indometacina). Neste estudo, a atividade biológica

destes compostos foi relacionada à medida das energias de orbitais moleculares das suas espécies radicalares, bem como às respectivas variações da energia entre HOMO e LUMO, conhecida como *gap*: (Pérez *et al.*, 2006).

Em outro estudo, foi realizada correlação entre as propriedades físico-químicas de diferentes classes de agentes antineoplásicos estabilizadores de microtúbulos (análogos do taxano e da epotilona, dentre outros) com a atividade inibitória destes em seis tipos diferentes de linhagens de células cancerígenas. Neste estudo, a energia molecular de LUMO e o número de átomos de nitrogênio na estrutura destes compostos apresentaram boa correlação com a atividade biológica em células neoplásicas de ovário. Assim, aqueles compostos que apresentavam menor valor de energia molecular de LUMO apresentavam maior atividade por poderem aceitar mais favoravelmente elétrons ao interagirem com tubulinas, estabilizando-as e impedindo a fase de polimerização (Mohanraj & Doble, 2006)

Outra propriedade físico-química comum de ser avaliada é o momento molecular de dipolo, propriedade vetorial, resultante da localização dos diferentes grupos que constituem a molécula e da estrutura tridimensional desta última. É importante na determinação da distribuição de cargas do composto (Volhardt & Schore, 2004).

A lipofilicidade ou hidrofobicidade diz respeito à afinidade de uma substância por ambiente lipofílico, o que pode ser quantificado por meio de sua partição entre um sistema aquoso e outro lipofílico (Sant'Anna, 2002; Höltje & Folkers, 1996). A medida desta propriedade pode ser obtida por métodos experimentais ou, mais recentemente e de modo mais prático e rápido, por cálculo teórico através do emprego de algoritmos específicos disponíveis em programas de MM. O método desenvolvido por Ghose, Pritchett & Crippen (1988) para cálculo da lipofilicidade é baseado na somatória de fragmentos e por isso depende dos átomos que compõe a molécula e dos tipos de ligação. Este método foi parametrizado para 110 átomos incluindo átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e halogênios. Para um conjunto teste de 494 compostos foi observado desvio padrão de 0.347 e coeficiente de correlação igual a 0.962. Este e outros métodos de cálculos estão disponíveis em programas de modelagem molecular, e são usados em especial para o cálculo de espécies neutras.

A importância da lipoficidade à atividade antiplasmodica foi recentemente corroborada por Weisman e colaboradores (2006) na apresentação de uma série de éteres e ésteres de 4-dialquilaminobiciclo [2.2.2]octan-2-ol, ativos contra *T. brucei* e *P. falciparum*. Em respeito a candidatos à **AMR**, a lipoficidade foi apontada como propriedade determinante para a interação do agente modulador da resistência com a membrana da proteína PfCRT. O bloqueio desta proteína impediria o efluxo da **CQ**, restaurando o seu efeito terapêutico (Bray *et al.*, 2005a).

Superfície eletrônica de grande importância na determinação das características estereo-eletrônicas diz respeito ao potencial eletrostático. Esta propriedade física é definida pela IUPAC (Sant'Anna, 2002) como sendo igual em magnitude à energia eletrostática entre a distribuição de carga estática de um sistema atômico ou molecular e uma carga pontual unitária positiva. Os mapas de potencial eletrostático molecular (MEPs, do inglês *Molecular Electrostatic Potential*) são, assim, representações gráficas das propriedades eletrostáticas de uma molécula, baseadas na densidade de carga calculada diretamente da função de onda molecular (Sant'Anna, 2002; Höltje & Folkers, 1996). Considerando que MEPs refletem a distribuição eletrônica molecular, estes são freqüentemente utilizados para interpretar a interação entre o fármaco/ligante e o receptor.

Baseando-se neste conceito de complementariedade eletrostática e topológica para o processo de reconhecimento molecular entre ligante e receptor, correlação estatística entre MEP e descritores moleculares de Sterimol foi recentemente observada para derivados *N*-metil-*D*-aspartato, antagonistas de receptores ionotrópicos glutamato (iGluR). Estes receptores são acreditados ocorrer em doenças de ordem neurovegetativa tais como Alzheimer e Parkinson, bem como isquemias cerebrais e epilepsias. Os resultados obtidos foram considerados efetivos para a racionalização da informação e desenvolvimento de novos bancos de dados, o que diversifica o padrão estrutural de compostos com atividade biológica significativa (Bacilieri *et al.*, 2007).

Com relação ao uso de MEPs para obtenção de novos antimaláricos, destacam-se os estudos efetuados por Vippagunta e colaboradores (1999) e o de Cheruku e colaboradores (2003). No primeiro estudo, utilizando uma série de aminoquinolinas análogos à **CQ**, verificou-se a importância do átomo de cloro na posição 7 de

compostos 4-aminoquinolínicos a fim de proporcionar alinhamento favorável com a hematina, provavelmente por interações do tipo π - π fora do plano. No segundo trabalho verificou-se, de maneira complementar, a importância do nitrogênio quinolínico para o alinhamento π - π e atividade antiplasmódica da **CQ**, o qual cria uma redistribuição eletrônica no anel, favorecendo alinhamento energeticamente favorável.

Nos estudos de interação de fármacos antimaláricos como **CQ**, quinina e mefloquina, como também de novos candidatos, com a hematina, a avaliação da distribuição eletrônica ilustrada pelos MEPs tem auxiliado na compreensão e estabelecimento da relação estrutura-atividade, uma vez que se observou complementaridade entre o MEP dos diferentes compostos estudados e o dímero μ -oxo da hematina. Nestes, os compostos mais ativos apresentam uma região central positiva em seus anéis, o que poderia interagir com a região central negativa do dímero μ -oxo, evitando assim a disponibilidade do átomo de ferro em coordenar com o grupo carboxilato de outra hematina, impedindo assim a formação da hemozoína. (Portella *et al.*, 2003, 2004).

MEPs também foram utilizados por Portella e colaboradores (2003) com o propósito de determinar a possível complementaridade eletrostática entre antimaláricos usados na terapêutica, dentre eles a **CQ** e outros 4-aminoquinolínicos, quinina, mefloquina, halofantrina bem como xantonas hidroxiladas, inferindo possíveis posições de interação entre ligante e receptor, as quais foram confirmadas posteriormente por estudo de *docking*.

Em 2002, Bhattacharjee e colaboradores empregaram MEPs como ferramenta para mensurar a basicidade do átomo de nitrogênio presente no anel iminodibenzílico de compostos ensaiados como **AMR** na elucidação de farmacóforo comum (Figura 8). Foi observado que os análogos mais potentes apresentavam valores mais negativos (maior densidade eletrônica) na região deste átomo, dos quais se destacaram os análogos da imipramina contendo cadeia lateral curta.

2.6.1.1. Métodos de Cálculo

A escolha do método de cálculo de orbitais moleculares a ser empregado é efetuada, a princípio, em razão da complexidade estrutural do objeto em estudo, seja este uma enzima ou uma série de estruturas químicas de atividade biológica conhecida, bem como da precisão que se deseja, do programa computacional disponível, o tempo útil e a capacidade da máquina para execução do cálculo (Leach, 1996; Heher *et al.*, 1998).

Métodos de mecânica molecular fornecem geometrias adequadas à maioria das moléculas orgânicas e, também, a determinados sistemas organo-metálicos, como as hemoproteínas, estruturas comuns a fármacos e moléculas bioativas como os neurotransmissores, aminoácidos, proteínas e enzimas. Estes métodos utilizam uma combinação de campos de força empíricos, sendo úteis no cálculo de geometrias e energias conformacionais. Desta forma são, em geral, escolhidos para moléculas contendo elevado número de átomos, sendo empregados com frequência em estudos, por exemplo, de dinâmica molecular (Höltje & Folkers, 1996; Leach, 1996).

O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções de potencial e parametrização (ajuste do modelo escolhido de forma a reproduzir o mais fielmente o comportamento de um processo experimental) usado para cálculos de mecânica molecular. As funções de potencial são calculadas a partir da mecânica clássica e definidas segundo as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (com valores padrões de comprimentos e de ângulos de ligação) (Sant'Anna, 2002).

Dentre os métodos de mecânica molecular, o *Merck Molecular Force Field* (MMFF) é uma família de campos de força desenvolvido pela *Merck Research Laboratories* e obtidos a partir da reparametrização do campo de força MM3. O primeiro desta família foi o MMFF94 descrito por Thomas A. Halgren. Sua parametrização abrange geometrias moleculares e conformacionais para uma série de compostos oxissulfúricos, particularmente sulfamidas, e oxi-fosforados e um conjunto diversificado de pequenas moléculas e íons. Dados experimentais foram também empregados para aproximadamente 2.800 estruturas de qualidade adequadas extraídas do banco de

dados *Cambridge Structural Database* (CSD). Tanto os dados experimentais como computacionais serviram de referência para definir os comprimentos e ângulos de ligação. Além disso, comparações com dados experimentais mostraram boa reprodução do MMFF94 com comprimentos e ângulos de ligação obtidos por cristalografia de raios-X, com *Root Mean Square* (RMS) relativamente modesto, entre 0,02 Å e 2°, respectivamente (Halgren, 1998).

Métodos mecânico-quântico *ab initio* ou não-empíricos são métodos baseados no uso da equação de Schrödinger para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, são necessárias aproximações para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar o cálculo possível (Sant'Anna, 2002). Cálculos empregando métodos *ab initio* não são freqüentes em estudos de MM de novos agentes terapêuticos, em razão, especialmente, das restrições inerentes a estes métodos, em particular, o tempo de cálculo. Em geral, estes métodos são reservados para cálculos finais, em que se deseja melhor definição das propriedades analisadas (Höltje & Folkers, 1996).

A sofisticação do cálculo *ab initio* depende do número de conjunto de bases usado e, em geral, este tipo de cálculo é identificado por abreviações dos conjuntos de base que utilizam: STO-3G, 4-31-G, 6-31G, dentre outros (Gund, 1996). Dentre os métodos *ab initio*, o método Hartree-Fock é um dos mais empregados nos cálculos de estrutura eletrônica, apresentando boa concordância com resultados experimentais para a geometria molecular, energia de formação e momento de dipolo, dentre outras propriedades eletrônicas (Helgaker *et al.*, 2004).

Métodos semi-empíricos são construídos por simplificações dos métodos *ab initio* a partir da adição de parâmetros experimentais. A simplificação pode ocorrer em vários níveis como por exemplo simplificação do Hamiltoniano, avaliação aproximada de certas integrais moleculares ou simplificação da função de onda (Sant'Anna, 2002).

Os métodos AM1 (*Austin Model 1*), desenvolvido por Dewar e colaboradores (1985) e seu sucessor o PM3 (*Parametrized Model 3*) (Stewart *et al.*, 1998) têm sido amplamente empregados em estudos voltados para o planejamento de candidatos a agentes terapêuticos de distintas classes desde antiparasitários como antimaláricos (Bhattacharjee *et al.*, 2001; 2002), antichagásicos (Carvalho *et al.*, 2007) e

leishmanicidas (Hemmatiinejad *et al.*, 2007) a antineoplásicos (Rao & Hu, 2006), a agentes hipnoanalgésicos (Zayed *et al.*, 2006), ansiolíticos (Zayed *et al.*, 2007a) e antidepressivos (Zayed *et al.*, 2007b), entre outros.

Com respeito aos fármacos antimaláricos, o método semi-empírico AM1, tem-se mostrado capaz de reproduzir, em especial, dados cristalográficos de compostos quinolínicos, fornecendo, ainda, dados físico-químicos e superfícies estereo-eletrônicas capazes de promover maior entendimento da relação estrutura-atividade (Bhattacharjee *et al.*, 1996; 1998; Menezes *et al.*, 2002b, Portela *et al.*, 2004, Araujo *et al.*, 2007). O método AM1 foi também utilizado por Bhattacharjee e colaboradores (2002) para a otimização das estruturas com vistas à geração de geometrias na proposição de um farmacóforo de **AMR** à **CQ**.

Silva e colaboradores (1997) utilizaram os métodos semi-empíricos AM1 e PM3, e a mecânica molecular para investigar a superfície de energia potencial de agentes antimaláricos 4-quinolinocarbinolamínicos. Outro estudo (O'Neill *et al.*, 1997) envolvendo antimaláricos 4-aminoquinolínicos realizado a fim de avaliar a importância da distância interatômica entre os nitrogênios quinolínico e alquilamino, fez uso do PM3 na minimização das estruturas de menor energia mínima após os cálculos de dinâmica molecular.

Métodos semi-empíricos têm, também, sido empregados com frequência em estudos de MM envolvendo núcleos fenotiazínicos e iminodibenzílicos. O método AM1 foi empregado para averiguar a disposição espacial dos anéis aromáticos de antidepressivos tricíclicos, antipsicóticos e anticonvulsivantes como fator determinante na classificação de cada atividade farmacológica (Marone *et al.*, 1999; Casarotto & Craik, 2001).

O método PM3 foi utilizado no estabelecimento de relações estrutura-atividade de compostos fenotiazínicos (Motohashi *et al.*, 1997) e de compostos iminodibenzílicos (Pietrzycki *et al.*, 2000). No primeiro estudo, o momento de dipolo foi utilizado para estimar a atividade biológica de fenotiazínicos e no segundo, outros parâmetros físico-químicos tais como distribuição de orbitais moleculares e distribuição eletrônica permitiram avaliar aspectos bioquímicos e farmacológicos de iminodibenzílicos. Em estudo recente, o método PM3 foi selecionado com a finalidade de relacionar o perfil

eletroquímico da amitriptilina às cargas atômicas derivadas do potencial eletrostático (Toledo *et al.*, 2005).

A descoberta dessas e de outras modificações do método semi-empírico PM3 levou a investigação e posterior mudança de sua parametrização, resultando em sua otimização e conseqüente criação de outro método, o PM6. Neste, 70 elementos foram parametrizados e a média de erros entre os calores de formação calculados e os de referência para 4.492 espécies foi de 0,8 kcal/mol e para o subgrupo de 1.373 compostos envolvendo apenas os átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, flúor, fósforo, enxofre, cloro e bromo o erro foi de 4,4 kcal/mol, equivalente a média de outros métodos como o RM1 (5.0 kcal/mol), B3LYP/6-31G* (5.2 kcal/mol), PM5 (5.7 kcal/mol), PM3 (6.3 kcal/mol), HF/6-31G* (7.4 kcal/mol) e AM1 (10.0 kcal/mol). Desta forma, os erros dos métodos AM1 e PM3 vão sendo corrigidos e aperfeiçoamento significativo pode ser feito para a predição da geometria dos compostos (Stewart, 2007).

O método semi-empírico AM1 também foi reparametrizado recentemente originando o RM1 (*Recife Model 1*). Assim como no método original, as propriedades utilizadas para na parametrização foram calores de formação, momentos de dipolo, potenciais de ionização e geometrias variáveis de comprimento e ângulos de ligação. Fizeram parte do conjunto de treino 1.736 moléculas contendo os átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e halogênios. Diferentemente do AM1 e semelhante ao PM3 e PM5 todos os parâmetros utilizados no RM1 foram otimizados e a média de erros foi menor que para os métodos anteriores. Além disso, um erro na carga do átomo de nitrogênio do método PM3 encontra-se corrigido no RM1 (Rocha *et al.*, 2006).

Os cálculos empregando a teoria de densidade funcional, DFT, representam alternativa recente para a execução de sistemas ricos em elétrons, em que a energia mínima do sistema é calculada como função única da densidade eletrônica (Geerlings *et al.*, 2003). Estes métodos são utilizados em geral após otimização por método quântico, como, por exemplo, o conjunto de bases 6-31 G* e já foram utilizados com sucesso para estudo de interação de compostos quinolínicos com a hematina (Portela *et al.*, 2004).

Recentemente, um grupo de novos parâmetros relacionados à propriedades e estruturas de grupos redox, presentes em regiões ativas de proteínas contendo átomos de ferro (Fe), com especial atenção para Fe-enxofre, Fe-heme, Fe-hidrogenases, foi desenvolvido e integrado ao método semi-empírico PM3. Os dados foram computados em nível B3LYP/6-31G* para uma série teste de 60 complexos e promoveu melhores previsões energéticas e estruturais do que os observados por B3LYP/STO-3G. Estes novos parâmetros representam um ponto de partida para o aperfeiçoamento de complexos contendo o átomo de Fe (McNamara *et al.*, 2006).

O B3LYP, inicialmente introduzido no programa GAUSSIAN, é uma modificação do anterior BPW91 onde o funcional de correlação PW91 é substituído por LYP. É o método de DFT híbrido mais utilizado atualmente para o estudo de moléculas organometálicas, apresentando bom desempenho quando aplicado a uma enorme variedade de sistemas (Bridgeman, 2005).

2.6.2. Estudos de Ancoramento

O método de ancoramento, em inglês, *docking*, estuda a interação energética comparando as afinidades de ligação entre o alvo biológico e o ligante por meio de um campo de força (Gund *et al.*, 1996; Höltje & Folkers, 1996; Leach, 1996). Esta metodologia tem sido amplamente aplicada em Química Farmacêutica, tendo como função primária simular a correta posição e orientação do ligante em relação ao receptor, onde o receptor e o ligante encontram-se em equilíbrio entre os estados associado e não associado. No estudo de ancoramento pode-se indicar o modelo de ligação de energia global mínima, de modo que se apresente como estrutura estável e precisa (Henkel & Billings, 1995; Gund *et al.*, 1996; Itäl *et al.*, 1996).

No estudo de ancoramento são consideradas forças de origem eletrostáticas e estéricas, interação com o solvente e graus de flexibilidade das moléculas envolvidas. Deve-se, ainda, procurar avaliar as várias possibilidades de interação do complexo formado, considerando-se todos os graus de liberdade de rotação e translação em relação à conformação do ligante. Realizado desta maneira, procura-se resolver um dos grandes problemas iniciais presentes em estudos de interação, quando se avaliavam modelos rígidos (Itäl *et al.*, 1996; Kaapro & Ojanen, 2004).

Esta técnica foi utilizada por Portella e colaboradores (2003), através do programa GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), para investigar a interação de diferentes antimaláricos com o dímero μ -oxo da hematina. Resultados semelhantes foram observados por Leed e colaboradores (2002) por meio da técnica de dinâmica molecular direcionada por resultados de estudo de RMN. Neste estudo, foi possível visualizar diferenças na estereoespecificidade entre a quinina e quinidina, bem como a influência da cadeia lateral, cujo aumento ou diminuição perturbaria a estabilidade do complexo formado com a hematina.

Portela e colaboradores (2003) realizaram estudo de ancoramento entre antimaláricos e o dímero μ -oxo da heamatina e a hemozoína com a finalidade de reafirmar os resultados obtidos por MEP. Verificou-se que as regiões de menor densidade eletrônica, localizado próximo ao grupo 4-amino do anel quinolínico interage com regiões mais ricas em elétrons do anel porfirínico (região central).

Recentemente, estudo de ancoramento foi realizado por Costa e colaboradores (2007) com o objetivo de se obter maior compreensão da interação entre o complexo formado pela artemisinina e derivados com a molécula do heme. Cálculos de variação de entalpia obtidos por método semi-empírico PM3 mostraram a importância da presença de determinados átomos carbono bem como o prejuízo promovido pelo impedimento estérico da ligação peróxido para o reconhecimento e estabilidade do complexo formado.

Estudo de modelagem molecular para compostos análogos da clorpromazina contendo nitrogênio quaternário foi realizado com o objetivo de explicar as energias e orientações envolvidas no ancoramento destes compostos com a enzima tripanotona redutase do parasito *T. cruzi*. A identificação de interações hidrofóbicas bem como a ocorrência de interação eletrostática entre os aminoácidos Glu 466 e 467 e o átomo de nitrogênio catiônico possibilitaram explicar a atividade inibitória 40 vezes superior dos análogos quaternários em relação ao protótipo (Parveen *et al.*, 2005).

Estudo de afinidade de ligação e ancoramento foram realizados para uma série de compostos benzimidazólicos com potenciais propriedades antipsicóticas sobre receptores de dopamina D₁ e D₂ e no receptor 5HT_{1A} da serotonina. Neste estudo, os resultados dos compostos radiomarcados foram comparados a estudo prévio de

ancoramento a fim de melhor explicar os resultados obtidos. Verificou-se que o átomo de cloro do anel benzimidazólico é essencial para a atividade, formando interação com o aminoácido Ser 122 do receptor dopamínico D₂ e Trp 358 do receptor 5-HT_{1A} (Biava *et al.*, 2007).

Ancoramento também foi utilizado por Patel e Bharatan (2007) para validar resultado de CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) de uma série de derivados pirazólicos com atividade inibitória sobre receptores serina/treonina kinase GSK-3, envolvidos em doenças como câncer, Alzheimer, processos inflamatórios, desordens bipolares e principalmente diabetes do tipo 2. Observou-se que diferenças estruturais como substituintes de menor volume molecular na posição 6 do anel favorecem a atividade sobre GSK-3 por ligarem-se à cavidade formada pelos aminoácidos Leu 132 e Cys 199 do sítio ativo.

3. METODOLOGIA

3.1. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

3.1.1. Estudo das Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas

Cálculos das propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas foram realizados no programa Spartan for Linux/Unix versão 119 (Wavefunction Inc.), utilizando-se computador AMD Athlon, 512 Mb, 1,6 GHz.

Os compostos das **Séries 1 e 2** tiveram as geometrias desenhadas e corrigidas por método de mecânica molecular MMFF94 (Halgren, 1996) e, em seguida, otimizadas pelos métodos semi-empíricos AM1 (Dewar *et al.*, 1985) e PM3 (Stewart *et al.*, 1990). Foram considerados os estados eletrônicos de espécie neutra, monoprotonada (**H⁺**) e diprotonada (**2H⁺**), neste último caso, para **CQ**, **AQ-13**, **MPC**, **FFN**, **TFP**, **RCQ** e **RCQ-CPZ**.

Por emprego dos métodos semi-empíricos AM1 e PM3, procedeu-se à análise conformacional utilizando-se o método randômico de Monte Carlo (Sant'Anna, 2002). Os ângulos diedros foram rotacionados segundo condição estabelecida pelo programa (120° para ligações envolvendo átomos de carbono sp³ e átomos presentes em anéis de seis membros como o piperazínico). Os meios gasoso (vácuo) e de solvatação aquosa (sistema SMS.5) (Chambers *et al.*, 1996) foram considerados. Seguiu-se à análise e seleção dos confôrmeros de menor energia mínima. O confôrmero selecionado de cada composto foi submetido ao cálculo de determinação de carga de ponto único (*Single Point*). No caso da **CPZ** foi realizado também cálculo *ab initio* por grupo de bases 3-21G*, devido a ausência de dados cristalográficos do composto na forma de cloridrato.

Na construção das superfícies eletrônicas empregaram-se condições padrões do programa considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 e/ua³ para os mapas de potencial eletrostático (MEPs) e de 0,02 eV para os mapas de distribuição orbitalar de HOMO e de LUMO. Variação de cores a partir do vermelho intenso (região de maior densidade eletrônica), laranja, verde ao azul intenso (região de menor densidade eletrônica) é adotada pelo programa para representação dos MEPs.

Cálculo teórico de lipofilicidade (Clog P) foi realizado para as espécies neutras dos compostos empregando-se o método de Ghose-Pritchett & Crippen (Ghose *et al.*, 1988), disponível no programa Spartan.

3.1.2. Estudos de Ancoramento

Estudos de ancoramento entre compostos representantes dos anéis quinolínico, fenotiazínico e iminodibenzílico e o dímero μ -oxo da hematina foram realizados empregando-se os programas Spartan for Linux/Unix versão 119 (Wavefunction Inc.) e GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), versão 3.1, da Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), em computadores AMD Athlon, 512 Mb, 1,6 GHz e 1,25 GHz, respectivamente.

3.1.2.1. Programa Spartan

O grupo heme disponível no banco de dados do programa Spartan foi utilizado para construção do dímero μ -oxo da hematina. A estrutura química do grupo heme teve as distâncias entre os átomos de ferro e nitrogênio dos anéis pirrólicos do anel porfirínico comparadas a dado cristalográfico (Bominaar *et al.*, 1992) obtendo-se média das distâncias igual a 2,062 Å. considerada próxima ao valor cristalografico de 2,089 Å. Em seguida, os átomos de ferro e dos quatro grupos pirrólicos foram congelados e a geometria otimizada por método de mecânica molecular MMFF94. A construção de ligação covalente entre os átomos de ferro de dois grupos heme, de geometria otimizada, a átomo de oxigênio originou a estrutura do dímero μ -oxo da hematina. Posteriormente, átomos de hidrogênio foram adicionados aos grupos carboxilato originando a forma de ácido carboxílico.

As geometrias das formas heme carboxilato e ácido carboxílico minimizadas por método de mecânica molecular (MMFF94) foram otimizadas por método semi-empírico PM3. Análise conformacional por método randômico de Monte Carlo foi realizada utilizando-se o método MMFF94, no qual as ligações simples das cadeias laterais do dímero μ -oxo foram rotacionadas segundo condição padrão do programa. O confôrmero de menor energia mínima gerado em vácuo foi selecionado e submetido a cálculo de carga de ponto único, utilizando-se o método PM3. As superfícies eletrônicas de MEP e distribuição orbitalar de HOMO e LUMO foram calculadas.

Os compostos **CQ** (formas neutra, **H⁺**, e **2H⁺**), **AQ-13**, **MPC**, **RCQ** e **RCQ-CPZ** (formas **2H⁺**). **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** foram empregados para o estudo de ancoramento com o dímero μ -oxo da hematina obtido. A ligação entre cada composto e

o dímero se fez por meio da opção de ligante disponível no programa Spartan. Anel benzênico com esta propriedade foi substituído em anel aromático presente nos confôrmeros de menor energia mínima selecionados dos compostos, obtidos após cálculo por método PM3. As demais regiões das estruturas químicas destes confôrmeros foram mantidas congeladas para a construção do ligante. A ligação entre as valências livres do átomo de ferro do dímero e a presente no anel aromático ligante substituído de cada composto foi feita por uma distância inicial de 5 Å. Outras distâncias ensaiadas foram de 3 e 10 Å. A face mais rica em elétrons do dímero μ -oxo da hematina, determinada por análise da superfície de distribuição dos orbitais de HOMO, foi adotada. Em seguida, fez-se o rompimento da ligação composto-dímero, com remoção das valências livre restantes, e o descongelamento dos demais átomos.

O estudo de ancoramento composto-dímero se deu por processo de minimização da energia seguido por cálculo de equilíbrio geométrico por método de mecânica molecular MMFF94. Cálculo da variação da energia de formação do complexo e análise da geometria final foram considerados para comparação entre os diferentes sistemas heterocíclicos.

3.1.2.2. Programa GOLD

Empregaram-se os representantes quinolínicos **CQ.2H⁺**, **AQ-13.2H⁺**, a fenotiazina **CPZ.H⁺** e **IMP.H⁺** e **DSP.H⁺** como iminodibenzílicos. Estudou-se também os compostos híbridos **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺**. Adotou-se o dímero μ -oxo da hematina, na forma de ácido carboxílico. As estruturas foram as calculadas por método semi-empírico PM3 no programa Spartan.

No programa GOLD, selecionou-se o átomo 75 correspondente ao átomo de ferro do dímero μ -oxo, como visualizado no programa PyMOL (DeLano Scientific LLC, versão 0.99) como referência na formação do complexo. Na seleção das demais opções disponíveis manteve-se o padrão do programa. Foi considerado raio de 10 Å e a opção de detectar cavidade não foi assinalada. Como função de ajuste foi considerado o GOLDScore com parâmetros de entrada na condição padrão. Para os parâmetros de anelamento considerou-se 6 Å para as forças de Van der Waals e 3 Å para ligações de hidrogênio.

3.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

Avaliação da interação dos anéis quinolínico (**CQ**), fenotiazínico (**CPZ**) e iminodibenzílico (**DSP**) com a hematina foi realizada através de análises espectroscópicas na região do ultravioleta-visível (UVVIS) e do Raman Ressonante (RR). Estudos de afinidade entre os núcleos citados e de verificação da ligação do **AQ-13**, ambos com a hematina, foram realizados na região do UVVIS.

Estes estudos ocorreram com a colaboração da Profa. Dra. Dalva Lúcia A. de Faria e do Dr. Antonio Carlos Sant'Ana, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2.1. Materiais

- Difosfato de cloroquina obtido da Fundação para o Remédio Popular (FURP);
- Cloridrato de clorpromazina e cloridrato de imipramina doados por Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda;
- Cloridrato de desipramina padrão farmacêutico Ciba–Geigy;
- Difosfato de *N*1-(7-cloro-quinolin-4-il)-3-(*N*3,*N*3-dietilamino) propilamina (**AQ-13**) obtido por síntese realizada por colaboração da técnica de laboratório Kátia. C. A. Botelho e Dr. Márcio H. Zaim, membros do grupo de pesquisa associado, empregando metodologia de síntese e identificação reportados na literatura (Chitalu *et al.*, 2006; Drake *et al.*, 2006).
- Cloreto de ferriprotoporfirina IX (hemina) obtido da Fluka BioChemika;
- 4,7-dicloroquinolina obtido da Merck;
- *N,N*-dietil-1,3-propanodiamina obtido da Fluka;
- Acetato de sódio cristalizado p.a. obtido da Merck;
- Hidrogênio fosfato de potássio obtido da Merck;
- Hidróxido de sódio obtido da Merck;
- Metanol obtido da F. Maia Indústria e Comércio Ltda;
- Água ultrapura obtido em sistema de purificação de água GEHAKA.

