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

Planejamento, síntese e avaliação biológica
de derivados quinolínicos potencialmente antimaláricos

Ana Cláudia Melo Pompeu da Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt

São Paulo
2004

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

Silva, Ana Cláudia Melo Pompeu da
S586a Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados
quinolínicos potencialmente antimaláricos / Ana Cláudia
Melo Pompeu da Silva. -- São Paulo, 2004.
240p.

Dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Brandt, Carlos Alberto

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2.
Malária : Quimioterapia I. T. II. Brandt, Carlos Alberto,
orientador.

615.19 CDD

Ana Cláudia Melo Pompeu da Silva

Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados quinolínicos
potencialmente antimaláricos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao Senhor Jesus Cristo,
pela presença contínua no meu coração,
através do Espírito Santo,
permitindo que eu encontrasse
o Caminho, a Verdade e a Vida.
Pela proteção e conforto
que me concedeu nos momentos difíceis.
Obrigada, Senhor!...

*Aos Meus Amados Pais, José Pompeu e Maria Aparecida,
Pela dedicação contínua em minha educação.
Pela força, apoio e sustentação que me fizeram crescer segura
e ir em busca dos meus ideais.
E como é imenso o meu amor por Vocês!
Vocês são a base de minha vida, Jóias do meu coração!*

*Aos meus irmãos, Ana Maria, Ana Cristina e Fernando.
Aos meus cunhados, Roque e Mauro.
Às minhas Riquezas, Maurinho, Ana Luíza e Ana Eliza.
Pelo incentivo inicial à vinda para São Paulo e
pelos Grandes Bons momentos que vivemos juntos.*

*Ao Amor da Minha Vida, Cristiano:
Pelo imenso amor, carinho, dedicação, paciência e força.
Pelo aprendizado em Química Orgânica,
pelas infinitas conversas cheias de problemas e
soluções encontradas.
Pelos momentos tão felizes e especiais em nossa vida.
E que Deus proteja e ilumine o Nosso AMOR!...*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Carlos Alberto Brandt pela oportunidade concedida de trabalhar sob sua orientação cuidadosa. Pela atenção e grandiosa consideração prestadas nos momentos difíceis. Pelo ensinamento presente em todos os dias do meu mestrado.

À Profa. Dra. Vení Maria Andres Fellí por me acolher nesta Instituição no início do mestrado e pela grandiosidade de seu coração.

À Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira e à Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira pela oportunidade de poder crescer cientificamente sob o cuidado de mulheres tão capazes e admiráveis.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pela cessão de seu laboratório, no Instituto de Medicina Tropical, para realização das avaliações biológicas.

Ao Dr. André G. Tempone, do Instituto de Medicina Tropical, pelo acréscimo indispensável ao trabalho através da realização dos ensaios biológicos.

À Dra. Carla M. S. Menezes e à Dra. Kerly F. M. Pasqualoto pela contribuição valiosa com a realização do estudo de Modelagem Molecular.

Aos colegas de pós-graduação, Maíté, Eliseu, Diogo, Roberto, Camila, Júnior, Mara, Kátia (técnica), Daniela, Nara, Michelli, Kátia Solange, Gustavo, Guilherme, Hélio, Maria Fernanda, André, Robson, Iguatemi e Diogo pela ajuda, companheirismo e crescimento profissional proporcionados pela presença de todos.

Aos alunos de iniciação científica, Tatiana, Carlos, Sabrina, Mayra, Eloíza e Renata.

Às técnicas Kátia e Inês pela paciência e dedicação ao trabalho.