3.2.2. Equipamentos e Acessórios

- Balança analítica Precisa, modelo XT 220A;
- Cubetas de quartzo com 1mm de caminho óptico;
- Micropipeta automática Huawet, volume de 20 a 200 μL ;
- Micropipeta automática Petcelm, volume igual a 500 μL ;
- Sistema de purificação de água GEHAKA, modelo Master System;
- Potenciostato Autolab PGSTAT 30, Ecochimie com sistema de três eletrodos: carbono vítreo como eletrodo de trabalho, Ag-AgCl como eletrodo de referência e Pt como auxiliar;
- pHmetro pH-meter 744 da Metrohn;
- Espectrofotômetro de absorção no UV-Visível Beckman, DU-70;
- Espectrofotômetro de absorção no UV-Visível Shimadadzu UV-3101 PC;
- Espectrômetro Raman de absorção Renishaw System-3000;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz Bruker, Advance DPX -3000;
- Programa Grams/ 32 AI versão 6.00, Galactic Ind. Corporation;
- Programa Microcal™ Origin 6.0 Microcal Software, Inc.

3.2.3. Soluções Empregadas

3.2.3.1. Soluções-Tampão

Empregaram-se dois valores de soluções-tampão, a saber de 7,4, em semelhança ao pH sangüíneo, e de 5,5, simulando o pH do vacúolo digestivo do parasito (O'Neill *et al.*, 1998). Estas soluções foram empregadas para preparação das amostras dos compostos em estudo como utilizadas também como branco na realização das medidas experimentais.

A solução-tampão pH 7,4 foi preparada segundo Morita & Assumpção (1972), em que solução de hidróxido de sódio a 0,1 M é misturada à solução de diidrogeno-fosfato de potássio a 0,1 M, obedecendo a proporção de 39,50 mL da primeira solução para 50 mL da segunda.

A solução-tampão 5,5 (solução 1) foi obtida segundo descrito por Kalkanidis e colaboradores (2002), através da dissolução de 0,6805 g de acetato de sódio em

solução de metanol a 43%. Em uma proveta, mediram-se 215 mL de metanol a 43% e 285 mL de água ultra-pura, obtendo-se uma solução de metanol a 10%

Outra solução-tampão de pH 5,5 (solução 2), empregada para o estudo de afinidade entre os três diferentes compostos (**CQ**, **AQ-13**, **CPZ** e **IMP**) e a hemina, foi obtida por solução de cloreto de sódio a 0,5 M e solução de diidrogeno-fosfato de potássio a 0,0188 M em proporção 1:1 (Pabst & Carta, 2007).

Uma terceira solução de pH 5,5 (solução 3) foi empregada no estudo de RR e, posteriormente, nos experimentos de UVVIS. Esta foi composta pela adição de ácido clorídrico em água ultrapura até atingir o pH 5,5. Variação desse valor foi corrigida por solução de hidróxido de sódio a 0,1 M.

3.2.3.2. Solução de Hematina

Hemina (0,0196 g) foi dissolvida em solução de hidróxido de sódio a 0,1 M para preparação de 10 mL da solução-mãe de hematina, à concentração de $30 \cdot 10^{-4}$ M (Kalkanidis *et al.*, 2002). A partir desta, foram preparadas, nas soluções-tampão 7,4 e 5,5 (soluções 1 e 3), as concentrações de 15 e 30 μ M empregadas nas análises UVVIS. No estudo de RR, a concentração da solução-mãe foi de $2 \cdot 10^{-2}$ M e diluída nas soluções-tampão 7,4 e 5,5 (soluções 1 e 3) até $2 \cdot 10^{-4}$ M para a execução das análises.

O uso da hemina (Fe(III) coordenado a cloreto) se deveu à sua disponibilidade comercial em oposição à hematina (Fe(III) coordenado a hidróxido).

3.2.3.3. Solução dos Compostos Tricíclicos e da Cloroquina

Cloridrato de imipramina (0,0191 g), cloridrato de desipramina (0,0182 g), cloridrato de clorpromazina (0,0213 g) e difosfato de cloroquina (0,0310 g) foram solubilizados em 10 mL de água ultrapura para obtenção das respectivas soluções-mãe na concentração de $60 \cdot 10^{-4}$ M. Em seguida, estas soluções foram diluídas utilizando-se as soluções-tampão 7,4 e 5,5 (soluções 1 e 3) para as concentrações de 30 e 60 μ M empregadas nas análises UVVIS.

No estudo de RR, as soluções-mãe dos compostos foram preparadas na concentração de $4 \cdot 10^{-2}$ M e então diluídas nas soluções-tampão 7,4 e 5,5 (solução 3) para as concentrações nas leituras, $4 \cdot 10^{-4}$ M.

3.2.4. Métodos para a obtenção dos espectros

3.2.4.1. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível

Os espectros UVVIS foram obtidos monitorando-se as alterações dos espectros de absorção da hematina na região de 200 a 700 nm, a qual foi adotada em razão de abranger a absorção dos compostos em estudo bem como da hematina. Regiões próximas são empregadas na literatura (Kalkanidis e *et al.* 2002; Clarke, 1986; Kalkanidis *et al.*, 2002).

Em seguida, misturando-se 1 mL de solução 30 μ M de hemina a 1 mL de solução 60 μ M do composto (concentrações finais de 30 e 15 μ M, respectivamente), obedecendo relação estequiométrica de 2 de composto para 1 de heme (Egan, 2005), foi realizado o registro dos espectros a cada 15 minutos até completar duas horas.(Kalkanidis *et al.*, 2002).

3.2.4.2. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Raman Ressonante

Em pH 5,5 (solução 3) e 7,4 foram obtidos os espectros RR da solução da hematina isolada ($2 \cdot 10^{-4}$ M) e em associação aos compostos ($4 \cdot 10^{-4}$ M), utilizando radiação excitante em ressonância com a banda Q (linha laser He/Ne a 632,8 nm) (Spiro & Strekas, 1975; Wood NcNaughton, 2007), e com as bandas Soret (linha laser Ar⁺ a 514,5 e 488,0 nm) (Spiro & Strekas, 1975; Wood NcNaughton, 2007). A análise foi realizada monitorando-se as alterações do perfil do espectro do grupo heme na faixa de 200 a 1.700 cm^{-1} . As variações dos padrões espectrais foram observadas e comparadas para análise.

3.2.4.3. Estudo Comparativo da Afinidade de Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível

Estudo foi realizado com o objetivo de verificar qual núcleo (quinolínico representado pela **CQ**, fenotiazínico, representado pela **CPZ** ou iminodibenzílico, representado pela **IMP**) teria maior afinidade para interagir com a hematina.

Neste estudo, foi realizado os espectros dos diferentes compostos isoladamente (**CQ**, **CPZ**, **IMP** e Hematina) e das associações binárias (**CQ+CPZ**; **CQ+IMP**;

CQ+Hematina; **CPZ**+Hematina e **IMP**+Hematina) e terciárias (**CQ**+**CPZ**+Hematina e **CQ**+**IMP**+Hematina). Neste último, a hematina foi adicionada a solução contendo previamente os dois outros compostos (**CQ**+**CPZ** ou **CQ**+**IMP**). Desta forma, a análise foi realizada comparando-se o espectro de todos os compostos numa mesma solução com o espectro formado pela somatória de uma das associações binárias com o espectro de um dos compostos isolados, de tal forma que três 3 situações puderam ser supostas:

- (1) a **CQ** teria maior afinidade pela hematina do que **CPZ** ou **IMP** e o espectro dos três compostos (**CQ**+**CPZ**+Hematina) seria mais parecido com o espectro (**CQ**+Hematina)+**CPZ** ou **IMP** isolada;
- (2) a **CPZ** ou **IMP** teria maior afinidade pela hematina do que **CQ** e o espectro dos três compostos (**CQ**+**CPZ**+Hematina) seria mais parecido com o espectro (**CPZ**+Hematina ou **IMP**+Hematina)+**CQ** isolada;
- (3) a **CPZ** e **CQ** ou **IMP** e **CQ** teriam maior afinidade entre si e esta associação não seria desfeita com a adição da hematina. Desta forma o espectro dos três compostos (**CQ**+**CPZ**+Hematina) seria mais parecido com o espectro (**CQ**+**CPZ**)+Hematina isolada ou (**CQ**+**IMP**)+Hematina.

3.2.4.4. Estudo da Complexação do AQ-13 com a Hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível e Raman Ressonante

Análise de UVVIS e RR para o **AQ-13** foi realizado de forma semelhante à realizada para os compostos **CQ**, **CPZ** e **IMP** (item 3.2.4.1). No estudo de UVVIS, difosfato de **AQ-13** (0,0293 g) foi solubilizado em 10 mL de água ultrapura para obtenção da solução-mãe na concentração de $60 \cdot 10^{-4}$ M. Em seguida, esta solução foi diluída utilizando-se as soluções-tampão 7,4 e 5,5 (soluções 1 e 3) para as concentrações de 30 e 60 μ M empregadas nas análises UVVIS.

No estudo de RR, a solução-mãe do **AQ-13** foi preparada na concentração de $4 \cdot 10^{-2}$ M e então diluída nas soluções-tampão 7,4 e 5,5 (solução 3) para a concentração da leitura, $4 \cdot 10^{-4}$ M.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

4.1.1. Estudo de Propriedades Físico-Químicas e Superfícies Eletrônicas

Com a finalidade de melhor compreender e interpretar as atividades antimalárica e/ou moduladora da resistência reportadas para os compostos em estudo, estes tiveram as propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas calculadas e comparadas às da **CQ**, antimalárico de referência. Semelhanças quanto às características moleculares poderiam justificar a atividade antimalárica intrínseca observada.

Para tanto, utilizou-se o programa Spartan para Linux/Unix versão 119 e os compostos, na grande maioria amina, foram analisados quanto ao estado eletrônico nas formas neutra, monoprotonada (H^+) e diprotonada ($2H^+$), considerando-se o pH de 7,4 em meio fisiológico (espécies neutra e monoprotonada) e no vacúolo digestivo (espécies monoprotonada e diprotonada), provável local de ação da **CQ** e de pH 5,5. Esperava-se assim, poder avaliar os sistemas heterocíclicos presentes nos compostos estudados: quinolínico, iminodibenzílico e fenotiazínico, em busca de se planejar candidatos a agentes antimaláricos.

4.1.1.1. Compostos da **Série 1**

A) Propriedades físico-químicas

A **Série 1** é constituída pelo antimalárico **CQ** (isômero *S*), compostos fenotiazínicos (**FNT**): clorpromazina (**CPZ**), levomepromazina (**LVM**), flufenazina (**FFN**) e trifluoperazina (**TFP**); compostos iminodibenzílicos (**IMN**): desipramina (**DSP**) e imipramina (**IMP**) os quais apresentaram atividade em cepas de *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Menezes *et al.*, 1997, 2002), e pelos derivados dibenzosuberanilpiperazina **DBZ** (Osa *et al.*, 2003) e o fenotiazínico **FNT** (Guan *et al.*, 2002), apontados na literatura como candidatos promissores a **AMR**, e pela clorfeniramina, **CFN**, único **AMR** a ser empregado na terapêutica em associação à **CQ** (Sowunmi *et al.*, 1998; 2006; 2007).

A fim de validar o emprego como também a escolha do método semi-empírico a ser adotado (AM1 ou PM3), características geométricas de distâncias interatômicas, ângulos de ligação e ângulos diedro dos confôrmeros de menor energia mínima calculados em meio gasoso (Tabela 4) e solvatado (Tabela 5) da espécie diprotonada

da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotionadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) foram comparadas a dados cristalográficos de raios-X do difostato de cloroquina hidratado (Furusetth *et al.*, 1990), cloridrato de clorpromazina (Klein & Conrad, 1986) e cloridrato de imipramina (Post *et al.*, 1975), respectivamente.

No entanto, a ausência de medidas de ângulo diedro no trabalho de Klein e Conrad (1986) do cloridrato de clorpromazina, bem como de outros trabalhos na literatura contendo medidas de distância, ângulos de ligação e diedro desta mesma molécula nos levou a busca no banco de dados *Cambridge Structural Database* (CDS). Este foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector do LaCrEMM-DQ da Universidade Federal de São Carlos, com o auxílio do Dr. Antônio Carlos Trindade da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Tabela 4a - Medidas de distância interatômica dos conformêros de menor energia mínima calculados em meio gasoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Distância interatômica (Å)							
	CQ.2H ⁺				CPZ.H ⁺			
	AM1	PM3	Raios-X ¹	AM1	PM3	Raios-X ²	AM1	PM3

N1- C2	1,35	1,36	1,33					
C2-C3	1,39	1,39	1,36					
C2-C3	1,43	1,41	1,41					
C3-N2	1,36	1,38	1,34					
N2 -C12	1,46	1,49	1,47					
C12 -C13	1,54	1,54	1,53

N1-C12				1,42	1,47	1,43		
C11-C12				1,42	1,41	1,39		
C11-S5				1,71	1,76	1,76		
C13-S				1,71	1,77	1,76		
C13-C5				1,39	1,39	1,38		
N1-C14				1,44	1,50	1,44		
C14-C15				1,53	1,53	1,51		
C15-C16				1,52	1,52	1,52

C4-C13				1,40	1,40	1,39	1,40	1,39
C5-C6				1,51	1,52	1,51	1,51	1,41
C6-C12				1,49	1,50	1,51	1,51	1,52
C12-C7				1,40	1,40	1,39	1,40	1,39
N1-C11				1,44	1,47	1,42	1,44	1,43
N1-C15				1,46	1,51	1,47	1,46	1,47
C15-C16				1,53	1,52	1,53	1,53	1,54
C16-C17				1,52	1,52	1,52	1,52	1,49

1-Furuseth *et al.*, 1990; 2- Klein & Conrad, 1986; 3- Post *et al.*, 1975;.

* A e B : diferentes conformêros gerados pela assimetria dos grupos metilenos.

Tabela 4b - Medidas ângulo de ligação dos conformeros de menor energia mínima calculados em meio gasoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Ângulo de ligação (°)							
	CQ.2H ⁺				IMP.H ⁺			
	AM1	PM3	Raios-X ¹		AM1	PM3	Raios-X ²	
	122,14	120,86	122,6					
N1-C2-C3	120,14	119,46	119,5					
N1-C9-C10	121,85	121,56	121,3					
N2-C4-C3	110,27	108,76	109,2					
N2-C12-C11	111,06	110,98	113,7					
C12-C13-C14								
C2-C3-C4	119,39	119,65	117,0					
C11-S5-C13	100,77	98,44	97,3					
C12-N1-C10	117,14	112,65	118,4					
N1-C14-C15	112,28	110,33	109,7					
C14-C15-C16	113,25	113,67	109,3					
C5-C6-C12	112,55	118,83	110,2					
C10-C11-N1	120,87	117,49	120,3					
C11-N1-C13	114,17	113,64	120,8					
N1-C15-C16	113,81	111,79	111,2					
C15-C16-C17	112,80	112,51	108,8

1-Furuseth *et al.*, 1990; 2- Klein & Conrad, 1986; 3- Post *et al.*, 1975;.

* A e B : diferentes conformeros gerados pela assimetria dos grupos metilenos.

Tabela 4c - Medidas ângulo diedro dos conformêros de menor energia mínima calculados em meio gasoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Ângulo diedro (°)									
	CQ.2H ⁺					CPZ.H ⁺				
	AM1	PM3	Raios-X ¹	AM1	PM3	Raios-X ²	AM1	PM3	IMP.H ⁺	Raios-X ³ (A)* (B)*
C ₃ -C ₄ -C ₃ -N ₂	-177,69	-174,83	177,2							
C ₄ -C ₃ -N ₂ -C ₁₀	3,89	18,44	-3,4							
N ₂ -C ₁₀ -C ₁₂ -C ₁₃	-161,44	172,96	-65,0							
C ₁₃ -C ₁₄ -C ₁₅ -N ₃	-179,52	173,84	-178,5							
C ₁₄ -C ₁₅ -N ₃ -C ₁₆	79,84	-67,36	58,4							
C ₁₅ -N ₃ -C ₁₆ -C ₁₇	157,58	169,74	-174,7							
C ₁₃ -S ₅ -C ₁₁ -C ₄				-154,07	-145,47	143,9	A	B		
S ₅ -C ₁₁ -C ₁₂ -N ₁				-0,08	-5,72	3,3	146,1	-1,8		
C ₁ -C ₁₂ -N ₁ -C ₁₀				131,24	-129,50	-130,4	137,4			
C ₁₀ -N ₁ -C ₁₄ -C ₁₅				123,33	-136,71	14,5	134,9			
N ₁ -C ₁₃ -C ₁₄ -C ₁₅				-60,84	58,53	-171,5	179,6			
C ₁₃ -C ₁₄ -C ₅ -C ₆								13,46	-17,8	5,7
C ₁₂ -C ₆ -C ₅ -C ₁₃								-63,45	70,2	49,1
N ₁ -C ₁₄ -C ₁₃ -C ₅								-4,20	-1,02	0,0
N ₁ -C ₁₅ -C ₁₆ -C ₁₇								-64,56	65,47	160,5

1-Furuseth *et al.*, 1990; 2- Klein & Conrad, 1986; 3- Post *et al.*, 1975;.

* A e B : diferentes conformêros gerados pela assimetria dos grupos metilenos.

Tabela 5a - Medidas de distância interatômica dos confômeros de menor energia mínima calculados em meio aquoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Distância interatômica CPZ.H ⁺			IMP.H ⁺		
	AM1	PM3	Raios-X ¹	AM1	PM3	Raios-X ² (A)* (B)*
N1-C12	1,42	1,48	1,40			
C11-C12	1,42	1,40	1,40			
C11-S5	1,7	1,75	1,75			
C13-S	1,69	1,75	1,75			
C13-C5	1,41	1,41	1,43			
N1-C14	1,43	1,52	1,51			
C14-C15	1,54	1,53	1,53			
C15-C16	1,52	1,52	1,55			
C4-C13			1,40	1,40	1,39	1,38
C5-C6			1,51	1,52	1,51	1,41
C6-C12			1,49	1,50	1,51	1,52
C12-C7			1,40	1,40	1,39	1,39
N1-C11			1,43	1,47	1,42	1,43
N1-C15			1,45	1,51	1,47	1,47
C15-C16			1,53	1,52	1,53	1,54
C16-C17			1,52	1,53	1,52	1,49

1- Klein & Conrad, 1986; 2- Post *et al.*, 1975;.

* A e B : diferentes confômeros gerados pela assimetria dos grupos metilenos.

Tabela 5b - Medidas de ângulo de ligação dos confômeros de menor energia mínima calculados em meio aquoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Ângulo de ligação				IMP.H ⁺	
	CPZ.H ⁺					
	AM1	PM3	Raios-X ¹		AM1	PM3
C ₂ -C ₃ -C ₄	118,75	119,23	117,0			
C ₁₁ -S ₅ -C ₁₃	102,37	99,59	97,3			
C ₁₂ -N ₁ -C ₁₀	120,68	113,87	118,4			
N ₁ -C ₁₄ -C ₁₅	115,63	111,27	109,7			
C ₁₄ -C ₁₅ -C ₁₆	108,65	113,02	109,3			
C ₅ -C ₆ -C ₁₂				112,22	110,68	110,2
C ₁₀ -C ₁₁ -N ₁				120,04	117,73	120,3
C ₁₁ -N ₁ -C ₁₃				115,86	113,23	120,8
N ₁ -C ₁₅ -C ₁₆				113,11	110,78	111,2
C ₁₅ -C ₁₆ -C ₁₇				109,84	112,29	108,8
						112,3

1- Klein & Conrad, 1986; 2- Post *et al.*, 1975;.

* A e B : diferentes confômeros gerados pela assimetria dos grupos metilênos.

Tabela 5c - Medidas de ângulo diedro dos confômeros de menor energia mínima calculados em meio aquoso pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para as espécies diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**) e monoprotonadas da clorpromazina (**CPZ.H⁺**) e imipramina (**IMP.H⁺**) e as medidas correspondentes obtidas por cristalografia de raios-X.

	Ângulo diedro CPZ.H ⁺				IMP.H ⁺		
	AM1		PM3		AM1	PM3	Raios-X ² (A)* (B)*
C13-S5-C11-C4	161,79	-155,01	A 143,9	B -146,1		
	S5-C11-C12-N1	-1,33	3,30	-3,3	-1,8		
	C1-C12-N1-C10	-153,68	145,57	-130,4	137,4		
	C10-N1-C14-C15	85,81	-146,07	14,5	134,9		
	N1-C13-C14-C15	154,88	63,66	-171,5	179,6
C13-C14-C5-C6			-11,49	11,81	-17,8	5,7
	C12-C6-C5-C13			60,96	-62,70	70,2	49,1
	N1-C14-C13-C5			-3,55	-2,05	0,0	-1,9
	N1-C15-C16-C17			61,08	-69,68	180,0	160,5

1- Cambridge Structural Database; 2- Post *et al.*, 1975 ;

* A e B : diferentes confômeros gerados pela assimetria dos grupos metilenos.

Comparando as medidas das distâncias interatômicas e ângulos de ligação bem como dos ângulos diedros observados nos confôrmeros de menor energia mínima, tanto em meio gasoso como em meio aquoso, os dois métodos semi-empíricos mostraram boa relação com os dados cristalográficos oriundos da literatura (Tabelas 4a-c e 5a-c). No entanto, serão analisados os confôrmeros de menor energia obtidos em meio aquoso com a finalidade de melhor simular o meio biológico. A molécula da **CQ.2H⁺** foi mostrada apenas nas primeiras tabelas (Tabelas 4a, 4b e 4c) em virtude do confôrmero de menor energia ser mesmo nos dois meios aquoso e gasoso.

A planaridade do anel quinolínic dado, por exemplo, pelo ângulo diedro C₉C₁₀C₄N₂, mostra-se próxima entre os dois métodos bem como ao dado cristalográfico (-177,69° AM1, -174,83° PM3 e 177,2° raios-X). Entretanto, nas ligações contendo átomo de nitrogênio, é possível verificar maior proximidade de valores do método AM1 quando comparado ao resultado cristalográfico, como por exemplo N₁C₂C₃ (122,14° AM1, 120,86° PM3 e 122,6° raios-X) ou ainda C₉C₄C₃N₂ (-177,69° AM1, -174,83° PM3 e 177,2° raios-X). Diferença é verificada para o ângulo diedro referente a cadeia lateral N₂C₁₂C₁₃C₁₄ (-161,44° AM1, 172,96° PM3 e -65,0° raios-X) da **CQ.2H⁺** calculada e aquela obtida por cristalografia. Isto pode ser devido as diferentes parametrizações de ambos os métodos e no caso experimental, a proximidade das estruturas presentes em uma mesma unidade de célula, o que pode proporcionar diferenças na conformação da cadeia lateral do arranjo cristalográfico.

Para as medidas de distância e ângulos de ligação da **CPZ.H⁺**, verifica-se maior proximidade das ligações contendo o átomo de enxofre para os resultados obtidos por PM3 quando comparado aos dados cristalográficos. Isto pode ser visto nas medidas C₁₁S₅ (1,69 Å AM1, 1,75 Å PM3 e 1,75 Å raios-X) e C₁₁S₅C₁₃ (102,37° AM1, 99,59° PM3 e 97,3° raios-X) e pode estar relacionado aos orbitais do tipo d, presentes no átomo de enxofre, o qual é melhor parametrizado pelo método PM3 (Stewart, 1990). Nas demais medidas, os valores de AM1 e PM3 estão próximos, como por exemplo em C₁₂N₁C₁₀ (AM1 120,68°, 113,87° PM3, 118,4° raios-X).

Em análise comparativa para o sistema iminodibenzílico, duas formas cristalográficas (A e B) relativas à assimetria proporcionada pelos grupos metilenos ligados ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral, são reportadas para o cloridrato de

imipramina (Post *et al.*, 1975). Considerando os confôrmeros de menor energia mínima da espécie monoprotonada da imipramina, obtidos tanto por AM1 quanto por PM3, observam-se semelhanças com as estruturas cristalográficas. Maior semelhança à forma B é observada quanto ao ângulo de ligação $C_{11}N_1C_{13}$ ($115,8^\circ$), e não à forma A ($120,8^\circ$), no confôrmero calculado pelo método AM1 ($115,86^\circ$). O método PM3 forneceu para este ângulo o valor de $113,2318^\circ$. Da forma semelhante aos demais compostos analisados, nas medidas contendo átomo de nitrogênio, o AM1 apresenta maior semelhança com os dados cristalográficos como pode ser visto na medida do ângulo $C_{10}C_{11}N_1$ ($120,04^\circ$ AM1; $117,73^\circ$ PM3; $120,8^\circ$ raios-X).

Ressalta-se que a análise de ângulos diedros permite uma idéia da geometria dos anéis heteroaromáticos em estudo. É possível verificar a planaridade do anel quinolínico da **CQ.2H⁺** ($C_9C_{10}C_{14}N_2 = -177,69^\circ$) em relação aos anéis dos demais compostos como por exemplo, do fenotiazínico **CPZ.H⁺** ($C_{13}S_5C_{11}C_4 = -161,70^\circ$ e $C_1C_{12}N_1C_{10} = -153,68^\circ$) e do iminodibenzílico **IMP.H⁺** ($C_{12}C_6C_5C_{14} = 60,96^\circ$ e $N_1C_{14}C_{13}C_5 = -3,55^\circ$). Vale dizer que a planaridade (**CQ**), bem como a curvatura (**DSP** e **CPZ**), observadas, podem representar fatores importantes e, possivelmente, ser diferencial na interação com o grupo heme, uma vez que a planaridade do anel quinolínico favoreceria a interação do tipo π (Egan, 2001, 2006; Kumar *et al.*, 2007) e, de maneira oposta, a curvatura dos anéis fenotiazínico e iminodibenzílico prejudicaria interação deste tipo.

Além disso, na análise dos ângulos diedros é possível verificar a conformação das cadeias laterais, como por exemplo, para a **CQ.2H⁺** $N_2C_{10}C_{12}C_{13}$ ($-161,44^\circ$) e **IMP.H⁺** $N_1C_{15}C_{16}C_{17}$ ($61,08^\circ$) no qual a cadeia lateral encontra-se mais curvada do que a **CPZ.H⁺** $N_1C_{14}C_{15}C_{16}$ ($154,88^\circ$), de cadeia lateral estendida. Para a **CQ.2H⁺**, a conformação estendida pode estar relacionada com o tamanho maior da cadeia lateral e a repulsão entre as cargas positivas presentes em N_1 e N_3 .

A molécula de **CPZ.H⁺** foi também submetida a cálculo de carga de ponto único, inicialmente por método semi-empírico AM1 e em seguida, por método *ab initio* com grupo de base 3-21G*. Os resultados foram comparados aos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 e aos dados cristalográficos. Nos resultados obtidos observa-se maior semelhança entre o método AM1 e aquele obtido por cálculo 3-21G* nas medidas

contendo átomo de nitrogênio, como pode ser visto em N_1C_{12} (1,41 AM1; 1,48 PM3; 1,42 3-21G*; 1,40 raios-X), $C_{12}N_1C_{10}$ (120,68 AM1; 113,87 PM3; 123,75 3-21G*; 118,4 raios-X) e $C_1C_{12}N_1C_{10}$ (-153,68 AM1; 145,57 PM3; -154,64 3-21G*; -130,4 raios-X). No entanto, nas medidas contendo átomo de enxofre verifica-se maior semelhança com o método PM3: $C_{11}S_5$ (1,69 AM1; 1,75 PM3; 1,78 3-21G; 1,75 raios-X), $C_{11}S_5C_{13}$ (102,37° AM1; 99,59° PM3; 101,26° 3-21G; 97,3° raios-X) e $C_{13}S_5C_{11}C_4$ (161,79° AM1; -155,01° PM3; 161,20° 3-21G; 143,9° raios-X). Pode-se verificar que, com exceção das medidas contendo átomo de enxofre, a maioria das medidas calculadas por AM1 e 3-21G* coincidem e estas se mostram mais próximas dos dados obtidos por cristalografia (Tabela 6).

Tabela 6 - Medidas geométricas do confôrmeros de menor energia mínima calculados nos meios gasoso e aquoso por método *ab initio* em função de base 3-21G* para a espécie monoprotonada da **CPZ.H⁺** comparada as medidas correspondentes obtidas pelos métodos AM1, PM3 e cristalografia de raios-X.

Distância interatômica					
	AM1	PM3	3-21G*	Raios-X [†]	
N1-C12	1,41	1,48	1,42	1,40	
C11-C12	1,42	1,40	1,41	1,40	
C11-S5	1,69	1,75	1,78	1,75	
C13-S5	1,69	1,75	1,78	1,75	
C13-C5	1,41	1,41	1,40	1,43	
N1-C14	1,43	1,52	1,48	1,51	
C14-C15	1,54	1,53	1,54	1,53	
C15-C16	1,52	1,52	1,52	1,55	
Ângulo de ligação					
C2-C3-C4	118,75	119,23	119,32	117,0	
C11-S5-C13	102,37	99,59	101,26	97,3	
C12-N1-C10	120,68	113,87	123,75	118,4	
N1-C14-C15	115,63	111,27	109,97	109,7	
C14-C15-C16	108,65	113,02	111,03	109,3	
Ângulo diedro					
				A	B
C13-S5-C11-C4	161,79	-155,01	161,20	143,9	-146,1
S5-C11-C12-N1	-1,33	3,30	2,76	-3,3	-1,8
C1-C12-N1-C10	-153,68	145,57	-154,64	-130,4	137,4
C10-N1-C14-C15	85,81	-146,07	-79,71	14,5	134,9
N1-C13-C14-C15	154,88	63,66	179,08	-171,5	179,6
Cambridge Structural Database.					

As geometrias dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies **CQ.2H⁺**, **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺** calculados por método AM1 podem ser visualizadas na Figura 9 (meio gasoso) e 10 (meio aquoso).

Figura 9: Confôrmeros de menor energia mínima em meio gasoso da **CQ.2H⁺**, **DSP.H⁺** e **CPZ.H⁺**, no modelo tubo calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Figura 10: Confôrmeros de menor energia mínima em meio aquoso da **CQ.2H⁺**, **DSP.H⁺** e **CPZ.H⁺**, no modelo tubo calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Nas figuras 9 e 10 é possível notar o comportamento da cadeia lateral dobrada dos confôrmeros de menor energia da **CPZ.H⁺** e **IMP.H⁺** em meio gasoso, devido a ausência de interações em meio aquoso, as quais poderiam interagir com o nitrogênio protonado da cadeia lateral estabilizando-o. Em meio aquoso, a cadeia lateral encontra-se estendida para a **CPZ.H⁺**, no entanto para a **IMP.H⁺** a cadeia lateral apesar de menos dobrada que a cadeia da **CPZ.H⁺**, também não se encontra completamente

estendida. Provavelmente isto se deve a flexibilidade dos grupos metilenos do anel iminodibenzílico da **IMP.H⁺**, que permite uma maior aproximação da cadeia lateral. A cadeia lateral da **CQ.2H⁺** mantém-se estendida devido a protonação de dois pontos extremos da molécula (anel quinolínic e cadeia lateral), promovendo o afastamento (repulsão) desta duas regiões.

Esta maior semelhança do método AM1 está de acordo com resultados prévios reportados na literatura, no qual o AM1 é selecionado por reproduzir dados cristalográficos e, assim, empregado para calcular parâmetros físico-químicos e superfícies estereo-eletrônicas de compostos quinolínicos (Bhattacharjee *et al.*, 1996; 1998; Menezes *et al.*, 2002b, Portela *et al.*, 2004, Araujo *et al.*, 2007). Desta forma, o método AM1 foi escolhido para o cálculo das demais moléculas por proporcionar resultados comparáveis aos dados cristalográficos para os três sistemas heterocíclicos em estudo.

Com relação às espécies neutras dos compostos em estudo, estas mostraram, da mesma forma que as espécies protonadas antes analisadas, semelhanças entre os dois métodos AM1 e PM3, bem como entre os meios gasoso e aquoso. Suas medidas não foram comparadas aos resultados de raios-X por considerar que as espécies protonadas corresponderiam melhor à descrição dos compostos cristalográficos, os quais se encontram como sais, como mencionado anteriormente.

Na análise das propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima dos compostos da **Série 1** verificam-se valores próximos entre a variação de entalpia, EHOMO, ELUMO, momento de dipolo e volume molecular dos confôrmeros gerados em vácuo (Tabela 7) com aqueles calculados em meio aquoso (Tabela 8). A proximidade entre os resultados nos dois meios corroborou a análise dos resultados das medidas geométricas para a seleção dos últimos para este estudo por permitir melhor relação ao meio biológico e aos métodos experimentais realizados.

A seguir, serão analisados e comparados com a **CQ**, os confôrmeros de menor energia mínima em meio aquoso dos **AMR** fenotiazínicos e iminodibenzílicos que compõem a **Série 1**. A **CFN** será analisada posteriormente em virtude de diferir estruturalmente dos demais componentes desta série bem como ser considerado como verdadeiro **AMR**.

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima de compostos da **Série 1**, calculados em meio gasoso por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	Distância (Å)
CQ.2H ⁺	180,5511	-14,632	-6,710	—	355,13	N ₃ ,N ₁ =10,02
CQ.H ⁺	141,7451	-11,770	-3,431	—	350,78	N ₃ ,N ₁ =5,90
CQ		-8,637	-0,501	3,764	348,47	N ₃ ,N ₁ =9,24
CPZ.H ⁺		-11,161	-3,353	---	322,13	N ₂ ,N ₁ =3,12
CPZ	144,5843	-7,568	0,309	1,641	319,08	N ₂ ,C ₂ =5,40 N ₂ ,N ₁ =5,06 N ₂ ,C ₂ =6,52
TFP.2H ⁺		-14,594	-7,296	---	398,37	N ₃ ,N ₁ =4,26
TFP.H ⁺	229,7883	-9,838	-3,524	---	396,31	N ₃ ,C ₂ =6,06 N ₃ ,N ₁ =6,34
TFP	143,4567	-7,788	-0,644	3,345	394,60	N ₃ ,C ₂ =4,80 N ₃ ,N ₁ =6,30 N ₃ ,C ₂ =7,21
FFN.2H ⁺		-14,329	-7,145	---	424,24	N ₂ ,N ₁ =2,82
FFN.H ⁺	226,6823	-9,796	-3,358	---	421,92	N ₃ ,N ₁ =4,35 N ₂ ,N ₁ =4,56
FFN	140,8030	-8,074	-0,711	3,300	421,72	N ₃ ,N ₁ =6,28 N ₂ ,N ₁ =5,07 N ₃ ,N ₁ =6,29
LVM.H ⁺		-10,927	-3,178	---	354,12	N ₂ ,N ₁ =3,08
LVM	139,1867	-7,566	-0,049	1,436	351,10	N ₂ ,N ₁ =4,60
FNT.H ⁺		-10,921	-3,044	---	351,06	N ₂ ,N ₁ =3,12
FNT	138,5262	-7,4193	-0,074	1,788	347,77	N ₂ ,N ₁ =5,07
IMP.H ⁺		-11,667	-3,364	---	325,38	N ₂ ,N ₁ =2,96
IMP	141,9296	-8,342	0,384	0,584	323,73	N ₂ ,N ₁ =5,02
DSP.H ⁺		-11,710	-3,434	---	306,03	N ₂ ,N ₁ =2,90
DSP	141,4470	-8,378	0,380	0,921	304,36	N ₂ ,N ₁ =5,01
DBZ.H ⁺		-11,633	-3,588	---	381,20	N ₂ ,C ₁₁ =4,07
DBZ	141,9893	-8,864	0,342	1,019	379,18	N ₂ ,C ₁₁ =3,79
CFN.H ⁺		-12,073	-3,108	---	296,74	N ₂ ,N ₁ =2,81
CFN	142,2927	-9,044	-0,059	2,937	295,72	N ₂ ,N ₁ =5,41

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular.

Tabela 8 - Propriedades físico-químicas dos confômeros de menor energia mínima de compostos da **Série 1**, calculados em meio solvatado por método semi-empírico AM1 e valores de coeficiente de partição calculado.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	CLog P	Distância (Å)
CQ.2H ⁺	177,3891	-14,632	-6,710	---	355,13		N ₃ ,N ₁ =10,02
CQ.H ⁺	144,9104	-11,77	-3,431	---	351,24		N ₃ ,N ₁ =6,18
CQ		-8,637	-0,505	3,765	350,42	3,73	N ₃ ,N ₁ =9,24
CPZ.H ⁺	153,8136	-9,783	-4,118	---	322,23		N ₂ ,N ₁ =5,00
CPZ		-7,568	0,309	1,641	319,08	3,62	N ₂ ,C ₈ =5,99
							N ₂ ,N ₁ =5,06
							N ₂ ,C ₈ =6,52
TFP.2H ⁺	232,7875	-14,012	-7,409	---	400,03		N ₃ ,N ₁ =3,29
TFP.H ⁺	145,0884	-11,193	-3,368	---	395,39		N ₃ ,C ₈ =5,57
TFP		-7,788	-0,644	3,345	394,60	3,74	N ₃ ,N ₁ =4,20
							N ₃ ,C ₈ =6,13
							N ₃ ,N ₁ =6,30
							N ₃ ,C ₈ =7,21
FFN.2H ⁺	224,1431	-13,913	-7,042	---	425,93		N ₂ ,N ₁ =3,45
FFN.H ⁺	148,9106	-10,883	-3,246	---	421,36		N ₁ ,N ₃ =6,43
FFN		-8,061	-0,693	4,553	421,62	3,22	N ₂ ,N ₁ =3,44
							N ₁ ,N ₃ =4,36
							N ₂ ,N ₁ =5,07
							N ₁ ,N ₃ =6,94
LVM.H ⁺	147,7896	-9,953	-3,732	---	354,92		N ₂ ,N ₁ =4,33
LVM		-7,566	-0,490	1,436	351,10	3,33	N ₂ ,N ₁ =4,60
FNT.H ⁺	148,2691	-10,580	-3,189	---	352,20		N ₂ ,N ₁ =5,04
FNT		-7,419	-0,063	1,788	347,77	3,79	N ₂ ,N ₁ =5,07
IMP.H ⁺	147,6022	-10,968	-3,833	---	326,83		N ₂ ,N ₁ =4,38
IMP		-8,342	0,384	0,584	323,73	3,98	N ₂ ,N ₁ =5,03
DSP.H ⁺	148,2520	-11,005	-3,918	---	307,52		N ₂ ,N ₁ =4,34
DSP		-8,378	0,378	0,921	304,36	3,60	N ₂ ,N ₁ =5,01
DBZ.H ⁺	142,0662	-11,527	-3,702	---	381,97		N ₂ ,C ₉ =3,91
DBZ		-8,864	0,342	1,019	379,18	4,93	N ₂ ,C ₉ =3,79
CFN.H ⁺	147,9479	-11,891	-3,164	---	296,70		N ₁ ,N ₂ =2,80
CFN		-9,044	-0,058	2,927	295,72	3,60	N ₃ ,C ₇ =7,44
							N ₂ ,N ₁ =5,41
							N ₂ ,C ₇ =6,37

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular, CLog P: Coeficiente de partição calculado (Ghose *et al.*, 1987).

As diferenças de variação de entalpia entre as formas monoprotonada e neutra observadas para os confômeros de menor energia mínima calculados por AM1 em meio aquoso (Tabela 8) podem ser relacionadas à capacidade dos compostos de se ionizarem. Assim, quanto menor a diferença entre o valor energético da forma protonada e neutra, maior será a facilidade dos compostos sofrerem ionização.

Os valores de variação de entalpia dos compostos estudados mostram-se próximos ao valor calculado para a **CQ**. Verifica-se que em meio solvatado apenas o derivado **DBZ.H⁺** (142,0662 kcal/mol) apresenta valor inferior ao da **CQ.H⁺** (144,9104 kcal/mol). Os demais compostos apresentam valores maiores como visto para a **TFP.H⁺** (145,0884 kcal/mol), **DSP** (148,2520 kcal/mol) e **CPZ.H⁺** (153,8136 kcal/mol). Estes valores podem ser relacionados à maior ou menor facilidade de aproximação das cadeias laterais da espécie protonada ao anel heterocíclico. Por exemplo, o derivado **DBZ.H⁺**, com menor valor de entalpia que a **CQ.H⁺**, apresenta distância entre N₁ e N₂, no estado monoprotonado, de 3,91 Å, bem menor que a distância entre N₁ e N₃ encontrada para **CQ.H⁺** (6,18 Å). De forma geral, valores de distâncias próximas entre si são observadas: a **TFP.H⁺** (4,20 Å) mostra a menor distância seguida pela **DSP.H⁺** (4,34 Å), **CPZ.H⁺** (5,00 Å). Isto indica que o valor de entalpia é menor quando a distância entre a cadeia lateral e o anel diminui. No entanto, para alguns compostos, este raciocínio não pode ser aplicado, como por exemplo, para o derivado **FNT.H⁺** com distância N₁N₂ igual a 5,04 Å, muito próximo à distância N₁N₂ para a **CPZ.H⁺** (5,00 Å), apesar do menor valor da variação de entalpia para o **FNT.H⁺** (148,2691 kcal/mol) quando comparado à **CPZ.H⁺** (153,8136 kcal/mol), respectivamente. Neste as distâncias similares dos dois compostos e a menor variação de entalpia do derivado **FNT.H⁺** pode estar relacionado à presença do anel piperidínico na cadeia lateral dificultando a aproximação do nitrogênio protonado ao anel fenotiazínico. No caso do derivado **DBZ.H⁺**, o valor de entalpia menor que os demais citados pode também estar associado à presença da dupla ligação na cadeia lateral que, por efeito de ressonância, estabiliza a carga positiva assumida pelo átomo de nitrogênio (N₂).

Comparando as constantes de ionização dos compostos, **TFP** (pKa = 9,6), **CPZ** (pKa = 9,9), **IMP** (pKa = 9,5) e **DSP** (pKa = 10,2) com os seus respectivos valores de variação de entalpia, **TFP.H⁺** (145,0884 kcal/mol), **CPZ.H⁺** (153,8136 kcal/mol), **IMP.H⁺** (147,6022 kcal/mol) e **DSP.H⁺** (148,2520 kcal/mol), verifica-se que, para compostos estruturalmente relacionados, com o aumento do pKa ocorre também o aumento da energia de entalpia, ou, quanto menor o valor da constante de dissociação dos compostos, maior a variação de entalpia destes. Este raciocínio também se verifica

para a **CQ.H⁺** (energia de entalpia = 144,9104 kcal/mol; pKa = 8,4) e **CQ.2H⁺** (energia de entalpia = 177,3891 kcal/mol; pKa = 10,8).

Os valores de energia molecular EHOMO e de ELUMO da **CQ** diminuem com a monoproteção da molécula passando a EHOMO de -8,637 para -11,770 eV e ELUMO de -0,505 para -3,431 eV. Comportamento semelhante é observado para os demais compostos pelo fato de a protonação diminuir a capacidade doadora de elétrons da molécula, com diminuição da EHOMO. Concomitantemente, a oxidação aumenta a necessidade eletrônica da espécie protonada, com diminuição do valor de ELUMO. **DBZ** (-8,864 eV) é o único composto da **Série 1** que apresenta valor de EHOMO, no estado neutro pouco menor que a **CQ** (-8,637 eV). Os demais compostos monoprotecionados desta série apresentam valores mais elevados quando comparados a **CQ.H⁺** (11,770 eV): **CPZ.H⁺** (-9,783 eV), **TFP.H⁺** (-11,193 eV), **FFN.H⁺** (-10,883 eV), **IMP.H⁺** (-10,968 eV) e **DSP.H⁺** (-11,005 eV).

É importante considerar que compostos fenotiazínicos apresentam maiores valores de EHOMO que os demais compostos da série, o que está de acordo com estudo eletroanalítico realizado em colaboração com o Prof. Dr. Mauro A. La-Scalea (UNIFESP-Campus Diadema). Neste estudo a **CPZ** mostrou-se mais eletroativa, apresentando os menores valores de potencial de oxidação, 0,78 e 0,66 V, seguida da **DSP**, 1,04 e 0,87 V e **CQ** 1,24 e 0,98 V, nos pH 5,5 e 7,4, respectivamente. Estes resultados concordam com os maiores valores de energia molecular de HOMO (EHOMO), sugerindo maior facilidade da **CPZ** (EHOMO = - 7,568 eV e monoprotecionada = -9,783 eV) e **DSP** (EHOMO = - 8,378 eV e monoprotecionada = -11,005 eV), quando comparados à **CQ** (EHOMO monoprotecionada = - 11,770 eV e diprotecionada = -14,632 eV), em doar ou perder elétrons.

Valores de EHOMO superiores mostram a maior capacidade dos compostos em estudo doarem elétrons nas suas regiões mais ricas, região heterocíclica, em comparação à **CQ** e podem estar relacionados à pequena variação da distância entre os átomos de nitrogênio da cadeia lateral e do anel (é isto?), das espécies neutras, por exemplo, a **CPZ**, 5,06 Å e monoprotecionado, **CPZ.H⁺**=5,00 Å, o **FNT**, 5,07 Å e monoprotecionado, **FNT.H⁺**=5,04 Å, a **DSP**, 5,01 Å e monoprotecionado, **DSP.H⁺**=4,34 Å, ou

a **IMP**, 5,03 Å e monoprotonado, **IMP.H⁺**=4,38 Å deixando os elétrons mais disponíveis para doação.

Os menores valores voltamétricos e de ELUMO da CPZ devem-se, provavelmente, à presença do átomo de enxofre com maior capacidade de abrigar elétrons dada a presença de orbitais do tipo d. Os menores valores, porém, da **CPZ.H⁺**, **TFP.H⁺** e **FFN.H⁺** quando comparados ao **FNT.H⁺**, pode ser devido à presença de grupos retiradores de elétrons nos correspondentes anéis, cloro (Cl) e trifluometil (CF₃).

Com relação aos valores de ELUMO apresentam valores menores que a **CQ** (-0,505) no estado neutro, a **TFP** (-0,644 eV) e **FNT** (-0,062 eV) apresentam valores menores que os da na forma neutra. Com a protonação, valores menores que a **CQ.H⁺** (-3,431 eV) são encontrados para a **CPZ.H⁺** (-4,118 eV), **DSP.H⁺** (-3,918 eV), **LVM.H⁺** (-3,732 eV), **DBZ.H⁺** (-3,702 eV). Isto indica a maior facilidade destes compostos em receber elétrons nas regiões de menor densidade eletrônica. Valores menores de ELUMO pode ser visto também para os compostos **TFP.H⁺** (-3,37 eV), **FFN.H⁺** (-3,25 eV) e **FNT.H⁺** (-3,19 eV), quando comparados a **CQ.H⁺** (-3,431 eV) o que pode ser associado à presença comum de anel piperazínico na cadeia lateral e a contribuição eletrônica do segundo átomo de nitrogênio, não protonado, do anel.

Todos estes compostos monoprotonados, **FNT.H⁺** (N₂,N₁=5,04 Å), **CPZ.H⁺** (N₂,N₁=5,00 Å), **DSP.H⁺** (N₂,N₁=4,34 Å), **FFN.H⁺** (N₁,N₃=4,36 Å), **LVM.H⁺** (N₂,N₁=4,33 Å) e **DBZ.H⁺** (N₂,C₉=3,91 Å) apresentam menores distâncias entre a cadeia lateral e o anel que a **CQ** monoprotonada (N₃,N₁=6,18 Å). Entre a **IMP.H⁺** (EHOMO = -10,968 eV; ELUMO = -3,833 eV) e **DSP.H⁺** (EHOMO = -11,005 eV; ELUMO = -3,918 eV), observam-se valores de EHOMO e de ELUMO maiores para a primeira, **IMP.H⁺**, dado pela presença do grupo metil adicional. A presença deste grupo contribuiu para maior estabilidade da espécie protonada e desta forma, maior valor de ELUMO, diminuindo também a necessidade do átomo de nitrogênio protonado em buscar o anel iminodibenzílico para estabilizar-se, contribuindo para o maior valor de EHOMO.

É importante comentar que a **DSP** mostrou-se mais ativa que a **IMP** em isolados brasileiros de *P. falciparum*. Estes compostos serão comentados mais uma vez na análise da **Série 2**. De forma geral, os valores destas energias moleculares orbitales

serão novamente analisados quando forem mostrados os mapas orbitais de HOMO e de LUMO.

Atenção maior tem sido dada à espécie diprotonada da cloroquina (**CQ.2H⁺**), já que, provavelmente, esta é a forma encontrada no interior do vacúolo digestivo de pH em torno de 5,5 (Yayon, 1985; Saliba *et al.*, 2003; Bray *et al.*, 2005a). Nesta, a diprotonação diminui ainda mais os valores de EHOMO (de -11,770 para -14,632 eV) e de ELUMO (de -3,431 para -6,710 eV). Assim como acontece para a **CQ.2H⁺**, com a diprotonação do átomo de nitrogênio do anel piperazínico da trifluoperazina e flufenazina ocorre diminuição do valor de ELUMO, de -3,368 eV (**TFP.H⁺**) para -7,409 eV (**TFP.2H⁺**) e de -3,246 eV (**FFN.H⁺**) para -7,042 eV (**FFN.2H⁺**), possivelmente devido a esta protonação adicional no átomo de nitrogênio N₂ da cadeia lateral, bem como diminuição do valor de EHOMO de -11,193 eV (**TFP.H⁺**) para -14,012 eV (**TFP.2H⁺**) e de -10,883 eV (**FFN.H⁺**) para -13,913 eV (**FFN.2H⁺**), provavelmente devido a maior aproximação desta cadeia lateral diprotonada em direção ao anel fenotiazínico (N₃,N₁=3,29; N₃,C₈=5,57 Å. **TFP.2H⁺**) e (N₃,N₁=6,43; N₃,C₈=3,45 Å **FFN.2H⁺**).

Considerando as espécies neutras dos compostos, os maiores valores de momento de dipolo (Tabela 8) são vistos para a **CQ** (3,765 Debye), **TFP** (3,345 Debye) e **FFN** (4,553 Debye), os dois últimos compostos tendo em comum grupo substituinte CF₃ e cadeia lateral com anel piperazínico. Estes compostos mostram o deslocamento da nuvem eletrônica em direção ao grupo retirador de elétrons, tornando estas regiões nos anéis mais propícias a doarem elétrons, quando comparadas a outras regiões das moléculas. Valores de momento de dipolo menores são apresentados para os demais compostos, provavelmente devido à falta de grupo substituinte desta natureza eletrônica no anel heterocíclico. Tais compostos apresentam distribuição eletrônica mais uniforme sobre o anel.

Considerando as espécies neutras dos compostos estudados (Tabela 8), a faixa de valores de volume molecular encontra-se variável ao valor observado da **CQ** (350,42 Å³). O menor valor é observado para a **DSP** (304,36 Å³), que apresenta maior simplicidade estrutural quando comparado aos demais compostos, enquanto maior valor é registrado para a **FFN** (421,62 Å³), que possui em adição ao átomo de enxofre

no anel tricíclico, grupo substituinte CF_3 e anel piperazínico substituído por grupo hidroxietil na cadeia lateral.

É possível verificar nos modelos tubo (Figura 11) e CPK (Figura 12), maior volume do grupo trifluometil presente na **FFN** e **TFP** quando comparado ao átomo de cloro presente na **CQ** e **CPZ**. Os derivados **DBZ** ($379,18 \text{ \AA}^3$) e **FNT** ($366,12 \text{ \AA}^3$) apesar de não conterem halogênio, apresentam anel piperazínico na cadeia lateral e, no caso da **DBZ**, dupla ligação, possuindo volumes moleculares maiores que estes compostos contendo heteroátomo e inferiores a **TFP** ou **FFN**. Aumento de volume molecular é observado com a protonação dos compostos.

Figura 11 - Representação dos confôrmers de menor energia mínima (sistema solvatado) das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 1**, no modelo tubo, calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Figura 12 - Representação dos confôrmeros de menor energia mínima (sistema solvatado) das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 1**, no modelo CPK, calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

O estudo do volume molecular é realizado por saber-se que quanto maior o volume dos **AMR** maior é a atividade moduladora destes compostos ao se ligarem à proteína PfCRT, impedindo o efluxo da **CQ** do seu local de ação (vacúolo digestivo) (Bray *et al.*, 2005). Porém, não se conhece um valor limite que melhor expresse esta relação entre volume molecular e atividade moduladora da resistência. Ademais, é possível que compostos muito volumosos possam prejudicar a interação do tipo π com a hematina ou com o dímero μ -oxo, desfavorecendo a atividade antimalárica, conforme supõem determinados autores (Kalkanidis *et al.*, 2002).

Os valores de lipofilicidade calculada (CLog P) dos compostos da **Série 1** mostram-se, na sua maioria, próximos ao valor da **CQ** (Tabela 8). No estado neutro, este valor é de 3,73, que pode ser considerado próximo ao experimental de 4,63 (Craig, 1990). Da mesma forma, valor de CLog P próximo é encontrado para **DSP** (3,62) quando comparado ao seu valor experimental, 4,09. No entanto, esta diferença é maior para a **CPZ**, experimental igual a 5,20 e **LVM**, experimental igual a 4,64, (Craig, 1990) com valores de CLog P igual a 3,62 e 3,33, respectivamente. O mais alto valor de CLog

P é observado para o **DBZ** (4,94), o que poder ser relacionado à maior rigidez estrutural da molécula, dotada de anel piperazínico e de dupla ligação na cadeia lateral. A lipofilicidade é uma propriedade importante a ser estudada uma vez que pode influenciar na interação π - π com a hematina, que é essencialmente hidrofóbica.

A **CFN** apresenta valor de entalpia menor (147,9479 kcal/mol) quando comparado a **CQ.2H⁺** (177,3893 kcal/mol), forma encontrada no vacúolo digestivo, e próximo aos demais compostos desta série. A distância entre o átomo de N protonado (N_2) e o átomo de N (N_1) do anel piridínico é muito menor para a **CFN.H⁺** (2,80 Å) quando comparado a **CQ.2H⁺** (10,02 Å) o que provavelmente está relacionado à sua estrutura química distinta dos demais compostos, em que não se observa a presença de anéis aromáticos fundidos. Pode-se verificar o maior valor de pKa também para a **CFN** (9,1, **CQ** = 8,1) o que se associa com o maior valor de variação de entalpia **CFN.H⁺** - **CFN** (147,9479 kcal/mol) em relação a **CQ.H⁺** - **CQ** (144,9104 kcal/mol). A espécie monoprotônica apresenta valor de EHOMO (-11,891 eV) maior que o valor da **CQ.2H⁺** (-14,632 eV) dado pela maior aproximação entre a cadeia lateral e o anel de forma a estabilizar a carga positiva do átomo de N_2 , o que reflete em valor de ELUMO maior para a **CFN.H⁺** (-3,164 eV), comparado a **CQ.2H⁺** (-6,710 eV). Esta diferença pode ser mais bem percebida quando em kcal/mol, em que a **CFN.H⁺** possui EHOMO igual a -274,206 e ELUMO igual a -72,962 kcal/mol, valores respectivamente maior e menor do que os da **CQ.2H⁺** (-337,414 e -154,733 kcal/mol). Volume molecular inferior (295,72 Å³) ao da cloroquina (351,24 Å³) pode ser associado à ausência do anel fundido da primeira enquanto valores de lipofilicidade próximos são observados entre ambos os compostos (**CFN** = 3,60; **CQ** = 3,62). Tais características podem explicar ser este o único **AMR** a ser empregado na terapia.

B) Superfícies eletrônicas

No mapa de potencial eletrostático (MEP) da forma neutra da **CQ** observa-se maior distribuição eletrônica sobre o anel quinolínico o que é caracterizado pela maior intensidade de cores vermelho-alaranjada nesta região da molécula (Figuras 13 e 14). Destaca-se ainda a maior densidade eletrônica (vermelho intenso) sobre as regiões do anel quinolínico próximo ao N_1 e N_2 seguida por aquela sobre o átomo de cloro. Na

cadeia lateral, que se encontra estendida, observa-se maior densidade eletrônica na região próxima ao nitrogênio terciário (N_3), em razão do par de elétrons livres deste átomo. Na forma monoprotionada correspondente ($CQ.H^+$), a cadeia lateral se dobra em direção ao átomo de nitrogênio secundário (N_2). Esta observação pode ser verificada pela sensível diminuição da distância interatômica N_2-N_3 como também N_1-N_3 (Tabela 8) quando comparadas à forma neutra. O par de elétrons livres do N_2 é responsável por estabilizar a carga positiva do próton, o que provoca o dobramento da cadeia lateral em sua direção.

Figura 13 - Mapas de potencial eletrostático dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies neutras de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso, por método semi-empírico AM1, na faixa de -30 kcal/mol (vermelho intenso) a 25 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³.

Figura 14 - Mapas de potencial eletrostático dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, na faixa de 10 kcal/mol (vermelho intenso) a 130 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³.

No MEP da forma monoprotonada (Figura 14), se observa deslocamento da densidade eletrônica do anel quinolínico a favor da região do N₂ em busca de diminuir a perda eletrônica sofrida por este átomo. Isto se caracteriza pela diminuição da intensidade de cor vermelha ou vermelho-alaranjada na região sobre os átomos de N₁ e Cl, quando comparada à respectiva forma neutra. No caso da **CQ.2H⁺**, forma encontrada no vacúolo digestivo, a protonação no átomo de N do anel quinolínico diminui adicionalmente a densidade eletrônica sobre o anel quinolínico (Figura 15).

A **CFN** apresenta maior densidade eletrônica sobre o anel piridínico, bem como sobre o átomo de nitrogênio da cadeia lateral (Figura 13). Com a protonação (**CFN.H⁺**), a cadeia lateral antes estendida dobra-se em direção ao anel piridínico, diminuindo sua densidade eletrônica como pode ser visualizado na figura de MEP (Figura 14).

Figure 15 - Confômero de menor energia mínima da **CQ.2H⁺** na fase aquosa. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 75 kcal/mol (vermelho intenso) a 170 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja) e hidrogênio (branco).

Assim como acontece na **CQ**, maior densidade eletrônica é encontrada sobre o anel tricíclico dos compostos fenotiazínicos e iminidobenzílicos em estado neutro (Figura 13). Entretanto, apesar de o átomo de nitrogênio do anel tricíclico ($N_1 = -0,46$ ua) dos compostos fenotiazínicos apresentar maior carga pontual do que o enxofre ($S = -0,04$ ua, para a **CPZ**), a distribuição orbitalar deste átomo no anel fenotiazínico promove considerável densidade eletrônica sobre esta região.

Naqueles compostos contendo grupo retirador de elétrons ligado ao anel, como o átomo de cloro na **CQ** e **CPZ**, o grupo trifluometila na **TFP** a nuvem eletrônica se estende em direção a estes substituintes, observando-se deslocamento no caso da **TFP**, característica que diminui a distribuição eletrônica total sobre o anel, como comentado anteriormente na análise do momento dipolo.

Outra região de alta densidade eletrônica é encontrada sobre o átomo de nitrogênio da cadeia lateral dos compostos fenotiazínicos (N_2 ou N_3) (Figura 13). Neste, porém, a densidade eletrônica diminui consideravelmente nas espécies monoprotonadas em decorrência da perda do par de elétrons livres do nitrogênio (Figura 14). Assim como acontece com a **CQ**, na tentativa de estabilizar a carga positiva, a cadeia lateral, que antes se encontrava estendida, se dobra em direção ao anel fenotiazínico diminuindo sua densidade eletrônica, como pode ser visualizado pela redução da intensidade da cor vermelha. A aproximação da cadeia lateral pode também

ser verificada com a diminuição das distâncias interatômicas envolvendo a cadeia lateral e o anel, conforme apresentado na Tabela 8 e visualizado na Figura 11.

Com relação à distribuição dos orbitais de HOMO, a **CQ** apresenta estes orbitais no anel quinolínico, nas diferentes formas neutra (Figura 16), monoprotionada (Figura 17) e diprotionada (Figura 15). Tais distribuições podem ser atribuídas à natureza aromática deste anel, composto por átomos de carbono e nitrogênio sp^2 . Igualmente, na espécie neutra, os orbitais de HOMO nos demais compostos estudados encontram-se distribuídos sobre o anel heterocíclico de todos os fenotiazínicos e da desipramina (Figura 16). Nas espécies monoprotionadas (Figura 17), estes orbitais se mantêm nos anéis, para todos os compostos analisados.

Figura 16 – Mapas de distribuição orbital de HOMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies neutras de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso por método AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Figura 17 - Mapas de distribuição orbital de HOMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso por método AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas

cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

A distribuição orbitalar de LUMO é também observada no anel quinolínico para os três estados de oxidação da **CQ**. Na forma neutra (Figura 18), isto se justifica em razão de ser este anel composto por átomos de carbono e nitrogênio sp^2 e assim a parte mais propensa da molécula a receber elétrons. Na espécie monoprotonada (Figura 19), a aproximação da cadeia lateral promoveria o deslocamento da nuvem eletrônica do anel quinolínico em direção ao nitrogênio N_2 , conforme já discutido na análise do MEP correspondente (Figura 14). Este deslocamento eletrônico, associado à característica aromática do anel, causaria a manutenção dos orbitais de LUMO no anel quinolínico. Na espécie diprotonada da **CQ** (Figura 15), a distribuição de LUMO sobre o anel também pode ser explicada em razão da protonação do N_1 , tornando esta região um centro de elevada deficiência eletrônica. Quanto aos orbitais de LUMO da forma neutra dos demais compostos, estes se apresentam distribuídos nos anéis tricíclicos enquanto, no estado monoprotonado (Figura 19), estes orbitais se deslocam para próximo do átomo de nitrogênio protonado da cadeia lateral. Somente o orbital de LUMO da **TFP** monoprotonada se mantém no anel, em região próxima ao grupo retirador de elétrons (CF_3), ao que se associa a maior aproximação da cadeia lateral.

Figura 18 – Mapas de distribuição orbitalar de LUMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies neutras de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Figura 19 – Mapas de distribuição orbitalar de LUMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 1**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), flúor (verde escuro), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Assim como acontece para a **CQ.2H⁺**, os compostos **FFN.2H⁺** e **TFP.2H⁺**, a diprotonação do segundo átomo de nitrogênio da anel pieprazínico (N₂ e N₃) conduz à diminuição da densidade eletrônica sobre esta região e aproximação da cadeia lateral em direção ao anel fenotiazínico com conseqüente diminuição da densidade eletrônica deste último. Isto pode ser observado por aumento do número de orbitais moleculares de LUMO sobre regiões próximas aos dois átomos de nitrogênio (N₂ e N₃) do anel piperazínico bem como diminuição da densidade eletrônica sobre o anel fenotiazínico, no qual a região de maior densidade encontra-se próxima ao grupo trifluometila, de ambos os compostos.

Na **CFN**, a presença de um grupo retirador de elétrons diretamente ligado ao anel benzênico, o átomo de cloro, faz com que a nuvem eletrônica se desloque em sua direção, o que diminui a distribuição eletrônica do anel ligado a este átomo. A cadeia lateral contendo o átomo de nitrogênio protonado (N₂) volta-se para o anel piridínico, na tentativa de se estabilizar. Assim, os orbitais de LUMO encontram-se sobre o anel contendo o átomo de cloro enquanto os orbitais de HOMO localizam-se sobre o outro anel, piridínico, de maior densidade eletrônica.

4.1.1.2. Compostos da **Série 2**

A **Série 2** é composta por fenotiazínicos e iminodibenzílicos apresentados nas Tabelas 2 e 3, oriundos dos trabalhos de Guan e colaboradores (2002), Bhattacharjee e colaboradores (2001; 2002), os quais tiveram suas atividades biológicas medidas como antimaláricos (IC_{50} e porcentagem de supressão) e como agentes moduladores da resistência (**AMR**) (RMI e porcentagem de supressão). Estes compostos diferem entre si quanto ao tamanho da cadeia lateral e grupos substituintes do nitrogênio amínico da cadeia lateral. A **Série 2** foi avaliada relacionando as características estruturais e eletrônicas às biológicas reportadas e foi incluída neste estudo pelo paralelismo observado entre as atividades antiplasmódica e moduladora da resistência. Da mesma forma que para a **Série 1**, o método semi-empírico AM1 foi utilizado em decorrência da validação do emprego deste método, como descrito anteriormente. Os compostos da **Série 2** foram igualmente calculados nas suas formas neutras e monoprotonadas (H^+).

A análise dos valores de variação de entalpia, EHOMO, ELUMO, momento de dipolo e volume molecular dos compostos da **Série 2** indica, assim como observado para a **Série 1**, semelhança entre os confôrmeros de menor energia mínima gerados em vácuo (Tabelas 7 e 9) e aqueles calculados em meio solvatado (Tabelas 8 e 10), tanto para as espécies neutras como para as protonadas. A diferença, em geral de 5 kcal/mol da variação de entalpia, é esperada uma vez que dois meios diferentes são considerados nos cálculos das propriedades. Considerando-se estas semelhanças e por este estudo procurar simular o meio biológico, selecionaram-se, de forma idêntica a análise da **Série 1**, os confôrmeros calculados em meio solvatado para se conduzir a discussão.

Tabela 9 - Propriedades físico-químicas dos confômeros de menor energia mínima dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos (Tabela 2), calculados em meio gasoso por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	CLog P	Distância (Å)
FNT1.H ⁺	143,0103	-10,983	-3,112		325,91		N ₂ ,N ₁ =2,96
FNT1		-7,426	-0,069	1,650	324,16	3,34	N ₂ ,N ₁ =6,32
FNT2.H ⁺	136,9013	-10,491	-3,339		492,44		N ₂ ,N ₁ =3,35
FNT2		-7,414	-0,060	1,666	490,86	6,80	N ₂ ,N ₁ =6,32
FNT3.H ⁺	138,8229	-10,704	-3,129		351,07		N ₂ ,N ₁ =3,23
FNT3		-7,670	-0,056	1,753	350,73	3,63	N ₂ ,N ₁ =5,81
IMN1.H ⁺	143,8147	-11,461	-3,435	—	342,63		N ₂ ,N ₁ =3,40
IMN1		-8,350	0,406	0,897	341,98	4,26	N ₂ ,N ₁ =6,29
IMN2.H ⁺	136,8568	-10,752	-3,603	—	512,34		N ₂ ,N ₁ =4,60
IMN2		-8,316	0,358	0,950	508,80	7,72	N ₂ ,N ₁ =6,30
IMN3.H ⁺	139,5518	-11,393	-3,231	—	368,11		N ₂ ,N ₁ =3,36
IMN3		-8,350	0,408	1,128	367,50	4,57	N ₂ ,N ₁ =6,30

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular, CLog P: Coeficiente de partição calculado (Ghose *et al.*, 1987).

Tabela 10 - Propriedades físico-químicas dos confômeros de menor energia mínima dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos (Tabela 2), calculados em meio solvatado por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	Distância (Å)
FNT1.H+	146,8833	-10,449	-3,210	1,650	324,58	N ₂ ,N ₁ =2,93
FNT1		-7,426	-0,069		324,16	N ₂ ,N ₁ =6,32
FNT2.H+	138,6715	-10,719	-3,390	1,666	492,44	N ₂ ,N ₁ =4,54
FNT2		-7,414	-0,0604		490,86	N ₂ ,N ₁ =6,32
FNT3.H+	139,8082	-10,932	-3,157	2,567	351,34	N ₂ ,N ₁ =4,26
FNT3		-7,413	-0,0516		349,57	N ₂ ,N ₁ =5,81
IMN1.H ⁺	145,5271	-11,911	-3,263	—	342,89	N ₂ ,N ₁ =2,99
IMN1		-8,350	0,406		341,98	N ₂ ,N ₁ =6,29
IMN2.H ⁺	138,5651	-10,442	-3,700	—	512,62	N ₂ ,N ₁ =5,40
IMN2		-8,303	0,305		508,86	N ₂ ,N ₁ =6,29
IMN3.H ⁺	140,2402	-11,628	-3,056	—	367,94	N ₂ ,N ₁ =3,01
IMN3		-8,350	0,409		367,50	N ₂ ,N ₁ =6,30

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular.

De maneira geral, os compostos desta série, apresentaram comportamento próximo aos compostos da **Série 1**, tais como maior densidade eletrônica sobre o anel tricíclico, associado ao aumento do valor de EHOMO. Mesmo comportamento é visto para cadeia lateral contendo o átomo de nitrogênio protonado, que se dobra em direção ao anel, diminuindo o valor de ELUMO. A seguir, os compostos da **Série 2** serão comentados detalhadamente, primeiro aqueles presentes na Tabela 2 e depois aqueles da Tabela 3, de maneira a relacionar a atividade biológica destes compostos com suas propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas.

A) Compostos da Tabela 2

A Tabela 2 mostra a atividade biológica dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos, os quais se diferenciam apenas quanto à substituição na cadeia lateral (Figura 20). De uma forma geral, verifica-se maior atividade para os compostos

dotados de anel iminodibenzílico do que para aqueles contendo núcleo fenotiazínico, dado pelo maior índice de supressão parasitária, tanto isoladamente (atividade antimalárica) como em associação à **CQ** (atividade moduladora da resistência).

Figura 20 - Representação dos confôrmeros de menor energia mínima (sistema solvatado) das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2** (Tabela 2), no modelo tubo, calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Entre os derivados **FNT1.H⁺** (variação de entalpia = 146,8833 kcal/mol; EHOMO= -10,449 eV; ELUMO= -3,210 eV) e **IMN1.H⁺** (variação de entalpia = 145,5271 kcal/mol; EHOMO= -11,911 eV; ELUMO= -3,263 eV), nos quais a amina terciária da cadeia lateral encontra-se substituída por duas metilas, o **IMN1.H⁺** apresenta maior índice de supressão parasitária tanto isoladamente (59%) como quando associado à **CQ** (99%) que o **FNT1.H⁺** (17% isoladamente e 30% quando associado).

Apesar de estes compostos apresentarem valores energéticos de energia de entalpia, EHOMO e ELUMO muito próximos entre si, verifica-se que o valor de EHOMO é ligeiramente maior para o **FNT1.H⁺**. De forma complementar, pode-se observar que o nitrogênio protonado da cadeia lateral (N₂) se aproxima de um dos anéis laterais do

anel iminodibenzílico (**IMN1.H⁺**), produzindo uma menor densidade eletrônica nesta região (Figura 21).

Figura 21 - Mapas de potencial eletrostático dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, na faixa de 30 kcal/mol (vermelho intenso) a 100 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³.

Em adição, verifica-se na distribuição orbitalar de HOMO, maior número de lóbulos e de maior tamanho, no anel oposto àquele ao qual a cadeia lateral mais se aproxima do composto **IMN1.H⁺** (Figura 22). De forma contrária, a cadeia lateral contendo o nitrogênio protonado do **FNT1.H⁺**, volta-se em direção ao centro do anel fenotiazínico, aproximando-se do átomo de enxofre. Isto faz com que a densidade eletrônica do anel diminua como um todo, uniformemente, e não apenas em uma única região em relação à outra, como acontece para os derivados iminodibenzílicos (Figura 22). É provável que esta diferença quanto a distribuição eletrônica no anel destes compostos, **FNT1.H⁺** e **IMN1.H⁺**, seja responsável pelas diferenças de atividades antes apontadas. Além disso, o maior volume proporcionado pelo átomo de enxofre poderia favorecer a atividade moduladora da resistência ao ligar-se a PfCRT e, por isso, proporcionar maior atividade quando associado à **CQ**.

Figura 22 – Mapas de distribuição orbitalar de HOMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: Carbono (cinza), nitrogênio (azul), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Entre os derivados **FNT2.H⁺** (variação de entalpia= 138,6715 kcal/mol; EHOMO= -10,719 eV; ELUMO = -3,390 eV) e **IMN2.H⁺** (variação de entalpia= 138,5651 kcal/mol; EHOMO= -10,442 eV; ELUMO = -3,700 eV), a amina terciária da cadeia lateral encontra-se substituída por dois grupos benzil. O **IMN2.H⁺** apresenta maior atividade, isoladamente (índice de supressão igual a 11%), que o derivado **FNT2.H⁺** (índice de supressão igual a 7%). No entanto, quando associado à **CQ**, a atividade do derivado **IMN2** (índice de supressão igual a 6%) é menor que a do derivado **FNT2** (índice de supressão igual a 12%). Como já comentado para o derivado **FNT1**, o maior volume do átomo de enxofre poderia favorecer a atividade moduladora da resistência ao ligar-se a PfCRT e por isto proporcionar maior atividade quando associado à **CQ**.

Como visto na distribuição orbitalar de LUMO das espécies neutra e protonada (Figura 23), os grupos benzil das espécies **FNT2.H⁺** e **IMN2.H⁺** ajudam a estabilizar a carga positiva do nitrogênio protonado da cadeia lateral. Como consequência, a cadeia

lateral se dobra menos em direção ao anel tricíclico, diminuindo a perda eletrônica do anel, o que poderia favorecer a atividade antimalárica. No entanto, o volume molecular maior destes compostos (dado em grande parte pelos grupos benzil) poderia dificultar a aproximação ou interação destes compostos com o grupo heme, o que explicaria a menor atividade antiplasmódica de **FNT2** e **IMN2**, dado pelo menor índice de supressão parasitária, quando comparados aos compostos **FNT1** e **IMN1** (Tabelas 2 e 10).

Figura 23 – Mapas de distribuição orbital de LUMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2**, calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Além disso, assim como os compostos analisados anteriormente (**FNT1** e **IMN1**), verifica-se maior aproximação da cadeia lateral do **IMN2.H⁺** sobre um dos anéis laterais do núcleo tricíclico, o que não acontece para o **FNT2.H⁺**, no qual a cadeia lateral dobra-se em direção ao centro do anel fenotiazínico, em busca do átomo de enxofre (Figura 23). Isto faz com que a diminuição da densidade eletrônica seja mais uniforme sobre o anel fenotiazínico do que sobre o anel iminodibenzílico, o que poderia ser responsável pela atividade diferencial destes compostos.

Os derivados **FNT3.H⁺** (variação de entalpia= 139,808 kcal/mol; EHOMO= -10,932 eV; ELUMO = -3,157 eV) e **IMN3.H⁺** (variação de entalpia= 140,2402 kcal/mol; EHOMO= -11,628 eV; ELUMO = -3,056 eV) possuem em comum a amina terciária substituída por um grupo pirrolidinil, sendo o **IMN3** o mais ativo, não apenas com relação ao seu isómero de anel, mas também com relação aos demais compostos deste grupo, presentes à Tabela 2. A maior atividade supressora dos compostos **FNT3.H⁺** e **IMN3.H⁺** em relação aos demais deve-se, provavelmente, a característica estérica intermediária do anel pirrolidinil quando comparado aos grupos metil e benzil. Como nos compostos anteriores, a cadeia lateral protonada dobra-se mais em direção a um dos anéis laterais do anel iminodibenzílico (**IMN3.H⁺**) como visto pela diferença de tamanho dos lóbulos dos orbitais de HOMO nos anéis laterais deste composto (Figura 22).

O anel pirrolidínico por seu tamanho intermediário e a capacidade de estabilizar a carga positiva sobre o átomo de nitrogênio, impede maior aproximação da cadeia lateral aos anéis, proporcionando maior densidade sobre o anel heteroaromático destes compostos, o que poderia influenciar tanto a atividade antiplasmódica como moduladora da resistência.

Assim, nos três tipos de substituintes, verifica-se uma região do anel iminodibenzílico (**IMN1-3**) de maior densidade eletrônica face à outra de menor densidade (região a qual se aproxima a cadeia lateral). Para o núcleo fenotiazínico (**FNT1-3**) a aproximação da cadeia lateral diminui a densidade eletrônica de maneira mais uniforme sobre este anel. Este comportamento pode ser visualizado nos mapas orbitais de HOMO e LUMO (Figuras 22 e 23).

Como já comentado para a **Série 1**, é possível verificar que os compostos iminodibenzílicos apresentam maior valor de CLogP quando comparados aos seus equivalentes fenotiazínicos devido o maior valor de lipofilicidade do átomo de carbono ($\pi = 0,53$) quando comparado aos heteroátomos nitrogênio ($\pi = -1,23$) e enxofre ($\pi = 0,39$), como pode ser visto para todos os compostos desta série: **FNT1**= 3,34, **IMN1**= 4,26; **FNT2**= 6,80, **IMN2**= 7,72; **FNT3**= 3,34; **IMN3**=3,65. É importante notar que diferenças de lipofilicidade, bem como diferenças no volume molecular dos compostos (**FNT1**= 324,58 Å³, **IMN1**= 341,98 Å³; **FNT2**= 490,86 Å³, **IMN2**= 508,86 Å³; **FNT3**=

349,57 Å³, **IMN3**=367,50 Å³) poderiam estar relacionadas com o favorecimento ou não da atividade antimalárica e moduladora da resistência destes compostos.

Valores de volume molecular e lipofilicidade acima de um ideal (adotando-se como valores ideais de lipofilicidade e volume molecular para atividade antiplasmodica, aqueles encontrados para a **CQ**, 4,63 (experimental), 3,73 (teórico) e 350,42 Å³, respectivamente) poderiam ser prejudiciais à atividade destes compostos. Neste grupo analisado, os valores dos compostos **FNT3** e **IMN3** são os que mais se aproximam dos valores da **CQ**. Neste caso, supõe-se que substituintes estericamente equivalentes ao grupo pirrolidinil são ideais para maior atividade sobre ambos os aspectos.

B) Compostos da Tabela 3

Este grupo é formado por compostos iminodibenzílicos que se diferenciam pela presença ou ausência de substituinte no anel tricíclico (R_2), quanto à posição do grupo metil no anel piperazínico da cadeia lateral bem como ausência da amina terciária nesta última (Tabela 3). As diferenças estruturais entre estes compostos podem ser visualizadas na figura 24. Valores de variação de entalpia, EHOMO, ELUMO, momento de dipolo e volume molecular dos compostos desta série (Tabela 3) podem ser vistos nas tabelas 11 (meio gasoso) e 12 (meio aquoso).

Tabela 11 - Propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos (Tabela 3) calculados em gás por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	CLog P	Distância (Å)
IMP.H ⁺	141,9296	-11,667	-3,364		325,38		N ₂ ,N ₁ =2,96
IMP		-8,342	0,384	0,584	323,73	3,98	N ₂ ,N ₁ =5,02
DSP.H ⁺	141,4470	-11,710	-3,434		306,03		N ₂ ,N ₁ =2,90
DSP		-8,378	0,380	0,921	304,36	3,60	N ₂ ,N ₁ =5,01
CLM.H ⁺	143,3735	-11,714	-3,444		338,68		N ₂ ,N ₁ =2,98
CLM		-8,506	0,101	0,540	337,08	4,54	N ₂ ,N ₁ =4,46
IMN4.H ⁺	138,2814	-11,377	-3,349		380,17		N ₂ ,N ₁ =3,30 N ₃ ,N ₁ =5,46
IMN4		-8,382	0,352	1,687	378,30	3,67	N ₂ ,N ₁ =5,03 N ₃ ,N ₁ =7,34
IMN5.H ⁺	138,9131	-11,554	-3,295		380,62		N ₂ ,N ₁ =3,05 N ₃ ,N ₁ =7,05
IMN5		-8,402	0,358	1,552	378,69	3,67	N ₂ ,N ₁ =5,03 N ₃ ,N ₁ =7,32
IMN6	23,1907	-8,886	0,039	3,536	257,93	2,80	N ₁ ,O=2,30

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular, CLog P: Coeficiente de partição calculado (Ghose *et al.*, 1987).

Tabela 12 - Propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos (Tabela 3) calculados em meio solvatado por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V (Å ³)	Distância (Å)
IMP.H ⁺	147,6022	-10,968	-3,833	0,584	326,83	N ₂ ,N ₁ =4,38
IMP		-8,342	0,384		323,73	N ₂ ,N ₁ =5,03
DSP.H ⁺	148,2520	-11,005	-3,918	0,921	307,52	N ₂ ,N ₁ =4,34
DSP		-8,378	0,380		304,36	N ₂ ,N ₁ =5,01
CLM.H ⁺	148,4930	-11,051	-3,879	0,540	340,09	N ₂ ,N ₁ =4,39
CLM		-8,506	0,101		337,08	N ₂ ,N ₁ =4,46
IMN4.H ⁺	141,7645	-10,929	-3,629	1,687	381,34	N ₂ ,N ₁ =4,30
IMN4		-8,381	0,352		378,30	N ₃ ,N ₁ =7,24
						N ₂ ,N ₁ =5,03
		N ₃ ,N ₁ =7,34				
IMN5.H ⁺	143,9424	-10,928	-3,641	1,552	381,86	N ₂ ,N ₁ =4,39
IMN5		-8,402	0,358		378,69	N ₃ ,N ₁ =7,05
						N ₂ ,N ₁ =5,03
		N ₃ ,N ₁ =7,32				
IMN6	23,1907	-8,886	0,039	3,536	257,93	N ₁ ,O=2,30

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular.

Figura 24 - Representação dos confôrmeros de menor energia mínima (sistema solvatado) das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2** (Tabela 3), no modelo tubo, calculados por método semi-empírico AM1. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), oxigênio (vermelho) e hidrogênio (branco).

A **CLM.H⁺** (variação de energia de entalpia = 148,4930 kcal/mol; $N_1N_2 = 4,39$ Å; EHOMO = -11,051 eV), **IMP.H⁺** (variação de energia de entalpia = 147,6022 kcal/mol; $N_1N_2 = 4,38$ Å; EHOMO = -10,968 eV) e a **DSP.H⁺** (variação de energia de entalpia = 148,2520 kcal/mol; $N_1N_2 = 4,34$ Å; EHOMO = -11,005 eV) apresentam os valores destas propriedades físico-químicas bastante próximos. O efeito do átomo de Cl na **CLM** se evidencia quando esta se encontra no estado neutro, dado pelo valor ligeiramente menor, **CLM** (-8,506 eV) de EHOMO, quando comparada a **IMP** (-8,342 eV) e **DSP** (-8,378 eV), como pode ser melhor visualizado no MEP (Figura 25) e mapa orbitalar de HOMO (Figura 26). De forma complementar, o valor de ELUMO (Figura 27) é menor na **CLM** (0,101 eV) em estado neutro quando comparado a **IMP** (0,384 eV) e **DSP** (0,384 eV).

Figura 25 - Mapas de potencial eletrostático dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies monoprotonadas de compostos da **Série 2** e **IMN3** na forma neutra (Tabela 3), calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, na faixa de 10 kcal/mol (vermelho intenso) a 130 kcal/mol (azul intenso) e na faixa de -10 kcal/mol (vermelho intenso) a 15 kcal/mol (azul intenso) para o **IMN3**, sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³.

Figura 26 – Mapas de distribuição orbitalar de HOMO dos confôrmeros de menor energia mínima das espécies neutras de compostos da **Série 2** e **IMN3** na forma neutra (Tabela 3), calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), oxigênio (vermelho) e hidrogênio (branco).

Figura 27 – Mapas de distribuição orbital de LUMO dos conformeros de menor energia mínima das espécies neutras de compostos da **Série 2** e **IMN3** na forma neutra (Tabela 3), calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), oxigênio (vermelho) e hidrogênio (branco).

Analisando o MEP e o HOMO (Figuras 25 e 26) destes três compostos verifica-se o efeito aceptor de elétrons do átomo de cloro sobre o anel. Quando em estado neutro, a **CLM** apresenta menor valor de ELUMO, uma vez que neste estado, o efeito aceptor de elétrons do átomo de cloro é mais efetivo, já que a cadeia lateral encontra-se estendida e a densidade eletrônica do anel não é diminuída como verificado na forma protonada, por estabilizá-la. Com a protonação, os valores de ELUMO passam para uma mesma faixa, **CLM.H⁺** (-3,879 eV), **IMP.H⁺** (-3,833 eV) e **DSP.H⁺** (-3,918 eV). No entanto, a cadeia lateral da **CLM.H⁺** encontra-se mais dobrada que a **IMP.H⁺** e **DSP.H⁺**, e voltada em direção ao átomo de cloro, o qual poderia melhor estabilizar a carga positiva sobre o átomo de nitrogênio da cadeia lateral e, por conseguinte, aumentar valor de ELUMO. Estas diferenças podem ser melhor visualizadas de forma qualitativa, analisando as superfícies de MEP, HOMO e LUMO apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27.

Os MEPs destes compostos indicam menor densidade eletrônica sobre o anel tricíclico da **CLM** na espécie monoprotônica. Esta característica de menor densidade eletrônica no núcleo e/ou a presença adicional de um átomo mais lipofílico poderia influenciar para a menor atividade antimalárica da **CLM**, dada pelo maior valor de IC₅₀ (4,6 ng/mL), bem como menor ação moduladora da resistência, verificado pelo aumento do valor de RMI (0,09) quando comparado a **DSP** (2,4

ng/mL e 0,05, respectivamente) e **IMP** (2,3 ng/mL e 0,05, respectivamente) (Tabelas 3 e 7).

Com relação aos análogos **IMN4** e **IMN5**, estes se diferenciam, estruturalmente, na posição do substituinte metil do anel piperazínico na cadeia lateral (Tabela 3). Ambos apresentam propriedades físico-químicas com valores muito próximos, como por exemplo, variação de entalpia igual a 143,9424 kcal/mol para o **IMN5** e igual a 141,9106 kcal/mol para o **IMN4**; EHOMO quase que idênticas (-10,929 e -10,928 eV, respectivamente) e ELUMO igual a -3,629 eV para **IMN4.H⁺** e -3,641 eV para **IMN5.H⁺**. No entanto, a maior aproximação do anel piperazínico de **IMN5.H⁺** ($N_1, N_3 = 7,05 \text{ \AA}$) quando comparado ao **IMN4.H⁺** ($N_1, N_3 = 7,24 \text{ \AA}$) pode ser suficiente para diminuir a densidade eletrônica do anel do **IMN5.H⁺**, de forma a influenciar a maior atividade deste (**IMN5.H⁺**, $IC_{50} = 5,2 \text{ ng/mL}$ e $RMI = 0,11$), quando comparado ao **IMN4.H⁺** ($IC_{50} = 43,1 \text{ ng/mL}$; $RMI = 0,89$).

Dentre todos os compostos deste segundo grupo (Tabela 2), o derivado **IMN6** mostra-se o menos ativo ($IC_{50} = 49,7 \text{ ng/mL}$ e $RMI = 1,02$). Isto pode estar relacionado à presença do grupo carbonila, grupo não protonável e retirador de elétrons, o qual diminui a densidade eletrônica sobre o anel iminodibenzílico. Isto também reflete a importância da natureza do átomo de nitrogênio na cadeia lateral de um **AMR**. O farmacóforo proposto por Bhattacharjee, em 2002 e reafirmado em recente revisão de van Schalkwyk e Egan (2006) aponta a necessidade de um grupo protonável, preferencialmente um átomo de nitrogênio, devendo este se distanciar por três átomos de carbono, de um sistema aromático ou heteroaromático, característica ausente no derivado **IMN6**.

Na análise do MEP (Figura 25), distribuição orbitalar de HOMO e de LUMO (Figuras 26 e 27) do **IMN6** verifica-se baixa densidade eletrônica sobre o anel iminodibenzílico e perda eletrônica em favor do grupo carbonila. Estas características poderiam ser responsáveis pela menor atividade antimalárica e moduladora da resistência do composto. Verifica-se também menor valor de ClogP (2,90) e de volume molecular ($257,93 \text{ \AA}^3$) quando comparado aos demais compostos deste grupo (Tabela 11), fatores que poderiam estar relacionados também com a menor atividade antiparasitária e moduladora da resistência.

Na análise de todos os compostos da **Série 2** (Tabelas 2 e 3), verifica-se que ocorre o aumento da atividade moduladora da resistência em paralelo ao aumento da atividade antiplasmodica. Aliado a este fato, semelhanças no comportamento e

características dos compostos desta série (2) tais como valores próximos de EHOMO e ELUMO; maior distribuição eletrônica sobre os núcleos tricíclicos quando comparados à CQ mono- e diprotonada; aproximação da cadeia lateral com a protonação do nitrogênio amínico e decorrente diminuição da densidade eletrônica nos anéis heteroaromáticos poderiam explicar a atividade antiplasmodica dos compostos da **Série 1** em cepas brasileiras de *P. falciparum*. Estes resultados reforçariam a hipótese por nós aventada de mecanismo de ação similar entre **AMR** ensaiados e **CQ** como, por exemplo, por interação com o grupo heme.

4.1.1.3. Compostos Protótipos a Agentes Antimaláricos

A tioridazina (**TRD**) é um composto fenotiazínico utilizado tradicionalmente na terapêutica como antipsicótico (Amaral *et al.*, 2001). No entanto, assim como outros compostos desta classe, a **TRD** apresenta atividade antimicrobiana e antimalárica conhecida (Thanacoody, 2007). No entanto, a principal desvantagem é dada pela elevada toxicidade, próxima à dose eficaz, a partir de 2,5 μM no plasma. Assim, a **TRD** mostra-se um antimalárico em potencial a ser aperfeiçoado, a fim de se obter um fármaco com menores efeitos colaterais (Weisman *et al.*, 2006).

O derivado tribásico da clorpromazina (**T-CPZ**), proposto por Kalkanidis e colaboradores (2002), é, como indicado pelo nome, um derivado da **CPZ** dotado de maior basicidade devido à presença de três átomos de nitrogênio na cadeia lateral, característica importante para o acúmulo deste fármaco no vacúolo digestivo do parasita. O **T-CPZ** mostrou-se 100 vezes mais ativo que a **CPZ** em cepas de *P. falciparum* sensíveis (D10) e 30 vezes mais ativo em cepas resistentes (K1) à **CQ**. Neste estudo, os autores sugerem uma ligação mais forte entre o **T-CPZ** e a hematina, do que em relação à **CPZ**, bem como maior capacidade em inibir a formação da β -hematina ($\text{IC}_{50} = 57 \mu\text{M} \pm 4$) do que a **CPZ** ($\text{IC}_{50} = 78 \mu\text{M} \pm 9$). Neste experimento a **CQ** apresentou maior capacidade de inibir a β -hematina, com IC_{50} igual a $32 \mu\text{M} \pm 4$. Concluiu-se que a maior atividade do **T-CPZ** em relação à **CPZ**, estaria relacionada ao aumento da basicidade e conseqüente aumento do acúmulo do **T-CPZ** no vacúolo digestivo, já comentado, e assim como a **TRD**, este composto mostra-se um antimalárico em potencial a ser aperfeiçoado.

No estudo de modelagem molecular, ambos os compostos tiveram suas propriedades físico-químicas e mapas de superfícies eletrônicas calculados pelo

programa Spartan, realizando-se os mesmos procedimentos adotados para os compostos anteriores. Da mesma forma, os confôrmeros protonados calculados em meio aquoso por método semi-empírico AM1 foram escolhidos para serem analisados na tentativa de melhor simular as características do meio biológico e dados experimentais.

A) Propriedades físico-químicas

Assim como os compostos anteriores, os confôrmeros de menor energia mínima da **TRD** e **T-CPZ** tiveram suas propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas comparadas com a **CQ**.

Na análise das propriedades físico-químicas (Tabelas 13), verifica-se maior valor de energia de entalpia para a **T-CPZ** (147,6931 kcal/mol) quando comparado com a **TRD** (143,5189 kcal/mol), o que poderia, neste caso, estar diretamente relacionado com o maior número de átomos do **T-CPZ.H⁺**, apesar do nitrogênio protonado da cadeia lateral (N_3) mostrar-se mais próximo ao primeiro átomo de nitrogênio da cadeia lateral (N_2) ($N_2, N_3=4,41 \text{ \AA}$) quando comparado a distância entre N_1 e N_2 da **TRD.H⁺** ($N_2, N_1=5,02 \text{ \AA}$). Para esta última, a presença do anel na cadeia lateral restringe a aproximação e promove estabilização do átomo de nitrogênio protonado.

Tabela 13 - Propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima **TRD** e **T-CPZ** calculados em meio solvatado por método semi-empírico AM1 e valor de lipofilicidade calculada.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	V ($\text{\AA}^3$)	CLog P	Distância ($\text{\AA}$)
CQ.2H ⁺	177,3891	-14,63	-6,71	—	355,13		$N_3, N_1=10,02$
CQ.H ⁺		-11,770	-3,431	—	351,24		$N_3, N_1=6,18$
CQ	144,9104	-8,637	-0,505	3,505	350,42	3,73	$N_3, N_1=9,24$
TRD.H ⁺		-9,776	-3,703		387,45		$N_2, N_1=5,02$
TRD	143,5189	-7,325	0,159	2,745	383,27	4,21	$N_2, N_1=5,00$
T-CPZ.H ⁺		-10,034	-3,387		495,35		$N_2, N_3=4,41$ $N_2, N_4=4,61$
T-CPZ	147,6931	-7,609	0,346	1,363	492,68	4,18	$N_2, N_3=5,08$ $N_2, N_4=5,03$

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular, CLog P: Coeficiente de partição calculado (Ghose *et al.*, 1987).

O maior valor de EHOMO da **TRD.H⁺** (-9,776 eV) em relação a **T-CPZ.H⁺** (-10,034 eV) pode estar influenciado pelo maior valor de σ_p , e conseqüente efeito acceptor de elétrons, do átomo de Cl (0,23) presente na **T-CPZ** quando comparado ao valor do grupo SCH₃ (0,00) presente na **TRD**. O menor valor de ELUMO da **TRD.H⁺** (-3,703 eV) deve-se provavelmente a maior distância entre os átomos N₂ e N₁ comentada anteriormente e menor estabilidade da carga positiva, diferentemente ao que acontece para **T-CPZ.H⁺** (-3,387 eV).

Estes compostos diferenciam-se da **CQ.H⁺** por apresentarem valores bem maiores de EHOMO (**CQ.H⁺**= -11,770; **TRD.H⁺** = -9,776; **CPZ.H⁺**= -10,034 eV). A presença do grupo tiometil na **TRD** contribui para este maior valor. No caso da **T-CPZ** e **CQ**, apesar dos dois compostos apresentarem o átomo de cloro, o efeito acceptor deste é mais sentido no anel quinolínico, planar e de menor tamanho, o que facilitaria a ressonância quando comparado ao anel fenotiazínico da **T-CPZ**. Além disso, o átomo de N₂ da **CQ.H⁺** também diminui a densidade eletrônica do anel para estabilizar a carga positiva presente no N₃. Isto não acontece para o **T-CPZ**, em que a cadeia lateral bastante extensa não se aproxima do anel fenotiazínico, direcionando-se mais para o átomo de cloro, permanecendo a região do anel mais rica em elétrons.

Diferenças também são verificadas na lipofilicidade, maior para **TRD** (4,21) e **T-CPZ** (4,18) do que para a **CQ** (3,73), devido a presença de grupos lipofílicos adicionais como o átomo de enxofre e maior cadeia lateral na **T-CPZ**, o que se reflete nos maiores valores de volume destes em relação à **CQ** (**CQ** = 350,42; **TRD** = 383,27; **T-CPZ**= 492,68 eV).

B) Superfícies eletrônicas

Na análise do MEP, é possível verificar a maior densidade eletrônica distribuída sobre todo o anel da **TRD.H⁺** (Figura 28) em relação a **T-CPZ.H⁺** (Figura 29). Esta característica de maior ou menor densidade eletrônica sobre o anel fenotiazínico, proporcionada pela presença de grupos substituintes bem como pela maior proximidade da cadeia lateral pode apresentar-se diferencial na interação com a hematina. Após a análise dos resultados da **Série 2**, na qual verificou-se que grupos muito volumosos na cadeia lateral influenciam negativamente a atividade do composto, poderia supor que a diminuição da cadeia lateral no **T-CPZ** aumentaria sua atividade. No entanto, de acordo com Kalkanidis e colaboradores (2002), a

maior atividade deste composto em relação à **CPZ** e a outros fenotiazínicos poderia ser devido não apenas a basicidade adicional deste composto, mas também a formação de complexo com a hematina de elevada toxicidade.

Figure 28 - Conformero de menor energia mínima da **TRD.H⁺** em meio aquoso calculado por método semi-empírico AM1. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 15 kcal/mol (vermelho intenso) a 120 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

Figure 29 - Conformero de menor energia mínima da **T-CPZ.H⁺** na fase aquosa calculado por método semi-empírico AM1. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 15 kcal/mol (vermelho intenso) a 120 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

A **TRD.H⁺** e o **T-CPZ.H⁺** apresentam os orbitais moleculares de HOMO localizados sobre o anel tricíclico destes compostos. Na **TRD.H⁺** (Figura 28) estes encontram-se principalmente distribuídos sobre o anel contendo o grupo SCH₃, estendendo-se sobre este. Entretanto, na **T-CPZ.H⁺** (Figura 29) os orbitais de HOMO localizam-se em região oposta ao anel onde se encontra o átomo de cloro devido a maior aproximação entre este último e o átomo de nitrogênio protonado. Os orbitais moleculares de LUMO, destes compostos encontram-se sobre a cadeia lateral, assim como os demais compostos já analisados (**Série 1 e 2**) (Figuras 28 e 29).

É importante verificar que as principais diferenças entre os dois compostos analisados e a **CQ** são, assim como os demais compostos da **Série 1 e 2**, a falta de planaridade e a maior densidade eletrônica dos seus anéis verificadas nos MEPs e orbitais de HOMO e de LUMO (Figuras 28 e 29).

4.1.1.4. Agentes Antimaláricos em Desenvolvimento

O **AQ-13** é um candidato aminoquinolínico a agente antimalárico que tem se mostrado efetivo em testes *in vitro*, testes com animais, neste caso macacos infectados com *P. vivax* e *P. falciparum* resistentes à **CQ** (Ramanathan-Girish , 2004), e mais recentemente, em humanos em teste de fase I com 126 voluntários, no qual se verificou efeitos adversos similares à **CQ** (Mzayec *et al*, 2007).

O **RCQ** é um composto formado pela junção do antimalárico **CQ** e do agente modulador da resistência **IMP**. Este apresentou atividade em cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à **CQ**, mostrando-se também efetivo em ratos infectados por *P. chabaudi* (Burgess *et al.*, 2006).

Por estas razões, estes dois compostos, **AQ-13** e **RCQ** foram introduzidos neste trabalho e tiveram suas propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas estudadas por uso do programa Spartan, utilizando o método semi-empírico AM1. O **RCQ** lançou-nos a idéia de substituir a molécula correspondente à **IMP** pela **CPZ**, resultando no composto-modelo denominado **RCQ-CPZ**.

A) Propriedades físico-químicas

De forma análoga à **Série 1**, cálculo das propriedades físico-químicas dos compostos **AQ-13**, **RCQ** e **RCQ-CPZ** nas suas formas neutra, monoprotonadas e diprotonadas foi realizado (Tabela 14) e os resultados comparados à **CQ**. O meio solvatado foi escolhido com o objetivo de melhor simular o meio biológico e resultados experimentais.

Tabela 14 - Propriedades físico-químicas dos confôrmeros de menor energia mínima do **AQ-13**, **RCQ**, **RCQ-CPZ** e **CQ** calculados em meio solvatado por método semi-empírico AM1.

Composto	ΔH (kcal/mol)	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	μ (Debye)	CLog P	Distância (Å)
CQ.2H ⁺	177,3891	-14,63	-6,71	---	---	N ₃ ,N ₁ =10,02
CQ.H ⁺	144,9104	-11,770	-3,431	---	---	N ₃ ,N ₁ =6,18
CQ		-8,637	-0,505	3,765	3,73	N ₃ ,N ₁ =9,24
AQ-13.2H ⁺	180,3821	-14,93	-7,92	---	---	N ₃ ,N ₁ =8,96
AQ-13.H ⁺	149,2175	-10,932	-4,007	---	---	N ₃ ,N ₁ =7,43
AQ-13		-8,695	-0,544	3,550	3,13	N ₃ ,N ₁ =7,63
RCQ.2H ⁺	179,3523	-12,66	-6,94	---	---	N ₃ ,N ₁ =8,96
RCQ.H ⁺	150,0741	-11,48	-3,49	---	---	N ₃ ,N ₁ =4,48
RCQ		-8,45	-0,56	4,005	6,19	N ₃ ,N ₁ =7,40
RCQ-CPZ.2H ⁺	189,8962	-11,56	-6,98	---	---	N ₃ ,N ₁ =8,96
RCQ-CPZ.H ⁺	143,1862	-10,23	-4,02	---	---	N ₃ ,N ₁ =7,45
RCQ-CPZ		-7,55	-0,56	3,292	5,27	N ₃ ,N ₁ =7,68

ΔH : variação de entalpia, EHOMO: energia molecular de HOMO, ELUMO: energia molecular de LUMO, μ : momento de dipolo, V: volume molecular, CLog P: Coeficiente de partição calculado (Ghose *et al.*, 1987).

De maneira geral, o **AQ-13** e a **CQ** apresentam propriedades físico-químicas próximas como, por exemplo, EHOMO em estado neutro (**AQ-13** = -8,69 eV, **CQ** = -8,64 eV). Este valor diminui com a monoprotonação, permanecendo maior para o **AQ-13.H⁺** (-10,93 eV) do que para **CQ.H⁺** (-11,77 eV), possivelmente devido à menor aproximação entre N₃ e N₁ para o **AQ-13.H⁺** (7,43 Å) quando comparado à **CQ.H⁺** (6,18 Å). O valor de ELUMO do **AQ-13.H⁺** (-4,01 eV) é menor que o valor para a **CQ.H⁺** (-3,43 eV).

Quando diprotonados (protonação do nitrogênio quinolínico N₁), estes valores diminuem mais, permanecendo os valores de EHOMO próximos, **AQ-13.2H⁺** (-14,63 eV) e **CQ.2H⁺** (-14,93 eV) e os valores de ELUMO menores para o **AQ-13.2H⁺** (-7,93 eV) quando comparado a **CQ.2H⁺** (-6,71 eV). Provavelmente, a maior acidez dos átomos de hidrogênio da cadeia lateral (mais curta) do **AQ-13** em ambos os estados protonados desloquem maior densidade eletrônica do N₂ para estabilizarem-se e isto se faz refletir no anel quinolínico, diminuindo o valor de ELUMO do **AQ-13** quando protonado (**H⁺** e **2H⁺**). Ambos os valores de energia molecular mostram o

AQ-13 mais reativo eletronicamente do que a **CQ**, em especial para ELUMO, o que pode ser refletido na interação deste composto com o grupo heme.

Com relação aos compostos **RCQ** e **RCQ-CPZ**, estes apresentam elevado valor de EHOMO, quando protonados, próximos ao valor da **CQ.H⁺** (EHOMO = - 11,77 eV; **RCQ.H⁺** = - 11,48 eV e **RCQ-CPZ.H⁺** = - 10,23 eV) bem como a **IMP.H⁺** (- 10,97 eV) e **CPZ.H⁺** (-9,78 eV). Assim como acontece para a **CQ.2H⁺** (- 14,63 eV), com a diprotonação, os valores de EHOMO diminuem, **RCQ.2H⁺** (- 12,66 eV) e **RCQ-CPZ.2H⁺** (- 11,56 eV). Com relação aos valores de ELUMO, **RCQ.H⁺** (- 3,49 eV), **RCQ-CPZ.H⁺** (- 4,02 eV) apresentam novamente valores próximos a **CQ.H⁺** (- 3,43 eV) e a **IMPH⁺** (3,83 eV) e **CPZ.H⁺** (-4.118 eV), respectivamente. Com a diprotonação, os valores tornam-se ainda menores: **RCQ.2H⁺** (- 6,94 eV), **RCQ-CPZ.2H⁺** (- 6,98 eV) que a **CQ.2H⁺** (- 6,71 eV). Estes valores mostram um comportamento próximo destas propriedades para os três compostos, sugerindo que **RCQ** e **RCQ-CPZ** mantêm as características individuais de seus protótipos **CQ**, **IMP** e **RCQ**. Acredita-se que o mecanismo de ação do **RCQ** seja o mesmo da **CQ**, interação π - π com a hematina (Burguess *et al.*, 2006). No entanto, face aos resultados observados com os isolados brasileiros, esta interação poderia ocorrer não apenas com o núcleo quinolínico, mas de maneira complementar pelos dois núcleos fenotiazínico e iminodibenzílico. Esta hipótese foi avaliada em estudo de UVVIS e será comentada posteriormente.

O menor valor do momento de dipolo para **AQ-13** (3,550 Debye) em relação à **CQ** (3,765 Debye) e menor valor de CLogP (**AQ-13** = 3,13; **CQ** = 3,75) justifica-se em função de sua cadeia lateral menor. O menor valor do momento de dipolo do **RCQ-CPZ** (3,292 Debye) em relação ao **RCQ** (4,005 Debye) se relaciona à natureza mais polar do anel fenotiazínico em comparação ao anel iminodibenzílico destes compostos.

B) Superfícies eletrônicas

Verifica-se na molécula do **AQ-13** maior densidade eletrônica sobre o anel quinolínico, que diminui com os estados de protonação, acentuando-se mais sobre a região do átomo de cloro, quando diprotonado (Figuras 30). Esta menor densidade eletrônica, quando comparada a observada para os demais compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos estudados, pode representar característica relevante para a interação do tipo π - π com a hematina. Além disso, como visto para

a **CQ**, o **AQ-13**, apresenta os orbitais moleculares de HOMO e de LUMO, nos três estados (neutro; H^+ e $2H^+$), localizados sobre o anel quinolínico (Figura 30 para o **AQ-13.2H⁺**).

Figure 30 - Conformero de menor energia mínima do **AQ-13.2H⁺** na fase aquosa calculado por método semi-empírico AM1. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 90 kcal/mol (vermelho intenso) a 170 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja) e hidrogênio (branco).

Os mapas de potencial das espécies diprotonadas **RCQ.2H⁺** (Figura 31) e **RCQ-CPZ.2H⁺** (Figura 32) mostram maior densidade eletrônica sobre os anéis tricíclicos e menor densidade eletrônica sobre o anel quinolínico, sendo assim capazes de doar e receber elétrons nestas regiões, respectivamente. Supõe-se que estas são as características presentes prefiro individuais para a **IMP**, **CPZ** e **CQ** quando isoladas e que assim poderiam ser sentidas pela hematina ao se aproximarem desta última. Os orbitais de HOMO localizam-se sobre os anéis tricíclicos correspondentes a **IMP** e **CPZ** e orbitais de LUMO se encontram sobre o anel quinolínico equivalente a **CQ**, supondo a ocorrência de possível interação entre os anéis presentes nestes compostos. Para melhor fundamentar esta hipótese, estudo no UVVIS foi realizado por associação da **CQ** a **IMP** ou **CPZ** e posterior adição de hematina. Este estudo foi realizado visando identificar (1) se haveria interação intramolecular; (2) se esta interação seria desfeita na presença da hematina e (3) qual dos núcleos quinolínico, iminodibenzílico ou fenotiazínico teria maior afinidade em ligar-se a hematina. Os resultados serão discutidos em item subsequente.

Figure 31 - Confômero de menor energia mínima do **RCQ.2H⁺** na fase aquosa calculado por método semi-empírico AM1. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 40 kcal/mol (vermelho intenso) a 180 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja) e hidrogênio (branco).

Figure 32 - Confômero de menor energia mínima do **RCQ-CPZ.2H⁺** na fase aquosa calculados por método semi-empírico AM1. (A) Modelo em tubo; (B) Mapa de potencial eletrostático na faixa de 40 kcal/mol (vermelho intenso) a 180 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (C) Superfícies de HOMO e LUMO a 0.032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), cloro (laranja), enxofre (verde claro) e hidrogênio (branco).

4.1.2. Estudos de Ancoramento

Estudo de ancoramento foi realizado com o objetivo de se analisar a interação de compostos dos núcleos quinolínico, fenotiazínico e iminodibenzílico com o dímero μ -oxo da hematina.

4.1.2.1. Programa Spartan

O estudo de ancoramento realizado no programa Spartan foi realizado para os compostos **CQ.2H⁺**, **AQ-13.2H⁺**, **MPC.2H⁺**, **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺**, **IMP.H⁺**, **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺**, considerando-se os estados de protonação em que se encontram no vacúolo digestivo. Os confôrmeros de menor energia mínima obtidos por método semi-empírico PM3 foram transformados em espécies ligantes e, em seguida, realizada a união destes com o átomo de ferro do dímero μ -oxo da hematina. As formas de ácido carboxílico (Portela *et al.*, 2004) e a forma de carboxilato ou propionato (Portela *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2007) da hematina, calculados por método semi-empírico PM3, foram estudadas.

Na análise do MEP do dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato (Figura 33) verifica-se maior densidade eletrônica sobre os átomos de oxigênio dos grupos carboxilatos, visualizados pela cor vermelha intensa. O centro do anel porfirínico, ressonante, apresenta alta densidade eletrônica, caracterizada pela cor verde. Na forma ácido carboxílico, a densidade eletrônica sobre o átomo de oxigênio diminui como esperado e alta densidade eletrônica se mantém sobre a região central do anel porfirínico (Figura 33). Em ambas as espécies, os orbitais moleculares de HOMO (Figura 34) e de LUMO (Figura 35) distribuem-se em diferentes faces do dímero μ -oxo da hematina.

Figura 33 - Mapas de potencial eletrostático dos confôrmeros de menor energia mínima dos dímeros μ -oxo nas formas (A) ácido carboxílico e (B) carboxilato calculados em meio gasoso por método semi-empírico PM3, nas faixas de (A) -250 kcal/mol (vermelho intenso) a -110 kcal/mol (azul intenso) e (B) -80 kcal/mol (vermelho intenso) a 50 kcal/mol (azul intenso), sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³

Figura 34 - Mapas de distribuição orbitalar de HOMO dos confôrmeros de menor energia mínima dos dímeros μ -oxo nas formas (A) ácido carboxílico e (B) carboxilato calculados em meio gasoso por método semi-empírico PM3, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), ferro (verde) e hidrogênio (branco).

Figura 35 - Mapas de distribuição orbitalar de LUMO dos confôrmeros de menor energia mínima dos dímeros μ -oxo nas formas (A) carboxilato e (B) ácido carboxílico calculados em meio gasoso por método semi-empírico PM3, considerando-se densidade eletrônica constante de 0,032 eV. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), ferro (verde) e hidrogênio (branco).

Na análise da interação da **CQ.2H⁺** com o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato observa-se o posicionamento paralelo do anel quinolínico sobre o anel porfirínico da face superior do dímero (Figura 36). Neste complexo, o átomo de nitrogênio do anel quinolínico (N_1) protonado está direcionado para um dos grupos carboxilatos, estabelecendo interação por ligação de hidrogênio, com distância entre o átomo de hidrogênio ligado a N_1 e um dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato igual a 1,316 Å e distância entre o átomo de nitrogênio (N_1) e este oxigênio igual a 2,358 Å. Na literatura esta interação é verificada ocorrer entre 2,0 a 3,0 Å (Erickson & McLouchin, 1995). A região 4-amino da **CQ.2H⁺** encontra-se sobre o átomo de ferro do dímero μ -oxo (distância entre N_2 e o átomo de ferro igual a 4,302 Å). Como observado no MEP da **CQ.2H⁺**, a diprotonação promove a diminuição da densidade eletrônica sobre a região 4-amínica, o que justifica a interação com o centro rico em elétrons do dímero μ -oxo. Em razão destas forças de atração, interação hidrofóbica do tipo π - π pode ser considerada entre ambos os sistemas, como previamente reportado na literatura (Fitch *et al.*, 1982; Sullivan *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998; Egan, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Wood & McNaughton, 2007).

Figura 36 - Simulação da interação entre o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato e grupo de compostos em estudo por emprego do método MMFF94, no programa Spartan. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), enxofre (verde claro), ferro (verde) e hidrogênio (branco).

A cadeia lateral contendo o átomo de nitrogênio protonado (N_3) da **CQ.2H⁺** se estende sobre o anel porfirínico e observa-se a orientação dos átomos de hidrogênio dos grupos metilas da cadeia lateral em direção ao grupo carboxilato.

Geometrias semelhantes foram encontradas para as formas neutra e monoprotonada da **CQ**, as quais mostram o anel quinolínico planar sobre o dímero. Observa-se também a interação dos átomos de hidrogênio próximos a região do átomo de nitrogênio da cadeia lateral (N_3) da forma monoprotonada com os grupos carboxilatos do dímero μ -oxo da hematina (distância entre o átomo de hidrogênio do nitrogênio N_3 da cadeia lateral e o grupo carboxilato igual a 1,24 Å e distância entre o átomo de nitrogênio N_3 da cadeia lateral e o mesmo átomo de carbono igual a 1,350 Å). A cadeia lateral da forma neutra da **CQ** também se aproxima do grupo carboxilato como pode ser visto na figura 37.

Figura 37 – Simulação da interação entre o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato e as moléculas de **CQ** nas formas neutra, monoprotônica e diprotônica por emprego do método MMFF94, no programa Spartan. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), enxofre (verde claro), ferro (verde) e hidrogênio (branco).

Em trabalho realizado por Cheruku e colaboradores (2003), os átomos de nitrogênio do anel quinolínico (N_1) e o nitrogênio da posição 4 (N_2) foram substituídos por átomos de carbono, em diferentes compostos. Estes tiveram os mapas de potencial eletrostático e densidade de cargas atômicas avaliados por método *ab initio* 3-21G, bem como foi medida a capacidade destes compostos em inibir o crescimento de cepas sensíveis e resistentes à **CQ**. O composto substituído em N_1 mostrou fraca inibição da formação de hemozoína, diferentemente do composto substituído em N_2 que se mostrou desprovido de atividade. É provável que o composto substituído em N_1 gere distribuição eletrônica energeticamente favorável para a interação com o dímero μ -oxo. No entanto, os autores supõem que nenhum dos compostos seria ativo como antimalárico devido à diminuição acentuada da basicidade, dada pela substituição de um dos átomos de nitrogênio, e conseqüente diminuição do acúmulo no vacúolo digestivo do parasito. Associando estes dados aos nossos resultados, é provável que a presença do átomo de nitrogênio protonável no anel quinolínico seja importante na interação de composto desta natureza química com o grupo heme. O posicionamento entre as duas espécies favoreceria o alinhamento e ocorrência de interação do tipo π - π , como mostra o complexo calculado pelo método MMFF94 (Figura 35).

O anel quinolínico do **AQ-13.2H⁺** encontra-se planar ao anel porfirínico (Figura 36), estabelecendo, de modo semelhante à **CQ.2H⁺**, interação do tipo π - π com o dímero μ -oxo da hematina. Ligação de hidrogênio é observada entre o nitrogênio protonado do anel quinolínico (N_1) e um dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato da face superior do dímero μ -oxo da hematina (1,326 Å). A cadeia lateral

estende-se sobre o anel porfirínico e o átomo de nitrogênio da cadeia lateral (N₃) forma ligação de hidrogênio com outro grupo carboxilato do anel porfirínico (1,519 Å). Acredita-se que o mecanismo de ação do **AQ-13.2H⁺** seja o mesmo aceito para a **CQ.2H⁺** (interação do tipo π - π), o que está de acordo com o resultado obtido.

A **MPC.2H⁺**, antimalárico de núcleo tricíclico acridínico, interage de maneira distinta da **CQ.2H⁺** (Figura 36). O átomo de nitrogênio protonado (N₁) direciona-se ao anel porfirínico (distância entre o átomo de hidrogênio ligado ao N₁ e o átomo de Fe igual a 3,711 Å) enquanto a cadeia lateral da **MPC.2H⁺** dobra-se em direção ao grupo carboxilato do segundo anel porfirínico (face inferior do dímero), a uma distância de 3,476 Å entre o átomo de nitrogênio da cadeia lateral da **MPC.2H⁺** e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato do dímero μ -oxo da hematina. Interação eletrostática pode ser vista entre os átomos de hidrogênio do substituinte metoxi e grupo carboxilato próximo (2,902 Å). Este resultado mostra-se de acordo com o mecanismo de ação aceito para a **MPC.2H⁺**, o que impediria a formação da pigmento hemozoína no parasito (Portela *et al.*, 2004). No estudo de ancoramento realizado por Portela e colaboradores (2003), o anel da **MPC.2H⁺**, de menor densidade eletrônica, interage com a região central do dímero μ -oxo, de maior densidade eletrônica.

Os anéis tricíclicos dos compostos **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** não estabeleceram interação do tipo π - π com o anel do dímero μ -oxo. A molécula **CPZ.H⁺** apresenta sua estrutura dobrada sobre o anel porfirínico, com o átomo de enxofre voltado em direção ao centro deste anel (distância entre os átomos S e Fe igual a 4,385 Å). O átomo de nitrogênio protonado da cadeia lateral (N₂) volta-se em direção ao próprio anel fenotiazínico não estabelecendo interação por ligação de hidrogênio com os grupos carboxilatos do dímero μ -oxo. Interação da **CPZ** com a forma hemina por formação de complexo lipofílico foi sugerida previamente por Panijipan e Kantakanit (1983).

Em oposição, o anel iminodibenzílico das moléculas de **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** mostram-se mais próximos do anel porfirínico, sendo esta aproximação maior para a **DSP.H⁺** (distância entre o átomo de nitrogênio do anel iminodibenzílico N₁ e o átomo de ferro igual a 5,594 Å para a **DSP.H⁺**) do que para a **IMP.H⁺** (igual a 6,766 Å). Em ambos os complexos, os átomos de nitrogênio protonado da cadeia lateral (N₂) se

aproximam dos grupos carboxilatos do dímero μ -oxo (distância hidrogênio-oxigênio de 1,396 Å para a **DSP.H⁺** e de 1,441 Å para a **IMP.H⁺**) (Figura 36).

Apesar da interação entre a **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** e o dímero μ -oxo da hematina mostrar-se diferente da encontrada para **CQ.2H⁺**, os modelos aqui reportados indicam haver interação destes compostos com os grupos carboxilatos ou com a região central dímero μ -oxo da hematina. Desta forma, estes compostos poderiam apresentar atividade antimalárica por se interpor entre as interações carboxilato-carboxilato e carboxilato-ferro, impedindo a formação da hemozoína.

Em relação aos compostos híbridos **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺**, observa-se haver interação de toda a estrutura química dos compostos com o anel porfirínico do dímero da hematina. Entretanto, em ambos os complexos, a maior interação ocorre entre o respectivo anel quinolínico e o anel porfirínico porém, de modo distinto do que observado para a **CQ.2H⁺**, ou seja, para estes compostos não ocorreria interação do tipo π - π entre os sistemas aromáticos. Para a **RCQ.2H⁺**, é possível verificar a ocorrência de ligação de hidrogênio entre o hidrogênio ligado ao N₁ e um dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato (distância de 1,334 Å). Interação eletrostática é observada entre átomo de nitrogênio N₂ (anel quinolínico) e o segundo grupo carboxilato do dímero, grupo com alta densidade eletrônica (distância entre o átomo de hidrogênio de N₂ e o grupo carboxilato igual a 1,744 Å). No **RCQ-CPZ.2H⁺**, interações semelhantes à **RCQ.2H⁺** também ocorrem: distância entre o átomo de hidrogênio de N₂ e o grupo carboxilato igual a 1,665 Å e distância entre o átomo de hidrogênio do nitrogênio protonado (N₁) e outro grupo carboxilato (1,331 Å). Nenhuma interação é vista para o anel fenotiazínico que se encontra direcionado para fora do anel porfirínico. A geometria do complexo observado para o **RCQ.2H⁺** concorda com o observado no artigo original do **RCQ**, em que Burgess e colaboradores (2006) indicam que a parte do composto equivalente à **IMP** não afetaria a interação entre o anel quinolínico da molécula da **CQ** e o dímero da hematina. Resultado semelhante poderia então ser esperado para o composto por nós proposto **RCQ-CPZ**.

Na análise da interação dos compostos com o dímero μ -oxo na forma de ácido carboxílico, o anel quinolínico da **CQ.2H⁺** e **AQ-13.2H⁺** apresentam-se sobre o dímero μ -oxo, embora sob modos diferentes. Para a **CQ.2H⁺**, o átomo de nitrogênio protonado da cadeia lateral (N₃) aproxima-se de um dos átomos de oxigênio do

grupo ácido carboxílico do dímero (face inferior), a distância de 3,099 Å. Interação π - π entre o anel quinolínico da **CQ.2H⁺** com a região de maior ressonância eletrônica do anel porfirínico é observada. A distância entre o átomo de ferro e o nitrogênio quinolínico (N₁) é igual a 3,931 Å. Para o **AQ-13.2H⁺**, observa-se interação entre o nitrogênio protonado (N₃) da cadeia lateral com a região central próxima ao átomo de ferro do anel porfirínico, sendo a distância N₃-Fe igual a 4,058 Å (Figura 38).

Figura 38 – Simulação da interação entre o dímero μ -oxo da hematina na forma ácido carboxílico e grupo de compostos em estudo por emprego do método MMFF94, no programa Spartan. Átomos nas cores: carbono (cinza), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), enxofre (verde claro), ferro (verde) e hidrogênio (branco).

A **MPC.2H⁺**, de modo semelhante ao observado para a forma carboxilato do dímero μ -oxo da hematina, não apresenta interação planar com o anel porfirínico. O anel acridínico inclina-se em direção sobre este anel (distância entre o nitrogênio (N₁) acridínico e o átomo de ferro igual a 4,625 Å). A cadeia lateral, em especial a região do nitrogênio protonado (N₃), se posiciona entre os dois grupos ácido carboxílicos, de mesma face (Figura 38).

A interação dos compostos **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** com o dímero μ -oxo mostra-se diferente: A molécula da **IMP.H⁺** apresenta interação planar com a região periférica do anel porfirínico enquanto que o anel da **DSP.H⁺** não interage com este último. No caso da **DSP.H⁺**, a principal interação ocorre entre a cadeia lateral e a região central

do anel do dímero μ -oxo. No complexo formado com a **CPZ.H⁺**, o átomo de enxofre do anel volta-se em direção à região periférica do anel do dímero μ -oxo da hematina (distância entre os átomos enxofre e ferro igual 4,458 Å. Interação também ocorre entre as cadeias laterais da **IMP.H⁺** e **DSP.H⁺** e a região central e ressonante do anel porfirínico (Figura 38).

Em semelhança ao estudo com a forma carboxilato do dímero, os compostos híbridos **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺** interagem de forma similar. Para ambos, os respectivos anéis quinolínicos orientam-se sobre o anel porfirínico, entretanto não se observa aproximação do anel iminodibenzílico ou fenotiazínico. As cadeias carbônicas que unem os anéis encontram-se direcionadas aos grupos ácido carboxílicos, em razão da natureza rica em elétrons destes últimos (Figura 38).

É importante notar que, apesar dos compostos **AQ-13.2H⁺** e **MPC.2H⁺** não formarem interação do tipo π - π com o dímero μ -oxo, como faz a **CQ.2H⁺**, estes compostos interagem e se superpõem nas regiões responsáveis pela formação da hemozoína o que impediria sua formação. Estes mesmo raciocínio pode ser aplicado para os demais compostos **CPZ.2H⁺**, **DSP.2H⁺**, **IMP.2H⁺**, **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺**, os quais também interagem com o átomo de ferro ou ácidos carboxílico aos átomos de ferro.

Análise da variação da energia de formação dos complexos (Tabela 15) indica que os complexos gerados com o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato apresentam valores de variação de entalpia próximos inferiores ao complexo formado com a **CQ.2H⁺** (-255,7856 kcal/mol). Os valores menos favoráveis são vistos para **MPC.2H⁺** (-60,9780 kcal/mol) e **CPZ.H⁺** (-88,1032 kcal/mol). Estes compostos não apresentam interação do tipo π - π com o dímero μ -oxo da hematina e apenas parte de seus anéis interagem com o anel porfirínico. Valores intermediários são observados para os compostos **MPC.2H⁺**, **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺**. Estes interagem com maior número de pontos do dímero μ -oxo da hematina, no entanto não formam interação do tipo π - π com este último. As moléculas do **AQ-13.2H⁺** (-223,3829 kcal/mol) e **RCQ.2H⁺** (-224,5868 kcal/mol) apresentam valores próximos a **CQ.2H⁺**. No caso o **AQ-13.2H⁺** sua interação é semelhante a **CQ.2H⁺** e com relação a molécula do **RCQ.2H⁺**, apesar do núcleo quinolínico não apresentar interação

completamente planar, a cadeia lateral interage com diversos pontos do dímero o que poderia dar maior estabilidade ao complexo gerado.

Para os complexos gerados com o dímero μ -oxo da hematina na forma de ácido carboxílico (Tabela 15), a maioria dos compostos apresentam valores próximos, o que poderia indicar que a formação do complexo é igualmente favorável como pode ser visto, por exemplo, para a **CPZ.H⁺** (-211.7049 kcal/mol) ou **IMP.H⁺** (-212.2570 kcal/mol). O valor mais negativo do **AQ-13.2H⁺** (-287.9951 kcal/mol) e da **MPC.2H⁺** (-251.1411 kcal/mol) indicam também o maior favorecimento para formação do complexo em ambas quando comparadas a **CQ.2H⁺**. Neste último caso, apesar da ausência de interação π - π entre os anéis, a aproximação das respectivas cadeias laterais ao grupo ácido carboxílico do dímero μ -oxo proporciona maior estabilidade ao complexo.

Tabela 15 – Variação de entalpia de formação dos complexos de interação com o dímero μ -oxo da hematina calculados pelo programa Spartan.

	Dímero μ -oxo.COO ^{-*} (kcal/mol)	Dímero μ -oxo.COOH ^{**} (kcal/mol)
CQ.2H⁺	-255.7856	-244.7002
AQ-13.2H⁺	-223.3829	-287.9951
MPC.2H⁺	-60.9780	-251.1411
CPZ.H⁺	-88.1032	-211.7049
DSP.H⁺	-117.6477	-347.6851
IMP.H⁺	-111.9359	-212.2570
RCQ.2H⁺	-224.5868	-279.7355
RCQ-CPZ.2H⁺	-144.8402	-184.1193

μ -oxo * μ -oxo- dímero da hematina na forma de carboxilato; ** μ -oxo- dímero da hematina na forma de ácido carboxílico.

4.1.2.2. Programa GOLD

Interação entre os compostos **CQ.2H⁺**, **AQ-13.2H⁺**, **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺**, **IMP.H⁺**, **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺** e o dímero μ -oxo da hematina, na forma de ácido carboxílico, foi realizada no programa GOLD. Este programa é considerado na literatura como adequado ao estudo de ancoramento de compostos derivados do grupo heme tendo sido empregado, por exemplo, por Portela e colaboradores

(2003b; 2004). As estruturas empregadas neste estudo advêm de cálculos PM3 efetuados no programa Spartan.

Na interação da **CQ.2H⁺**, o anel quinolínico encontra-se coplanar ao anel porfirínico, com a região dos átomos de nitrogênio protonado (N₁) e cloro direcionados para fora do centro do anel. A região 4-amino encontra-se próxima ao átomo de ferro, com distância equivalente a 3,02 Å. A cadeia lateral da **CQ.2H⁺** estende-se sobre o anel porfirínico e não se verifica interação com os grupos de ácidos carboxílicos (Figura 39). Este comportamento se justifica por ambos ligante e receptor encontrarem-se protonados. Destaca-se que geometria semelhante foi observada para os complexos obtidos por Portela e colaboradores (2004), embora estes autores tenham considerado o fármaco em sua forma neutra.

Figura 39 - Simulação da interação entre o dímero μ -oxo da hematina na forma ácido carboxílico e grupo de compostos em estudo, realizada no programa GOLD. Átomos nas cores: carbono (verde), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), enxofre (verde claro), ferro (grafite) e hidrogênio (branco).

O complexo gerado com o **AQ-13.2H⁺** mostra-se semelhante ao observado para a **CQ.2H⁺**. O anel quinolínico está planar ao anel porfirínico e a região 4-amino se próxima do átomo de ferro (3,20 Å), não se observando interação com os grupos

ácidos carboxílicos (Figura 31). Entretanto, a cadeia lateral encontra-se em direção oposta.

Os anéis fenotiazínico e iminodibenzílico dos compostos **CPZ.H⁺**, **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺**, respectivamente, interagem com o centro do anel porfirínico. O anel fenotiazínico encontra-se sobre o centro do dímero μ -oxo da hematina enquanto na **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺** apenas uma parte do anel mostra interação. Como consequência, a distância entre o átomo de nitrogênio (N₁) do anel iminodibenzílico e o átomo de ferro da **DSP.H⁺** e **IMP.H⁺**, igual a 4,39 Å para ambos, é menor do que a observada entre os átomos de enxofre e ferro, de 5,17 Å, para a **CPZ.H⁺**.

Da mesma forma como obtido no programa Spartan, as cadeias intermediárias dos compostos híbridos **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺** estendem-se sobre a estrutura do dímero. Os anéis quinolínico, iminodibenzílico e fenotiazínico localizam-se nas extremidades do anel porfirínico, apesar de prevalecer a interação do anel quinolínico. Nenhuma interação é vista entre os grupos ácidos carboxílicos do dímero μ -oxo da hematina e os compostos **RCQ.2H⁺** e **RCQ-CPZ.2H⁺**.

A forma de carboxilato não foi realizada no programa GOLD por se dispor à época de licença temporária do programa, o que também impossibilitou a revisão dos complexos com geometrias distintas das observadas no programa Spartan. Entretanto, pode-se considerar que os resultados obtidos por uso dos dois programas são próximos, com destaque à ocorrência de interação do tipo π - π entre o anel quinolínico e o sistema porfirínico. Finalmente, embora os estudos de ancoramento necessitem serem refeitos para melhor determinação, em especial, das geometrias dos complexos, acredita-se que tanto o modo de interação como a variação de entalpia, observada no programa Spartan, permitem indicar a interação, ainda que por modos distintos, dos três anéis: quinolínico, fenotiazínico e iminodibenzílico, com a o dímero da hematina. Estas interações poderiam explicar o efeito antiplasmódico observado nos isolados brasileiros para os compostos desta natureza química.

4.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

4.2.1. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível

Os ensaios de ultravioleta-visível (UVVIS) foram realizados com o objetivo de auxiliar a interpretação dos resultados obtidos por modelagem molecular e desta forma validá-los. Para este fim, escolheu-se um representante mais ativo de cada um dos núcleos, fenotiazínico (**CPZ**) e iminodibenzílico (**DSP** e **IMP**), a serem comparados com a **CQ**.

Os primeiros ensaios espectrofotométricos foram realizados empregando-se o aparelho Beckman DU-70. Contudo, a observação de ausência de reprodutibilidade dos resultados, sugeriu o comprometimento da precisão do equipamento, o que conduziu à adoção do espectrofotômetro Shimadzu UV – 3101PC.

4.2.1.1. *Estudo Cinético da Hematina*

De acordo com Egan (2007), a banda Soret a 393 nm, é indicativa do equilíbrio entre os estados monomérico e dimérico da hematina, enquanto a segunda banda, a 347 nm, não apresenta qualquer relação com este equilíbrio. Este estudo propõe um novo modelo para explicar o estado dimérico da hematina, o qual se daria através da interação do tipo π - π (Figura 42) entre dois monômeros da hematina, com a hidroxila protonada ou não, sem a formação do dímero μ -oxo. No modelo do dímero μ -oxo, adotado por Portela e colaboradores (2003; 2004), a hematina estaria ligada covalentemente a um átomo de oxigênio e este formaria uma ponte com outra molécula de hematina (Figura 38).

Figura 42– Modelos propostos para a estrutura da hematina.

Uma terceira atribuição foi realizada recentemente por Wood e colaboradores (2004), referente às alterações das bandas Soret e Q da hemina e β -hematina. Os espectros foram obtidos através da acidificação gradual da solução de hemina em função da mudança de pH (Figura 41). Verifica-se deslocamento das bandas Soret e Q em direção ao vermelho, interpretado como acoplamento excitônico resultante da agregação da hematina, além da diminuição da intensidade da banda Soret, ambos os efeitos resultantes da agregação e precipitação da hematina.

Ainda neste trabalho, deslocamento da banda Q de 612 para 649 nm é apontado como característico da formação de agregados. É possível notar ainda, a presença de uma banda de transferência de carga, pequena e larga, a 867 nm, tanto no espectro da hemina como no espectro da β -hematina, a qual parece deslocar-se em direção ao vermelho à medida que ocorre a acidificação da hemina para a formação da β -hematina. Nesta última, a banda a 867 nm encontra-se diminuída, provavelmente devido à formação de precipitados (Figura 43) (Wood *et al.*, 2004).

Figura 43 - Espectro de absorvância na região de 300 a 900 nm, durante acidificação da solução de hematina, adaptado de Wood *et al.*, 2004.

Com o objetivo de examinar o comportamento e estabilidade da hematina em solução, um estudo cinético da solução de hematina foi realizado nos dois pH, 5,5 e 7,4, com leituras a cada 15 minutos. A hematina possui duas bandas fortes denominadas Soret, em cerca de 360 e 390 nm, que diminuem de intensidade desde os primeiros minutos. A Figura 40 mostra que o equilíbrio é atingido em poucos minutos, em três diferentes soluções-tampão.

Figura 40 – Espectros eletrônicos da hematina em (A) pH 7,4, (B) pH 5,5 em solução de HCl e (C) pH 5,5 em solução-tampão com metanol. Estudo cinético com leituras a cada 15 minutos por período de 2 horas.

A figura 41 mostra o comportamento distinto da hematina em solução, quando na presença de diferentes soluções-tampão. A presença do metanol na solução-tampão de pH 5,5 favorece a presença da hematina em seu estado monomérico, observada pela intensificação da banda em 393 nm. No entanto, neste mesmo pH, em solução-tampão fosfato há uma mudança do comportamento da hematina em

solução e conseqüente deslocamento do comprimento de onda para valores menores. Devido às diferenças de comportamento observadas e com a finalidade de superar as dificuldade de solubilidade da hematina em tampão 5,5, o uso das soluções-tampão neste mesmo pH foram substituídas por solução simples de HCl, a qual teve o seu pH ajustado para o valor 5,5. Diferença é observada ainda quando se compara solução-tampão fosfato em pH 7,4. Neste último, a menor intensidade da banda em 393 nm denota menor presença da espécie monomérica em solução.

Figura 41 – Comportamento da banda Soret em diferentes soluções-tampão de pH 5,5 e 7,4.

4.2.1.2. Estudo Cinético da Associação Composto-Hematina

Antes de dar início ao estudo para verificar a interação dos compostos **CPZ** e **DSP**, representantes dos núcleos fenotiazínico e iminodibenzílico, respectivamente, foram obtidos os espectros UV-VIS destes compostos isoladamente e comparados com aqueles reportados na literatura. As bandas características destes compostos encontram-se entre 200 e 350 nm como pode ser visto nas figuras 44, 45 e 46 e de forma resumida na tabela 16.

No estudo UV-VIS de associação entre os compostos **CQ**, **CPZ** e **DSP** com a hematina, observou-se um aumento da intensidade das bandas na região entre 200 e 350 nm, nos dois pHs 5,5 e 7,4, nas soluções-tampão contendo metanol e fosfato, respectivamente. Este efeito pode ser explicado pela somatória das bandas características destes compostos com as bandas da hematina (Figuras 44, 45, 46). Este efeito é bem mais sensível na associação hematina e **CQ**, devido à maior proximidade da banda em 330 nm da **CQ** e a banda Soret, em 360 nm.

Figura 44 – A) Espectros da banda Soret da hematina (azul), da **CQ** (vermelho) e da associação (verde) em A.1 (pH7,4) e A.2 (pH 5,5); B) Estudo cinético da associação **CQ** + heme, com duração de 2h (medições a cada 15 minutos), em B.1 (pH7,4) e B.2 (pH 5,5); C) Espectros da banda Q da hematina (verde), absorção da **CQ** (azul) e da associação (verde) em C.1 (pH7,4) e C.2 (pH 5,5).

Figura 45 – A) Espectros da banda Soret da hematina (azul), da **CPZ** (vermelho) e da associação (verde) em A.1 (pH7,4) e A.2 (pH 5,5); B) Estudo cinético da associação **CPZ** + heme, com duração de 2h (medições a cada 15 minutos), em B.1 (pH7,4) e B.2 (pH 5,5); C) Espectros da banda Q da hematina (verde), absorção da **CPZ** (azul) e da associação (verde) em C.1 (pH7,4) e C.2 (pH 5,5).

Figura 46 – A) Espectros da banda Soret da hematina (azul), da **DSP** (vermelho) e da associação (verde) em A.1 (pH 7,4) e A.2 (pH 5,5); B) Estudo cinético da associação **DSP** + heme, com duração de 2h (medições a cada 15 minutos), em B.1 (pH 7,4) e B.2 (pH 5,5); C) Espectros da banda Q da hematina (verde), absorção da **DSP** (azul) e da associação (verde) em C.1 (pH 7,4) e C.2 (pH 5,5).

Tabela 16 – Bandas de absorção dos compostos CQ, CPZ e DSP

Compostos	Bandas obtidas no estudo (nm)	Clarke* (nm)
CQ	257, 328, 343,5	257, 329, 343
CPZ	254, 306,5	255, 307
DSP	251, 276	251, 275

*Clarke, 2001.

Com relação às bandas Soret da hematina, verificou-se diminuição da intensidade quando na presença dos compostos, **CQ**, **CPZ** e **DSP**, nos dois pHs, porém mais notadamente no pH 5,5. No entanto, é importante considerar que, no tampão 5,5, a presença do metanol evita a formação de agregados em solução levando à maior concentração de espécies monoméricas (Kalkanidis *et al.* 2002; Egan 2007) e comportamento espectral distinto, como pode ser visto nos diferentes formatos da banda Soret das figuras 40 (cinética da hematina, nas soluções-tampão 5,5 e 7,4) e 41 (cinética da hematina na presença de diferentes soluções-tampão). Assim, a presença do metanol poderia influenciar a interpretação dos resultados.

Comparando as diferentes cinéticas, verifica-se que, tanto em pH 5,5 como em pH 7,4, a **CQ** promove um menor hipocromismo da banda Soret do que a **DSP**. Para a **CPZ**, a diminuição da intensidade da banda Soret é intermediária entre o observado para com a **CQ** ou **DSP**. Em adição, deslocamentos da banda Soret foram observados para os três compostos em pH 7,4, sugerindo que a interação composto-grupo heme causa mudanças na estrutura eletrônica da hematina (Tabela 17).

Sabendo que a presença do metanol evita a formação de agregados em solução (Kalkanidis *et al.*, 2002) o que poderia influenciar o comportamento dos compostos, estudo posterior foi realizado substituindo o tampão contendo metanol e acetato de sódio por solução aquosa de HCl de pH 5,5 (Figura 47). Os resultados obtidos mostraram-se diferentes daqueles obtidos em tampão com metanol, tais como as posições dos máximos das bandas da hematina (Tabela 17).

Figura 47 – A) Espectros UV-VIS da hematina (rosa), da **CQ** (preto) e da associação (outros) em solução de HCl a pH 5,5; B) Espectros UV-VIS da hematina (amarelo), da **CPZ** (preto) e da associação (rosa) em solução de HCl a pH 5,5; C) Espectros UV-VIS da hematina (amarelo), da **AQ-13** (preto) e da associação (azul) em solução de HCl a pH 5,5; D) Espectros UV-VIS da hematina (amarelo), da **DSP** (rosa) e da associação (azul) em solução de HCl a pH 5,5.

Tabela 17 – Deslocamento da banda Soret e Q da hematina na presença dos compostos **CQ**, **AQ-13**, **CPZ** e **DSP**.

	Soret	Q	Soret	Q	Soret	Q
	pH 7,4 (fosfato)		pH 5,5 (metanol)		pH 5,5 (solução HCl)	
Hematina	384	617	369	639,5	386,5	610
Hematina+ CQ	345,5	554,2	399	647	395,5	603,5
Hematina+ AQ-13	392	607	--	--	395,5	611
Hematina+ CPZ	342	517,5	398,5	642	385,5	608
Hematina+ DSP	386,5	616	399	649	366,5	637

Estes deslocamentos na banda Soret e Q permitem inferir que a aproximação da **CQ**, **CPZ** e **DSP**, afetam a estrutura eletrônica do anel porfirínico, de maneira semelhante ao que acontece com a β -hematina, como reportado por Wood (2004). Provavelmente, estes compostos devem impedir a formação de hemozoína por se interporem entre as ligações do átomo de ferro de uma hematina com o grupo carboxilato de outra hematina ou, se interporem entre as interações dos grupos carboxilatos de diferentes hematinas (ver figura 4 da hemozoína).

Desta forma, analisando os resultados obtidos, pode-se supor que os três compostos interagem com a hematina, mas de diferentes formas, como verificado pelos espectros UV-VIS. Por exemplo, todos os três (**CQ**, **CPZ** e **DSP**), promovem o hipocromismo da banda Soret, no entanto esta diminuição da intensidade não é igual para todos. Alargamentos das bandas relacionados a formação de agregados e os deslocamentos nas bandas Soret e Q também variam. Além disso, na presença da **CPZ**, em pH 7,4, as intensidades relativas das bandas Soret foram fortemente alteradas indicando que o equilíbrio monômero-dímero sugerido por Egan (2007) pode ser afetado com a interação. Estes resultados, aliado às características dos compostos em estudo obtidas por MM (item 4.1.2), fazem supor que a planaridade do anel quinolínico representa uma importante característica para a interação com a hematina (interação do tipo π - π) e desta forma, é provável que a aproximação da **CQ** aconteça de maneira mais efetiva do que para os outros compostos **CPZ** e **DSP**, os quais devido a ausência de planaridade de seus anéis, não interagem π - π como dímero μ -oxo da hematina.

Assim como nos espectros obtidos em metanol, todos os compostos na presença da hematina, em solução de HCl, promoveram o hipocromismo da banda Soret indicando a interação deste compostos com a hematina. Para a **CQ**, o perfil da banda deste abaixamento da banda Soret, em direção ao azul, foi mantido (de 369 nm da hematina sozinha em solução-tampão com metanol para 399 nm na presença da **CQ** e de 386,5 nm da hematina sozinha em solução de HCl para 395,5 nm na presença da **CQ**). No entanto para a banda Q verifica-se um comportamento diferente, no qual em presença do metanol a banda da hematina desloca de 639,5 para 647 nm na presença da **CQ** e em solução de HCl este deslocamento ocorre em direção oposta: de 610 para 603,5 nm. De acordo com Wood e colaboradores (2004), o deslocamento da banda Q em direção ao azul é característico da formação de agregados e neste caso, poderia indicar o favorecimento da interação do dímero μ -oxo com a **CQ** na solução de HCl.

Da mesma forma que é visto para a **CQ**, o hipocromismo da banda Soret causado pela **CPZ** em solução-tampão de metanol, promove o deslocamento desta banda de 369 para 398,5 nm. Porém em solução de HCl, apesar do hipocromismo, este deslocamento é praticamente inexistente (de 386,5 para 385 nm). Deslocamentos são pouco vistos também para a banda Q: em metanol de 639,5 para 642 nm e em solução de HCl de 610 para 608 nm. Isto poderia indicar uma interação mais fraca desta molécula quando comparado a **CQ**. Este resultado concorda com aquele obtido no estudo de ancoramento do programa Spartan, onde, em ambas as formas do dímero μ -oxo da hematina, a **CPZ** apresenta uma interação mais fraca pela aproximação do átomo de enxofre com o ferro.

A **DSP** promove o deslocamento da banda Soret de 369 para 399, em solução-tampão de metanol. Deslocamento em direção oposta é visto para a solução de HCl (de 386,5 para 366,5 nm). Deslocamento também é bastante visível na banda Q: em metanol de 639,5 para 649 nm e em solução de HCl de 610 para 637 nm. É importante notar que, de acordo com os estudos de MM, este composto, apresenta maior contato do seu anel iminodibenzílico (dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato), apesar de não haver planaridade, nem formar interação do tipo π - π , ou, ao menos, ter interação da sua cadeia lateral (dímero μ -oxo da hematina na forma ácido carboxílico) com o anel porfirínico da hematina. Isto é indicativo de uma

maior estabilidade do complexo formado, quando comparado à **CPZ**, mas, por sua estrutura, não é tão eficiente em evitar a formação da hemozoína.

4.2.2. Estudo Comparativo da Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Raman Ressonante

Os espectros Raman não seriam possíveis de serem obtidos nas condições de trabalho, pois a secção de choque do espalhamento Raman é baixa. Portanto, os espectros da hematina e de sua associação com a **CQ**, **CPZ** e **DSP** em solução só foram possíveis com a intensificação do sinal pelo efeito do Raman ressonante, radiação excitante com energia próxima à energia de transição eletrônica da molécula (Wood *et al.*, 2007). Por este motivo, apenas o espectro da hematina é observado, pois este composto possui transições no visível (bandas Soret e Q).

Diferenças significativas nos espectros da hematina isolada e desta na presença dos compostos foram observadas para os pHs de 7,4 e 5,5, devido às intensificações das bandas atribuídas aos modos de simetria A_{1g} quando a radiação excitante encontrava-se em ressonância com as bandas Soret ($\lambda_0 = 488,0$ ou $514,5$ nm) (Figura 53 e 54). (Spiro *et al.*, 1982).

Figura 53 – Espectros Raman ressonante da hematina isolada e na presença de **CQ**, **DSP**, **AQ-13** e **CPZ**, em tampão 7,4, considerando $\lambda_0 = 488,0$ nm

Figura 54 – Espectros Raman ressonante da hematina isolada e na presença de **CQ**, **DSP**, **AQ-13** e **CPZ**, em solução de HCl a pH 5,5, considerando $\lambda_0 = 488,0$ nm.

Utilizando radiação excitante de 488 nm, em ambos os pHs, por todo o espectro da hematina na presença da **CQ**, observa-se alargamento aparente das bandas, principalmente na região entre 1.500 e 1.700 cm^{-1} , que pode ser associado à mudanças nas intensidades relativas das bandas atribuídas aos vários modos vibracionais presentes nesta envoltória (Frosch *et al.*, 2004). Pequenas alterações na posição dos picos são indicativas de uma possível interação do tipo π - π (Frosch *et al.*, 2004).

Este padrão espectral observado para a interação **CQ**-hematina foi diferente do observado na interação com os outros compostos **CPZ** e **DSP**. Tanto no pH 5,5 (Figura 53) como no pH 7,4 (Figura 54), os espectros destes últimos apresentam-se mais próximos do espectro da hematina isolada. Além disso, o deslocamento da banda em 403 cm^{-1} , atribuída a um modo vibracional fora do plano envolvendo o átomo de ferro (Brémard *et al.*, 1993), para 415 nm nas associações hematina-**CPZ** e hematina-**DSP**, sugere que este sítio da hematina é sensível às interações com os respectivos compostos. No caso da interação hematina-**DSP**, esta alteração poderia se dar pela proximidade do átomo de nitrogênio do anel iminodibenzílico (N_1) de maior densidade eletrônica (carga= $-0,55$ ua) de maior densidade eletrônica ao átomo de ferro da hematina. No estudo de ancoramento realizado no programa Spartan foi possível observar que o átomo de nitrogênio do anel iminodibenzílico

(N₁) da **DSP** encontra-se sobre o átomo de ferro do dímero μ -oxo da hematina tanto na forma carboxilato (distância N₁-Fe = 5,594 Å), como na forma de ácido carboxílico (distância N₁-Fe = 5,463 Å), apesar de estas distâncias serem maiores do que a de uma ligação covalente típica (Mealli & Lingafelter, 1970)

Com relação à interação hematina-**CPZ**, esta poderia ocorrer entre os heteroátomos do anel fenotiazínico, enxofre ou nitrogênio (N₁) com o átomo de ferro da hematina. O átomo de enxofre (carga= -0,04), estaria favorecido devido ao seu maior volume e a presença de orbitais tipo d, o que facilitaria a aproximação ao átomo de ferro, interferindo na distribuição de cargas de suas ligações. Esta possibilidade estaria de acordo com os resultados do estudo de ancoramento obtidos no programa Spartan. No entanto, o átomo de nitrogênio (N₁) do anel fenotiazínico poderia ser preferível ao átomo de enxofre nesta interação por apresentar maior densidade eletrônica (N₁=-0,46 ua). Entretanto no programa GOLD, No programa GOLD, o átomo de nitrogênio (N₁) do anel fenotiazínico mostra-se mais próximo do átomo de ferro do dímero μ -oxo da hematina (4,39 Å) do que o átomo de enxofre (5,17 Å).

Em nenhum dos espectros foi verificada mudança na banda em 1.373 cm⁻¹, indicando que a valência do átomo de Fe^{II} (Spiro & Turner, 1983) foi preservada na interação do grupo heme com os três compostos.

É importante considerar a dificuldade encontrada na busca de um tampão 5,5 capaz de solubilizar a hematina e que, na presença do laser, evitasse sua agregação, por motivo da instabilidade característica dos derivados do grupo heme (Egan, 2006). Associa-se a isto o fato de as soluções usadas no estudo de Raman ressonante serem mil vezes mais concentradas (item 3.6) que aquelas empregadas no UVVIS.

O tampão 5,5 composto por metanol a 43% e acetato de sódio a 10 mM (solução 1) foi o primeiro a ser utilizado, de forma análoga ao estudo cinético de UVVIS realizado por Kalkanidis e colaboradores (2002). No entanto, em maior concentração da hematina bem como em presença dos compostos **CQ**, **CPZ** e **DSP** a solução formava agregados e, por este motivo, esta solução-tampão não se mostrou adequada para dar continuidade ao estudo. De maneira geral, os estudos contendo grupo heme fazem uso de tampões contendo soluções aquosas de dimetilsulfóxido (DMSO) (Blauer & Akkawi, 1997; Egan *et al.*, 1997; Egan *et al.*,

1999; Vippagunta *et al.*, 1999) para solubilizá-lo, o qual não é adequado para ser utilizado no RR, uma vez que o espectro do DMSO poderia confundir-se com o espectro das amostras.

Outros tampões 5,5 foram então pesquisados e testados com a hematina e compostos. O ideal era que as substâncias presentes no tampão não apresentassem sinal intenso nos espectros Raman. Outro tampão formado por ácido fosfórico, ácido acético e ácido bórico, apesar de solubilizar o grupo heme, mesmo na presença do laser, não proporcionou leitura da amostra no espectro de RR. Tampões a base de cloreto de sódio e ácido cítrico ou ácido bórico (Zhao *et al.*, 2005), não foram capazes de solubilizar o grupo heme. Já os tampões compostos por cloreto de sódio e acetato de sódio ou difosfato de potássio (Zhao *et al.*, 2005) solubilizaram o grupo heme, no entanto ambos não evitaram a agregação dos compostos na presença do laser. Neste último, as únicas leituras obtidas foram para a hematina pura e na presença da **CQ** (figura 51). Porém, devido à agregação, estes espectros não puderam ser acumulados e a relação sinal/ruído ficou baixa. Os espectros do heme nos pHs 7,4 e 5,5 mostraram-se semelhantes, já que a protonação dos grupos carboxilatos são bandas fracas (Hu *et al.*, 1996). Por fim, para a dissolução do heme e a obtenção dos espectros (discutidos anteriormente) foi utilizada uma solução de HCl em pH 5,5 (solução 3).

Figura 55- Espectro Raman ressonante da hematina isolada e na presença da **CQ**, em tampão fosfato 5,5. ($\lambda_0 = 488,0$ nm)

4.2.3. Estudo Comparativo da Afinidade de Complexação Composto-hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível

O surgimento do composto **RCQ** (Burguess *et al.*, 2006) lançou-nos a idéia de modelar o composto análogo **RCQ-CPZ** e verificar qual dos núcleos, quinolínico (**CQ**), fenotiazínico (**CPZ**) ou iminodibenzílico (**IMP**), quando presentes conjuntamente, teria maior afinidade pelo grupo heme. Com esta finalidade, um diferente estudo de UVVIS foi realizado. Neste estudo a **DSP** foi substituída pela **IMP**, que são compostos parecidos estruturalmente e possuem espectros eletrônicos semelhantes (Figura 48).

Figura 48- Espectro UV-VIS dos compostos **DSP** e **IMP** em solução aquosa x mol/L, pH 7,4.

Primeiramente, foram obtidos os espectros dos compostos separados e associados (**CQ+CPZ** e **CQ+IMP**) (Figura 49) na região entre 400 e 700 nm. Em concordância com nossos objetivos, os pHs de 7,4 e 5,5 foram avaliados. Os espectros da interação foram, então, comparados com a soma dos espectros dos compostos isolados (obtida pelo programa Grams) e alterações nas intensidades relativas das bandas resultantes na faixa de 200 a 300 nm foram observadas. Tal observação indica que a **CPZ** e **IMP** provavelmente formam algum tipo de interação com a **CQ** (Figura 50). As diferentes localizações dos orbitais moleculares de HOMO e de LUMO obtidos por modelagem molecular (item 4.1.1.4) corroboram esta afirmativa, estando o mapa orbitalar de LUMO sobre o anel quinolínico enquanto que o mapa orbitalar de HOMO localiza-se sobre o anel fenotiazínico ou iminodibenzílico.

Figura 49 - Espectros UV-VIS em pH 7,4 indicando interação entre (A) **CQ** e **CPZ**; (B) **CQ** e **IMP**.

Figura 50 - Espectros na região do ultravioleta-visível em pH 5,5 indicando interação entre (A) **CQ** e **CPZ**; (B) **CQ** e **IMP**.

Em etapa posterior a associação dos compostos **CQ** + **CPZ** e **CQ** + **IMP** foi colocada na presença da hematina, verificando-se o abaixamento das bandas Soret. No entanto, para descobrir qual composto interagia em maior proporção com a hematina, espectro obtido foi comparado a três diferentes possibilidades de espectros somados no programa GRAMS. Assim, como descrito na metodologia, somou-se o espectro da **CQ** + hematina ao espectro da **CPZ** isolada ((**CQ**+hematina) + **CPZ**), o espectro da **CPZ** + hematina ao espectro da **CQ** ((**CPZ**+hematina) + **CQ**) e o espectro da **CQ** + **CPZ** ao espectro da hematina ((**CQ**+**CPZ**) + hematina). O perfil das bandas destas diferentes possibilidades foi comparado ao espectro experimental da mistura dos três compostos **CQ** + **CPZ** +

hematina (Figura 51). O mesmo raciocínio foi utilizado para a associação **CQ+DSP+hematina** (Figura 52).

Figura 51 - Espectro UV-VIS da mistura **CQ**, **CPZ** e hematina (azul em A; vermelho em B) nos pHs (A) 7,4 e (B) 5,5, e demais curvas obtidas pela soma no GRAMS.

Figura 52 - Espectro UV-VIS da mistura **CQ**, **IMP** e hematina (preto em A; verde em B) nos pHs (A) 7,4 e (B) 5,5, e demais curvas obtidas pela soma no GRAMS.

Na análise dos espectros, verifica-se semelhanças no perfil e nas intensidades relativas das bandas entre o espectro experimental da mistura ternária e a curva obtida pela somatória do espectro hematina+**CQ** com o espectro do outro composto isolado (**CPZ** ou **IMP**), como por exemplo:

(1) em ambos os pHs é comum o padrão de intensidades relativas entre as bandas da **CQ** a 331 nm e 343 nm no espectro da mistura **CQ+CPZ**+hematina e na soma dos espectros da mistura **CQ**+hematina e da **CPZ**;

(2) da mesma forma, isto foi observado no estudo envolvendo a **IMP**.

(3) os deslocamentos da banda Soret para 395 cm^{-1} também são comuns nestas mesmas curvas.

De acordo com esta análise sugere-se que a hematina tenha maior afinidade pelo anel quinolínico da **CQ** do que pelo anel fenotiazínico da **CPZ** e iminodibenzílico da **IMP**. No entanto, a **CPZ** e **IMP** podem também formar algum tipo de interação com a **CQ** ou com o complexo **CQ**-hematina, pois os espectros analisados não são exatamente iguais.

4.2.4. Estudo da Complexação do AQ-13 com a Hematina por Espectroscopia Ultravioleta-visível e Raman Ressonante

A introdução da molécula do **AQ-13**, análogo da **CQ** de cadeia lateral simplificada, nos estudos de MM, nos motivou a inclusão e análise também de seus espectros nos estudos espectroscópicos. Estes foram realizados em solução de tampão fosfato (pH 7,4) e juntamente com as novas leituras da **CQ**, **CPZ** e **DSP** em solução de HCl (pH 5,5). Assim, como nos demais compostos, hipocromismo da banda Soret e deslocamentos das bandas Soret e Q das bandas da hematina, quando na presença do **AQ-13**, também foram verificadas, indicando mudanças na estrutura eletrônica da hematina.

Para o **AQ-13**, o hipocromismo da banda Soret também indica interação deste composto com a hematina. Neste é possível verificar perfil semelhante do deslocamento desta banda (de 386,5 para 395 nm) quando comparado a **CQ** indicando que o **AQ-13** deve ser sentida pela nuvem eletrônica da hematina de forma semelhante à **CQ**. No entanto, a presença do **AQ-13** praticamente não promove o deslocamento da banda Q (de 610 para 611 nm), diferentemente do que é visto para a **CQ** (610 para 603,5 nm). No entanto, é importante considerar os resultados obtidos no estudo de ancoramento, no qual a **CQ** e o **AQ-13** apresentaram um perfil de interação próximo, mas não igual, para o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato (Figura 36) nos resultados obtidos pelo programa Spartan e nos resultados obtidos pelo programa GOLD (Figura 39) (forma de ácido carboxílico do dímero μ -oxo da hematina).

No estudo de RR, o **AQ-13**, manteve comportamento semelhante a esta última, apresentando alargamento de bandas, em especial na região entre 1.500 e

1.700 cm^{-1} , tanto no pH 5,5 (Figura 53) como no pH 7,4 (Figura 54), o que pode ser indicativo de interação do tipo π - π da mesma forma que a **CQ**. Estes resultados mostram-se coerentes com os resultados de MM os quais indicam a predominância da interação π - π entre a **CQ** e o **AQ-13** (programas Spartan e GOLD) e o dímero μ -oxo da hematina na forma carboxilato, exceção observada para o dímero na forma de ácido carboxílico.

(Nota da BCQ: As figuras 53 e 54 estão nas páginas 154 e 155, respectivamente e não existe a página 163)

5. CONCLUSÕES

- ✓ De maneira geral, a modelagem molecular indica perfil semelhante entre os compostos tricíclicos estudados, aqui representados pelo fenotiazínico **CPZ** e iminodibenzílicos **DSP** e **IMP**, com a **CQ**.
- ✓ No entanto, algumas particularidades merecem atenção:
 - (1) Compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos apresentam sistemas aromáticos não planares enquanto planaridade é observada para o anel quinolínico da **CQ**. Tal característica estérica pode representar um importante fator na aproximação e interação de compostos tricíclicos com o grupo heme;
 - (2) Maior densidade eletrônica sobre o anel heteroaromático é observada para os compostos tricíclicos, em especial os fenotiazínicos que apresentam maior valor de EHOMO, comprovado por resultados eletroquímicos de potências de oxidação;
 - (3) Outra característica relevante diz respeito à distribuição do orbital de LUMO sobre o anel quinolínico nas formas monoprotonada e diprotonada da **CQ** e **AQ-13**, diferente do que se verifica para os demais compostos.
- ✓ Na análise das propriedades físico-químicas da **Série 2** verificam-se semelhanças a variações das propriedades físico-químicas e superfícies eletrônicas com os compostos da **Série 1**. A relação de tais características com a atividade biológica destes compostos mostra que a atividade antimalárica e moduladora de resistência crescem paralelamente e isto pode explicar a atividade antimalárica dos compostos da **Série 1** em cepas brasileiras de *P. falciparum* resistentes á **CQ**.
- ✓ Entre os compostos analisados como protótipos a agentes antimaláricos (**TRD** e **T-CPZ**) e agentes antimaláricos em desenvolvimento (**AQ-13**, **RCQ** e **RCQ-CPZ**), mostraram características estruturais semelhantes às da **Séries 1** e **2**, o que justificaria a continuidade das pesquisas para seus respectivos fins.
- ✓ A análise das geometrias e das variações de energia de formação dos complexos obtidas pelos estudos de ancoramento com o dímero μ -oxo da hematina corroboraram dados de literatura quanto ao modo de interações do tipo π - π do

complexo **CQ**-hematina e indicaram a possibilidade de interação, por modo diferente, dos compostos tricíclicos fenotiazínicos e iminodibenzílicos.

- ✓ No estudo de espectroscopia UVVIS empregando-se pHs de 7,4 e 5,5, observa-se, em semelhança ao que acontece com a **CQ**, hipocromismo das bandas *Soret* e deslocamentos da banda Q, o que sugere a interação dos compostos fenotiazínicos e iminodibenzílicos, representados neste estudo respectivamente pela **CPZ** e **DSP** e **IMP** com a hematina. No entanto, análise competitiva entre os diferentes núcleos, **CQ** + **CPZ** e **CQ** + **IMP**, indicou a maior afinidade do anel quinolínico pela hematina.
- ✓ Presença de interação entre os três compostos com a hematina é evidenciada no estudo espectroscópico de Raman Ressonante o qual fornece informações adicionais apontando serem estas interações diferentes. Associa-se a estas observações, a ausência de planaridade observada nos respectivos anéis quando comparados ao anel quinolínico da **CQ**.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Ademowo, O.G.; Nneji, C.M.; Adedapo, A.D. *In vitro* antimalarial activity of methylene blue against field isolates of *Plasmodium falciparum* from children in Southwest Nigeria. *Indian J. Med. Res.*, v.126, p.45-49, 2007.

Alibert, S.; Rouvier, C.S.; Pradines, B.; Houdoin, C.; Parzy, D.; Karolak-Wojciechowska, J., Barbe, J. Synthesis and effects on chloroquine susceptibility in *Plasmodium falciparum* of a Series of new diidroanthracene derivatives. *J. Med. Chem.*, v.45, p.3195-3209, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Mapa epidemiológico da malaria no Brasil*, 2005. www.anvisa.gov.br/paf/viajantes/malaria.htm, acessado em 18/11/07.

Amaral, L.; Viveiros, M.; Kristiansen, J.E. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. *Trop. Med. Int. Health*, v.6, p.1016-1022, 2001.

Amaral, L.; Engi, H.; Viveiros, M.; Molnar, J. Comparison of multidrug resistant efflux pumps of cancer and bacterial cells with respect to the same inhibitory agents. *In Vivo*, v.21, p.237-244, 2007a.

Amaral, L.; Martins, M.; Viveiros, M. Phenothiazines as anti-multi-drug resistant tubercular agents. *Infect. Disord. Drug Targets*, v.7, p.257-265, 2007b.

Araújo, M.V.G.; Vieira, E.K.B.; Lázaro, G.S.; Conejero, L.S.; Ferreira, O.P.; Almeida, E.; Barreto, L.S.; Costa, N.B.; Gimenez, I.F. Inclusion complexes of pyrimethamine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Characterization, phase solubility and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem.*, v.15, p.5752-5759, 2007.

Bacilieri, M.; Varano, F.; Deflorian, F.; Marini, M.; Catarzi, D.; Colotta, V.; Filacchioni, G.; Galli, A.; Costagli, C.; Kaseda, C.; Moro, S. Tandem 3D-QSARs approach as a valuable tool to predict binding affinity data: design of new

Gly/NMDA receptor antagonists as a key study. *J. Chem. Inf. Model.* v.47, p.1913 - 1922, 2007.

Balasubramanian, D.; Rao, C.M.; Panijpan, B. The malaria parasite monitored by photoacoustic spectroscopy. *Science*, v.223, p. 828–830, 1984.

Barreiro, E.J.; Rodrigues, C.R.; Albuquerque, M.G.; Sant'Anna, C.M.R.; Alencastro, R.B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em Química Medicinal. *Quim. Nova*, v.20, p.300-310, 1997.

Bhattacharjee, A.K.; Karle, J.M. Molecular electronic properties of a series of 4-quinolinecarbinolamines define antimalarial activity profile. *J. Med. Chem.*, v.39, p.4622-4629, 1996.

Bhattacharjee, A.K.; Karle, J.M. Functional correlation of molecular electronic properties with potency of synthetic carbinolamine antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem.*, v.6, p.1927-1933, 1998.

Bhattacharjee, A.K.; Kyle, D.E.; Vennerstrom, J.L. Structural analyses of chloroquine resistance reversal by imipramine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p.2655-2657, 2001.

Bhattacharjee, A.K.; Kyle, D.E.; Vennerstrom, J.L.; Milhous, W.K. A 3D-QSAR pharmacophore model and quantum chemical structure-activity analysis of chloroquine (CQ)-resistance reversal. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v.42, p.1212-1220, 2002.

Biagini, G.A.; O'Neill, P.M.; Nzila, A.; Ward, S.A.; Bray, P.G. Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future? *Trends Parasitol.*, v.19, p.479-487, 2003.

Biagini, G.A.; O'Neill, P.M.; Bray, P.G.; Ward, S.A. Current drug development portfolio for antimalarial therapies. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.5, p.473-478, 2005.

Biava, M.; Porreta, G.C.; Poce, G.; Supino, S.; Forli, S.; Rovini, M.; Cappelli, A.; Manetti, F.; Botta, M.; Sautebin, L.; Rossi, A.; Pergola, C.; Ghelardini, C.; Vivoli, E.; Makovec, F.; Anzellotti, P.; Anzini, M. Cyclooxygenase-2 inhibitors. 1,5-Diarylpyrrol-3-acetic esters with enhanced inhibitory activity toward cyclooxygenase-2 and improved cyclooxygenase-2/cyclooxygenase-1 selectivity. *J. Med. Chem.*, v.50, p.5403-5411, 2007.

Bitonti, A.J.; Sjoerdsma, A.; McCann, P.P., Kyle, D.E.; Oduola, A.M.J.; Rossan, R.N.; Milhous, W.K.; Davidson Jr., D.E. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science*, v.242, p.1301-1303, 1988.

Bominaar, E.L.; Ding, X.Q.; Gismelseed, A.; Bill, E.; Winkler, H.; Trautwein, A.X.; Nasri, H.; Fischer, J.; Weiss, R. Structural, mossbauer, and epr investigations on two oxidation states of a five-coordinate, high-spin synthetic heme. Quantitative interpretation of zero-field parameters and large quadrupole splitting. *Inorg. Chem.*, v.31, p.1845-1854, 1992.

Booth, R.G.; Neumeyer, J.L. Psychotherapeutic drugs: antipsychotic and anxiolytic agents. In: Williams, D.A.; Lemke, T.L. (Eds.). *Foye's principles on medicinal chemistry*. 5 ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p.408-433.

Bray, P.G.; Martin, R.E.; Tilley, L.; Ward, S.A.; Kirk, K.; Fidock, D.A. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.*, v. 56, p. 323-333, 2005a.

Bray, P.G.; Deed, S.; Fox, E.; Kalkanidis, M.; Mungthin, M.; Deady, L.W.; Tilley, L. Primaquine synergises the activity of chloroquine-resistant *P. falciparum*. *Biochem. Pharmacol.*, v.70, p.1158-1166, 2005b.

Bridgeman, A.J. Theoretical organometallic chemistry. *R. Soc. Chem.*, v.32, p.1-38, 2005.

Burgess, S.J.; Selzer, A.; Kelly, J.X.; Smilkstein, M.J.; Riscoe, M.K.; Peyton, D.H. A chloroquine-like molecule designed to reverse resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.*, v.49, p.5623-5625, 2006.

Bustamante, J.M.; Presti, M.S.; Rivarola, H.W.; Fernández, A.R.; Enders, J.E.; Fretes, R.E.; Paglini-Oliva, P. Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.29, p.733-737, 2007.

Camargo, A.B.; Marchevsky, E.; Luco, J.M. QSAR study for the soybean 15-lipoxygenase inhibitory activity of organosulfur compounds derived from the essential oil of garlic. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.3096-3103, 2007.

Carvalho, A.S.; Menna-Barreto, R.F.; Romeiro, N.C.; de Castro, S.L.; Boechat, N. Design, synthesis and activity against *Trypanosoma cruzi* of azaheterocyclic analogs of megalin. *Med. Chem.*, v.3, p.460-465, 2007.

Carvalho, I.; Pupo, M.T.; Borges, A.D.L.; Bernardes, L.S.C.; Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova*, v. 26, p. 428-438, 2003.

Casarotto, M.G.; Craik, D.J. Ring flexibility within tricyclic antidepressant drugs. *J. Pharm. Sci.*, v.90, p.713-721, 2001.

Cheruku, S.R.; Maiti, S.; Dorn, A.; Scoreaux, B.; Bhattacharjee, A.K.; Ellis, W.Y.; Vennestrom, J.L. Carbon isosteres of the 4-aminopyridine substructure of

chloroquine: effects on pKa, hematin binding, inhibition of hemozoin formation, and parasite growth. *J. Med. Chem.*, v.46, p.3166-3169, 2003.

Clarke, E.G.C. *Isolation and identification of drugs*: in pharmaceutical, body fluids and post-mortem material. 2nd. ed., London: Pharmaceutical Press, 1986. 1223p.

Costa, M.S.; Kiralij, R.; Ferreira, M.M.C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. *Quim. Nova*, v.30, p.25-31, 2007.

Craig, P.N. Drug compendium. In: Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B. (Eds.) *Comprehensive medicinal chemistry*. vol. 6. Oxford: Pergamon Press, 1990, p. 373.

Dahl, S.G.; Sylte, I. Molecular modelling of drug targets: the past, the present and the future. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.96, p.151-155, 2005.

Deleenhe, A.; Heyndric, A. Identification of phenothiazine derivatives and analogs by X-ray diffracttion. 1. Examination of pure compounds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.54, p.625, 1971.

De, D.; Krogstad, F.M.; Byers, L.D.; Krogstad, D.J. Structure-activity relationships for antiparasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *J. Med. Chem.*, v.41, p.4918-4926, 1998.

Dewar, M.J.S.; Zebisch, 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.

Dhilon, S.; Patel, D.S.; Bharatam, P.V. Selectivity criterion for pyrazolo[3,4-b]pyrid[az]ine derivatives as GSK-3 inhibitors: CoMFA and molecular docking studies. *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, em impressão.

Dios, A.C.; Tycko, R.; Ursos, L.M.B.; Roepe, P.D. J. NMR studies of chloroquine-ferriprotoporphyrin IX complex. *Phys. Chem. A*, v.107, p. 5821–5825, 2003.

Domínguez, J.N.; López, S.; Charris, J.; Iarruso, L.; Lobo, G.; Semenov, A.; Olson, J.E.; Rosenthal, P.J. Synthesis and antimalarial effects of phenothiazine inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine protease. *J. Med. Chem.*, v.40, p.2726-2732, 1997.

Drake, N.L.; Creech, H.J.; Garman, J.A.; Haywood, S.T.; Peck, R.M.; Van Hook, J.O.; Walton, E. Synthetic antimalarials. The preparation of certain 4-aminoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.*, v.68, p.1208-1213, 2006.

Duraisingh, M.T.; Cowman, A.F. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.*, v.94, p.181-190, 2005.

Egan T.J. Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials. *Min. Rev. Med. Chem.*, v.1, p.113-123, 2001.

Egan, T.J. Interactions of quinoline antimalarials with hematin in solution. *J Inorg. Biochem.*, v.100, p.916-926, 2006.

Egan, T.J.; Kaschula, C.H. Strategies to reverse drug resistance in malaria. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.20, p.598-604, 2007.

Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B.B. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *J. Pharmacol.*, v.152, p.21-37, 2007.

Elueze, E.I.; Croft, S.L.; Warhurst, D.C. Activity of pyronaridine and mepacrine against twelve strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.37, p.511-518, 1996.

Faria, D.L.A.; Santos, P.S. Pre-resonance Raman effect of solid-state phenothiazine. *J.Raman Spectrosc.*, v.25, p.453-456, 1994.

Ford, J.M.; Hait, W.N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.*, v.42, p.155-199, 1990.

Frosch, T.; Küstner, B.; Schlücker, S.; Szeghalmi, A.; Schmitt, M.; Kiefer, W.; Popp, J. *In vitro* polarization-resolved resonance Raman studies of the interaction of hematin with the antimalarial drug chloroquine. *J. Raman Spectrosc.*, v.35, p.819-821, 2004.

Furuseth, S.; Karlsen, J.; Mostad, A.; Romming, C.; Salmen, R.; Tonnesen, H.H. N4-(7-chloro-4-quinoliny)-N1,N1-diethyl-1,4-pentanediamine: an X-ray-diffraction study of chloroquine diphosphate hydrate. *Acta Chem. Scand.*, v.44, p.741-745, 1990.

Garavito, G.; Bertani, S.; Rincon, J.; Maurel, S.; Monje, M.C.; Landau, I.; Valentin, A.; Deharo, E. Blood schizontocidal activity of methylene blue in combination with antimalarials against *Plasmodium falciparum*. *Parasite*, v.14, p.135-140, 2007.

Geary, T.G.; Divo, A.A.; Jensen, J.B. Effect of calmodulin inhibitors on viability and mitochondrial potential of *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.30, p.785-788, 1986.

Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.*, v.103, p.1793-1873, 2003.

Gelb, M.H. Drug discovery for malaria: a very challenging and timely endeavor. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.11, p.440-445, 2007.

Ghose, A.K.; Pritchett, A.; Crippen, G.M. Atomic physicochemical parameters of three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. III. Modeling hydrophobic interactions. *J. Comput. Chem.*, v.9, p.80-90, 1988.

Giacotto, C.; Santerre, R.E.; Vernon, J.A. Drug prices and research and development investment behavior in the pharmaceutical industry. *J. Law Econom.*, v.48, p.195-214, 2005.

Ginsburg, H.; Krugliak, M. Chloroquine - some open questions on its antimalarial mode of action and resistance. *Drug Res. Updat.*, v.2, p.180-187, 1999.

Ginsburg, H. Should chloroquine be laid to rest? *Acta Tropica*, v.96, p.16-23, 2005.

Guan, J.; Kyle, D.E.; Gerena, L.; Zhang, Q.; Milhous, W.K.; Lin, A.J. Design, synthesis, and evaluation of new chemosensitizers in multi-drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.*, v.45, p.2741-2748, 2002.

Gund, P.; Maggiora, G.; Synder, J.P. Computer-assisted drug discovery. In: Cohen, N.C. (Ed.) *Guidebook on molecular modeling in drug design*. London: Academic Press, 1996. p.219-233.

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.

Halgren, T.A. Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *J. Comput. Chem.*, v.17, p.616-641, 1998.

Hay, S.I.; Snow, R.W. The Malaria Atlas Project: developing global maps of malaria risk. *PLoS Med.*, v.3, p.2204-2208, 2006.

Hayward, R.; Saliba, K.J.; Kirk, K. *pfmdr1* mutations associated with chloroquine resistance incur a fitness cost in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.*, v.55, p.1285-1295, 2006.

Hehre, W.J.; Yu, J.; Klunzinger, P.E.; Lou, L. A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations. In: Hehre, W.J.; Yu, J.; Klunzinger, P.E.; Lou, L. (Eds.). *Quantum chemical models*. Irvine: Wavefunction Inc., 1998. p. 219-233.

Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Olsen, J.; Klopper, W. Wave function-based quantum chemistry. In: Bultinck, P.; De Winter, H.; Langenaeker, W.; Tollenaere, J.P. *Computational medicinal chemistry*. New York: Marcel Dekker, 2004. p.57-88.

Henckel, J.G.; Billings, E.M. Molecular modeling. In: Foye, W.O.; Lemke, T.L.; Williamns, D.A. (Eds.). *Principles of medicinal chemistry*. 4th. ed., Media: Williams & Wilkins, 1995. p.57-58.

Henry, M.; Alibert, S.; Orlandi-Pradines, E.; Bogreau, H.; Fusai, T.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B. Chloroquine resistance reversal agents as promising antimalarial drugs. *Curr. Drug Targets*, v.7, p.935-948, 2006.

Honegger, U.E.; Roscher, A.A.; Wiesmann, U.N. Evidence for lysosomotropic action of desipramine in cultured human fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v.225, p.436-441, 1983.

Höltje, H-D.; Folkers, G. Molecular modeling. Basic principles and applications. In: Manhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H. (Eds.). *Methods and principles in medicinal chemistry*. vol. 5. Weinheim: VCH, 1996. p.194.

Hu, S.; Smith, K.M.; Spiro, T.G. Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.*, v.118, p.12638-12646, 1996.

Ital, A.; Mizutani, M.Y.; Nishibata, Y.; Tomioka, N. Computer-assisted new lead design. In: Cohen, N.C. (Ed.). *Guidebook on molecular modeling drug design*. San Diego: Academic Press, 1996. p.93-137.

Jana, S.; Paliwal, J. Novel molecular targets for antimalarial chemotherapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.30, p.4-10, 2007.

Kaapro, A.; Ojanen, J. *Protein docking*: <http://www.lce.hut.fi/teaching/S-14.500/k2002/Protdock.pdf>, acessado em: 20/04/2004.

Kalkanidis, M.; Klonis, N.; Tilley, L.; Deady, L.W. Novel phenothiazine antimalarials: synthesis, antimalarial activity, and inhibition of the formation of β -haematin. *Biochem. Pharmacol.*, v.63, p.833-842, 2002.

Kanno, K.; Sasaki, Y. Interaction of physcotropic drugs with phospholipids. *Biochem. Pharmacol.*, v.31, p.2977-2981, 1982.

Kelly, J.X.; Smilkstein, M.J.; Cooper, R.A.; Lane, K.D.; Johnson, R.A.; Janowsky, A.; Dodean, R.A.; Hinrichs, D.J.; Winter, R.; Riscoe, M. Design, synthesis, and evaluation of 10-*N*-substituted acridones as novel chemosensitizers in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.51, p.4133-4140, 2007.

Korolkovas, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2nd. ed., New York: Wiley Interscience, 1988. p.120.

Kristiansen, J.E.; Jepsen, S. The susceptibility of *Plasmodium falciparum in vitro* to chlorpromazine and the stereoisomeric compounds *cis*(*Z*)- and *trans*(*E*)-clopenthixol. *Acta Pathol. Microb. Immunol. Scand.* (Section B), v.93, p.249-251, 1985.

Krogstad, D.J.; Gluzman, I.Y.; Kyle, D.E.; Oduola, A.M.; Martin, S.K.; Milhous, W.K.; Schlesinger, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*, v.238, p.1283-1285, 1987.

Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci.*, v.80, p.813-828, 2007.

Kure, B.; Morris, M.D. Raman spectra of phenothiazine and some pharmaceutical derivatives. *Talanta*, v.23, p.398-400, 1976.

Kurihara, T.; Satoh, R.; Miyagawa, T.; Wakabayashi, H.; Motohashi, N.; Sakagami, H. Relationship between electronic structure and cytotoxic activity of azulenequinones and trihaloacetylazulenes. *In Vivo*, v.21, p.715-720, 2007.

Jiang, H.; Joy, D.A.; Furuya, T.; Su, X-Z. Current understanding of the molecular basis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Postgrad Med.*, v.52, p.271-276, 2006.

Lakshmanan, V.; Bray, P.G.; Verdier-Pinard, D.; Johnson, D.J.; Horrocks, P.; Muhle, R.A.; Alakpa, G.E.; Hughes, R.H.; Ward, S.A.; Krogstad, D.J.; Sidhu, A.B.; Fidock, D.A. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J.*, v.24, p.2294-305, 2005.

Langer, T.; Eder, M.; Hoffmann, R.D.; Chiba, P.; Ecker, G.F. Lead identification for modulators of multidrug resistance based on *in silico* screening with a pharmacophoric feature model. *Arch. Pharm. Med. Chem.*, v.337, p.317-327, 2004.

Leach, A.R. *Molecular modelling*. Principles and applications. Longman: Singapore, 1996, p.595.

Leed, A.; DuBay, K.; Ursos, L.M.; Sears, D.; de Dios, A.C.; Roepe, P.D. Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry*, v.41, p.10245-10255, 2002.

Lokesh, C.M.; Bhattacharya, A.; Bhasin, V.K. Antiplasmodial interactions between artemisinin and triclosan or ketoconazole combinations against blood stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p.497-501, 2007.

Loewe, L. Global computing for bioinformatics. *Brief. Bioinform.*, v.3, p.377-388, 2002.

Madrid, P.B.; Sherrill, J.; Liou, A.P.; Weisman, J.L.; DeRisi, J.L.; Guy, R.K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.15, p.1015-1018, 2005.

Martin, S.K.; Oduola, A.M.J.; Milhous, W.K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*, v.235, p.899-901, 1987.

Marone, S.; Rozas, I.; Weaver, D.F. Theoretical structural analyses of tricyclic neuroactive drugs: quantum pharmacologic descriptors for clustering anticonvulsant, antidepressant, and antipsychotic activities. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v.467, p.25-30, 1999.

McDowell, J.J.H. The crystal and molecular structure of chlorpromazine. *Acta Cryst.*, B25, p.2175, 1969.

McNamara, J.P.; Sundarajan, M.; Hillier, I.H.; Ge, J.; Campbell, A.; Morgado, C. Can the semiempirical PM3 scheme describe iron-containing bioinorganic molecules? *J. Comput. Chem.*, v.27, p.1307-1323, 2006.

Mealli, C.; Lingafelter, E.C. The X-ray crystal structure of a low-spin pseudo-octahedral complex of iron(II). *J. Chem. Soc. D*, v. 90, p.885-894, 1970.

Medicines for Malaria Venture (MMV). www.mmv.org, acessado em 20/11/07.

Meissner, P.E.; Mandi, G.; Coulibaly, B.; Witte, S.; Tapsoba, T.; Mansmann, U.; Rengelshausen, J.; Schiek, W.; Jahn, A.; Walter-Sack, I.; Mikus, G.; Burhenne, J.; Riedel, K.D.; Schirmer, R.H.; Kouyate, B.; Muller, O.; Malar, J. Methylene blue for in Africa: results from a dose-finding study in combination with chloroquine. *Malar J.*, v.5, p.1-5, 2006.

Melhotra, R.K.; Fujioka, H.; Roepe, P.D.; Janneh, O.; Ursos, L.M.; Jacobs-Lorena, V.; McNamara, D.T.; Bockarie, M.J.; Kazura, J.W.; Kyle, D.E.; Fidock, D.A.; Zimmerman, P.A. Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in Papua New Guinea and South America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.12689-12694, 2001.

Menezes, C.M.S. Estudo da influência das propriedades físico-químicas na reversão da resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1997, 292 p.

Menezes, C.M.S.; Kirchgatter, K.; Di Santi, S.M.F.; Savalli, C.; Monteiro, F.G.; Paula, G.A.; Ferreira, E.I. *In vitro* antimalarial effect and the lack of modulating effect of desipramine and imipramine on chloroquine falciparum resistance. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.91, p.697-700, 1997.

Menezes, C.M.S.; Kirchgatter, K.; Di Santi, S.M.F.; Savalli, C.; Monteiro, F.G.; Paula, G.A.; Ferreira, E.I. *In vitro* evaluation of erythromycin in chloroquine resistant Brazilian *P. falciparum* freshly isolates: modulating effect and antimalarial activity evidence. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.41, p.249-253, 1999.

Menezes, C.M.S.; Kirchgatter, K.; Di Santi, S.M.F.; Savalli, C.; Monteiro, F.G.; Paula, G.A.; Ferreira, E.I. *In vitro* chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian *Plasmodium falciparum*: intrinsic antimalarial activity of phenothiazine drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, p.1033-1039, 2002.

Menezes, C.M.S.; Kirchgatter, K.; Di Santi, S.M.F.; Savalli, C.; Monteiro, F.G.; Paula, G.A.; Ferreira, E.I. *In vitro* evaluation of verapamil and other modulating agents in Brazilian chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, p.5-9, 2003.

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

Mohanraj, S.; Doble, M. 3-D QSAR studies of microtubule stabilizing antimitotic agents. towards six cancer cell lines. *QSAR Comb. Sci.*, v.25, p.952-960, 2006.

Morita, T.; Assumpção, R.M.V. Reagentes gerais especiais. In: Morita, T.; Assumpção, R.M.V. (Eds.). *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação*. 2a. ed., São Paulo: Edgard Blucher, 1972. p.274.

Motohashi, N.; Kurihara, T.; Yamanaka, W.; Satoh, K.; Sakagami, H.; Molnar, J. Relationship between biological activity and dipole moment in benzo[a]phenothiazines. *Anticancer Res.*, v.17, p.3431-3435, 1997.

Musa, K.A.K.; Eriksson, L.A. Theoretical assessment of naphazoline redoxchemistry and photochemistry. *J. Phys. Chem. B*, v.111, p.3977-3981, 2007.

Musonda, C.C.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Yardley, V.; Souza, R.C.C.; Chibale, K. Application of multicomponent reactions to antimalarial drug discovery. Part 2: new antiplasmodial and antitrypanosomal 4-aminoquinoline γ - and δ -lactams via a "catch and release" protocol. *Bioorg. Med. Chem.*, v.14, p.5605-5615, 2006.

Mzayek, F.; Deng, H.; Mather, F.J.; Wasilevich, E.C.; Liu, H.; Hadi, C.M.; Chansolme, D.H.; Murphy, H.A.; Melek, B.H.; Tenaglia, A.N.; Mushatt, D.M.; Dreisbach, A.W.; Lertora, J.J.L.; Krogstad, D.J. Randomized dose-ranging controlled trial of AQ-13, a candidate antimalarial, and chloroquine in healthy volunteers. *PLoS Clin. Trial*, v.2, e6, 2007.

National Institutes of Health (NIH). www.niaid.nih.gov, acessado em 19/11/07.

Nakornchai, S.; Konthiang, P. Potentiation of antimalarial drug action by chlorpheniramine against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Parasitol. Int.*, v.55, p.195-199, 2006.

O'Neill, P.M.; Bray, P.G.; Hawley, S.R.; Ward, S.A.; Park, K. 4-Aminoquinolines: past, present and future: a chemical perspective. *Pharmacol. Ther.*, v.77, p.29-58, 1998.

Olliaro, P.L.; Taylor, W.R. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *J. Exp. Biol.*, v.206, p.3753-3759, 2003.

Osa, Y.; Kobayashi, S.; Sato, Y.; Suzuki, Y.; Takino, K.; Takeuchi, T.; Miyata, Y.; Sakaguchi, M.; Takayanagi, H. Structural properties of dibenzosuberanylpiperazine derivatives for efficient reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.*, v.46, p.1948-1956, 2003.

Pabst, T.M.; Carta, G. pH Transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups. *J. Chromatogr. A.*, v.1142, p.19-31, 2006.

- Panijpan, B.; Kantakanit, N. Chlorpromazine enhances haemolysis induced by haemin. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.35, p.473-475, 1983.
- Parveen, S.; Khan, M.O.; Austin, S.E.; Croft, S.L.; Yardley, V.; Rock, P.; Douglas, K.T. Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of *N*-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide. *J. Med. Chem.*, v.48, p.8087-8097, 2005.
- Pérez, C.; Sánchez, J.; Puig-Parellada, P.; Pouplana, R. Reactivity of biologically important NSAID compounds with superoxide (O₂), nitric oxide (NO) and cyclooxygenase inhibition. *QSAR Comb. Sci.*, v.26, p.368-377, 2007.
- Pietrzycki, W. QSAR studies on bioorganic and pharmacological effects of the antidepressants. *Polish J. Chem.*, v.74, p.89-108, 2000.
- Portela, C.; Afonso, C.M.M.; Pinto, Madalena, M.M.P.; Ramos, M.J. Receptor-drug association studies in the inhibition of the hematin aggregation process of malaria. *FEBS Letters*, v. 27435, p.217-222, 2003a.
- Portela, C., Afonso, C.M.M.; Pinto, M.M.M.; Ramos, M.J. Computational studies of new potential antimalarial compounds –Stereo-electronic complementarity with the receptor *J. Comput. Aided Mol. Design*, v.17, p.583–595, 2003b.
- Portela, C.; Afonso, C.M.M.; Pinto, Madalena, M.M.; Ramos, M.J. Definition of an electronic profile of compounds with inhibitory activity against hematin aggregation in malaria parasite. *Bioorg. Med. Chem.*, v.12, p.3313-3321, 2004.
- Post, M.I.; Kennard, O.; Horn, A.S. Possible pharmacological and theoretical implications of X-ray structure of tricyclic antidepressant imipramine. *Nature*, v.252, p.493-495, 1974.

Pradines, B.; Pagès, J.M.; Barbe, J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, v.5, p.411-431, 2005.

Raderer, M.; Scheithauer, W. Clinical trial of agents that reverse multidrug resistance. *Cancer*, v.72, p.3553-3563, 1993.

Ramanathan-Girish, S.; Catz, P.; Creek, M.R.; Wu, B.; Thomas, D.; Krogstad, D.J.; De, D.; Mirsallis, J.C.; Green, C.E. Pharmacokinetics of the antimalarial drug AQ-13, in rats and cynomolgus macaques. *Int. J. Toxicol.*, v.23, p.179-189, 2004.

Rao, G.W.; Hu, W.X. Synthesis, structure analysis, and antitumor activity of 3,6-disubstituted-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.16, p.3702-3705, 2006.

Ratcliff, A.; Siswantoro, H.; Kenangalen, E.; Wuwung, M.; Brockman, A.; Edstein, M.D.; Laihad, F.; Ebsworth, E.P.; Anstey, N.M.; Tjitra, E.; Price, R.N. Therapeutic response of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* to chloroquine and sulfadoxine–pyrimethamine in southern Papua, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.*, v.101, p.351-359, 2007.

Reynolds, C.H.; Claxton, P.T. Inhibition of calmodulin-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase: multiple binding-sites for tricyclic drugs on calmodulin. *Biochem. Pharmacol.*, v.31, p.419-421, 1982.

Rieckmann, K.H.; Sax, L.J.; Campbel, G.H.; Urema, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet*, v.1, p.22-23, 1978.

Rocha, G.B.; Freire, R.O.; Simas, A.M.; Sterwart, J.J.P. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J. Comput. Chem.*, v.27, p.1101–1111, 2006.

Rogan, A.M.; Hamilton, T.G.; Young, R.C.; Klecker Jr, R.W.; Ozols, R.F. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*, v.224, p.994-996, 1984.

Safeukui, I.; Mangou, F.; Malvy, D.; Vincendeau, P.; Mossalayi, D.; Haumont, G.; Vatan, R.; Olliaro, P.; Millet, P. *Plasmodium berghei*: dehydroepiandrosterone sulfate reverses chloroquine-resistance in experimental malaria infection: correlation with glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione synthesis pathway. *Biochem. Pharmacol.*, v.68, p.1903-1910, 2004.

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

Schalkwyk, D.A.V.; Egan, T.J. Quinoline-resistance reversing for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist. Updat.*, v.9, p. 211-226, 2006.

Scheibel, L.W.; Colombani, P.M.; Hess, A.D.; Aikawa, M.; Atkinson, C.T.; Milhous, W.K. Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.84, p.7310-7314, 1987.

Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics. Part I: history of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *Chem. Med. Chem.*, v.2, p.944-986, 2007.

Secretaria de Vigilância da Saúde. *Situação epidemiológica da malária no Brasil*. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf, acessado em 15/11/07.

Sidhu, A.B.S.; Sun, Q.; Nkrumah, L.J.; Dunne, M.W.; Sacchettini, J.C.; Fidock, D.A. *In vitro* efficacy, resistance selection, and structural modeling studies implicate the malarial parasite apicoplast as the target of azithromycin. *J. Biol. Chem.*, v.282, p.2494-2504, 2007.

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.

Silva, P. Absorção de drogas. In: Silva, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 6nd, 2002, p.36.

Singh, S.; Malik, B.K.; Sharma, D.K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. *Bioinformation*, v.1, p.314-320, 2006.

Slisz, M.; Cybulska, B.; Grzybowska, J.; Czub, J.; Prasad, R.; Borowski, E. The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives. *J. Antibiot.*, v.60, p.436-446, 2007.

Smith, D.L.; McKenzie, F.E.; Snow, R.W.; Hay, S.I. Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control. *Plos Biol.*, v.5, p.531-542, 2007.

Smulevich, G.; Féis, A.; Howes, B.D. Fifteen years of Raman spectroscopy of engineered heme containing peroxidases: what have we learned? *Acc. Chem. Res.*, v.38, p.433-440, 2005.

Snow, R.W.; Guerra, C.A.; Noor, A.M.; Myint, H.Y. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v.434, p.214-217, 2005.

Sowunmi A.; Adedeji, A.A.; Gbotosho, G.O.; Fateye, B.A.; Happi, T.C. Effects of pyrimethamine-sulphadoxine, chloroquine plus chlorpheniramine, and amodiaquine

plus pyrimethamine-sulphadoxine on gametocytes during and after treatment of acute, uncomplicated malaria in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.101, p.887-893, 2006.

Sowunmi, A.; Gbotosho, G.O.; Happi, C.T.; Adedeji, A.A.; Bolaji, O.M.; Fehintola, F.A.; Fateye, B.A.; Oduola, A.M. Enhancement of the antimalarial efficacy of amodiaquine by chlorpheniramine *in vivo*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102, p.417-419, 2007.

Spiro, T.G.; Turner, J. Heme protein structure and dynamics, studied by Resonance Raman spectroscopy. *Pure Appl. Chem.*, v.55, p.145-149, 1983.

Stewart, J.J.P. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v.4, p.1-105, 1990.

Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.*, v.13, p.1173-1213, 2007.

Sullivan 2002 Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.1645-1653, 2002.

Tanabe, K.; Izumo, A.; Kato, M.; Miki, A.; Doi, S. Stage-dependent inhibition of *Plasmodium falciparum* by potent Ca^{2+} and calmodulin modulators. *J. Protozool.*, v.36, p.139-143, 1989.

Tanabe, K.; Kato, M.; Izumo, A.; Hagiwara, A.; Doi, S. *Plasmodium chabaudi*: *in vivo* effects of Ca^{2+} antagonists in chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites. *Exp. Parasitol.*, v.70, p.419-426, 1990.

Taranto, A.G.; Carneiro, J.W.M.; Oliveira, F.G. MNDO/d calculations on the interaction between artemisinin and heme. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, v.539, p.267-272, 2001.

Thanacoody, H.K.R. Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent? *British J. Clin. Pharm.*, v.64, p.566-574, 2007.

Tinoco, I. Hypochromism in polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, v.82, p.4785-4790, 1960.

Tollenaere, J. P. Glossary of terminology. In: Cohen, N.C. (Ed.) *Guidebook on molecular modeling and drug design*. San Diego: Academic Press, 1996. 351p.747-748.

Toledo, R.A.; Mazo, L.H. ; Santos, M.C.; Honório, K.M.; Silva, A.B.F.; Cavaleiro, E.T.G. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. *Quim. Nova*. v.28, p.456-461, 2005.

Too, K.; Brown, D.M.; Bongard, E.; Yardley, V.; Vivas, L.; Loakes, D. Anti-malarial activity of N^6 -modified purine analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, v.15, p.5551-5562, 2007

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

Tsuruo, T.; Lida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, v.41, p.1967-1972, 1981.

Ursos, L.M.B.; Dzekunov, S.M.; Roepe, P.D. The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.110, p.125-134, 2000.

van Schalkwyk, D.A.; Egan, T.J. Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat.*, v.9, p.211-226, 2006.

Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, K.; Patil, P.; Patel, S.R.; Jain, R. Recent advances in antimalarial drug development. *Med. Res. Rev.*, v.27, p.65-107, 2007.

Vennestrom, J.L.; Makler, M.T.; Angerhofer, C.K.; Williams, J.A. Antimalarials dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.39, p.2671-2677, 1995.

Viana, G.M.R.; Machado, R.L.D.; Calvosa, V.S.P. Pova, M.M. Mutações nos genes *pfmdr1*, *cg2* e *pfcr1* em isolados de *Plasmodium falciparum* provenientes de localidades malarígenas dos Estados de Rondônia e Pará, Amazônia Legal Brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v.22, p.2703-2711, 2006.

Vieira, P.P.; Ferreira, M.U.; Alecrim, M.G.; Alecrim, W.D.; Silva, L.H.P.; Sihuincha, M.M.; Joy, D.A.; Mu, J.; Sun, X.; Zalis, M.G. *pfcr1* Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J. Infect. Dis.*, v.490, p.417-424, 2004.

Vippagunta, S.R.; Dorn, A.; Matile, H.; Bhattacharjee, A.K.; Karle, J.M.; Ellis, W.Y.; Ridley, R.G.; Vennestrom, J.L. Structural specificity of chloroquine-hematin binding related to inhibition of hematin polymerization and parasite growth. *J. Med. Chem.*, v.42, p.4630-4639, 1999.

Vollhardt, K.P.C.; Schore, N.E. Outras reações dos álcoois e a química dos éteres. In: Vollhardt, K.P.C.; Schore, N.E. (Eds.) *Química orgânica*. Estrutura e função. 4th. ed., Porto Alegre: Bookman, 2004. p.189.

Volhardt K.P.C.; Schore, N.E. Propriedades e reações de halogeno-alcanos. In: Vollhardt, K.P.C.; Schore, N.E. (Eds.) *Química orgânica. Estrutura e função*. 4th.ed., Porto Alegre: Bookman, , 2004. p.204.

Volpini, A.C.; Marques, M.J.; Lopes dos Santos, S.; Machado-Coelho, G.L.; Mayrink, W.; Romanha, A.J. Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.12, p.815-818, 2006.

von Seidlein, L., Greenwood, B.M. Mass administration of antimalarial drugs. *Trends Parasitol.*, v.19, p.452-460, 2003.

Zavascki, A.P., Goldani, L.Z.; Li, J.; Nation, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.60, p.1206-1215, 2007.

Zayed, M.A.; Hawash, M.F.; Fahmey, M.A. Structure investigation of codeine drug using mass spectrometry, thermal analyses and semi-empirical molecular orbital (MO) calculations. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.64, p.363-371, 2006.

Zayed, M.A.; Fahmey, M.A.; Hawash, M.A.; El-Habeeb, A.A. Mass spectrometric investigation of buspirone drug in comparison with thermal analyses and MO-calculations. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.67, p.522-530, 2007a.

Zayed M.A.; Hawash, M.F.; Fahmey, M.A.; El-Habeeb, A.A. Structure investigation of sertraline drug and its iodine product using mass spectrometry, thermal analyses and MO-calculations. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.68, p.970-978, 2007b.

Wainwright, M.; Amaral, L. The phenothiazinium chromophore and evolution of antimalarial drugs. *Trop. Med. Int. Health*, v.10, p.501-511, 2005.

Walters, M.A.; Spiro, T.G. Ressonance Raman spectroscopic studies of axial ligation in oxyhemoglobin, oxymyoglobin, and nitrosylmyoglobin. *Biochemistry*, v.21, p.69-89, 1982.

Ward, S.A.; Bray, P.G. Is reversal of chloroquine resistance ready for the clinic? *Lancet*, v.357, p. 904, 2001.

Weisman, J.L.; Liou, A.P.; Shelat, A.A.; Cohen, F.E.; Guy, R.K.; Derisi, J.L. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem. Biol. Drug. Des.*, v.67, p.409-416, 2006.

Wermuth, C.G. Molecular variations based on isosteric replacements. In: Wermuth, C.G. (Ed.) *The practice of medicinal chemistry*, 2nd. ed., London: Academic Press, 2004. p.189.

White, N.J. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.*, v.113, p.1084-1092, 2004.

Wood, B.R.; Langford, S.J.; Cooke, B.M.; Glenister, F.K.; Lim, J.; McNaughton, D. Raman imaging of hemozoin within the food vacuole of *Plasmodium falciparum* trophozoites. *FEBS Let.*, v. 554, p. 247-252, 2003.

Wood, B.R.; McNaughton, D. Ressonance Raman spectroscopy in malaria research. *Expert. Rev. Proteomics*, v.3, p.525-544, 2007.

World Health Organization (WHO). *World Malaria Report*, 2005. <http://rbm.who.int/wmr2005/>, acessado em 17/11/07.

World Health Organization (WHO). *Guidelines for the treatment of malaria: 2006*. www.who.org/malaria, acessado em 16/ 11/ 2007

Wu, C.P.; van Schalkwyk, D.A.; Taylor, D.; Peter, J.; Smith, P.J.; Chibale, K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by 9H-xanthene derivatives. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.26, p.170-175, 2005.