Ao funcionário Charles pelo companheirismo e ajuda contínua no trabalho experimental.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado, à CAPES e à FAPESP pelo financiamento à pesquisa.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
 CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO	 1
1.1- INTRODUÇÃO	2
1.2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	3
 CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA	 7
2.1- MALÁRIA	8
2.1.1- Generalidades	8
2.1.2- Epidemiologia	9
2.1.3- Etiologia	13
2.1.4- Avanços Moleculares das Bases Patogênicas da Malária	14
2.1.4.1- Ciclo Biológico do <i>Plasmodium sp</i> : Aspectos Morfológicos e Mecanismos Celulares de Invasão no Hospedeiro Vertebrado	14
2.1.4.2- Ciclo Biológico do <i>Plasmodium sp</i> : Aspectos Morfológicos e Mecanismos Celulares de Invasão no Hospedeiro Invertebrado	27
2.1.5- Diagnóstico	28
2.1.6- Resistência	29
2.1.7- Quimioterapia	30
2.1.7.1- Fármacos Quinolínicos	37
2.1.7.2- Derivados Quinolínicos Potencialmente Antimaláricos	55
2.2- PLANEJAMENTO SINTÉTICO DE NOVOS DERIVADOS QUINOLÍNCOS	100
2.2.1- Alquilação de Compostos β -Dicarbonílicos	102
2.2.2- β -Enaminoésteres	103
2.2.3- Sistemas Quinolínicos a partir de Compostos β -Cetoésteres	105
 CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL	 108
3.1- MATERIAIS	109
3.1.1- Fármaco	109
3.1.2- Reagentes, Solventes e Outros (Preparações e Análises Químicas)	109

3.1.3- Reagentes e Solventes (Avaliação Biológica e Toxicológica)	110
3.1.4- Equipamentos (Preparações e Análises Químicas)	110
3.1.5- Equipamentos (Avaliação Biológica e Toxicológica)	111
3.2- MÉTODOS SINTÉTICOS	112
3.2.1- Preparação de 2-acetil-pent-4-enoato	112
3.2.2- Preparação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila	113
3.2.3- Preparação de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol	115
3.2.4- Preparação de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina	116
3.2.5- Preparação de [(1E)-3-bromoprop-1-enil]benzeno	116
3.2.6- Preparação de 2-acetil-4E-5-fenilpent-4-enoato de etila	117
3.2.7- Preparação de (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila	117
3.2.8- Preparação de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol	118
3.2.9- Preparação de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina	118
3.3- MÉTODOS ANALÍTICOS	119
3.3.1- Cromatografia em Camada Delgada	119
3.3.2- Cromatografia Gasosa	119
3.3.3- Ressonância Magnética Nuclear	119
3.3.4- Faixa de Fusão	120
3.3.5- Espectrômetro de Massas	120
3.3.6- Espectrômetro na Região do Infravermelho	120
3.4- AVALIAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	120
3.5- AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	121
3.6- ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR	122
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
4.1- RESULTADOS DO ESTUDO QUÍMICO	125
4.2- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	150
4.3- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	152
4.4- DISCUSSÃO DO ESTUDO QUÍMICO	154
4.4.1- Preparação de (2z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila (4) através de Ultrassom	154
4.4.2- Preparação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila através de Microondas e Ultrassom	155

4.4.3- Preparação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila através de Aquecimento	157
4.4.4- Preparação de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol	157
4.4.5- Preparação de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina	158
4.4.6- Preparação de etil (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato	159
4.4.7- Preparação de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol	161
4.4.8- Preparação de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina	161
4.5- DISCUSSÃO DAS AVALIAÇÕES BIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA	162
4.6- DISCUSSÃO DO ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR	164
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	165
5.1- CONCLUSÕES	166
5.2- PERSPECTIVAS	168
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
APÊNDICE	212

RESUMO

A emergência e a disseminação de cepas resistentes aos fármacos antimaláricos disponíveis na quimioterapia têm conduzido à busca por novos agentes potencialmente ativos. Neste sentido, derivados 4-hidroxiquinolínicos e 4-cloroquinolínicos foram sintetizados e submetidos à avaliação biológica frente à cepa AJ de *Plasmodium chabaudi* e à avaliação toxicológica frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

O planejamento sintético consistiu na preparação de β -cetoésteres- α -alquenilados através de reação de acetoacetato de etila e brometo de alila ou brometo de cinamila. Posteriormente, β -enaminoésteres- α -alquenilados foram obtidos através de reações de β -cetoésteres- α -alquenilados com amina aromática (anilina). Os derivados 2-metil-3-alil- ou 2-metil-3-cinamil-4-hidroxiquinolínicos foram obtidos através de termociclização de Conrad-Limpach, utilizando-se difeniléter como solvente reacional. Por fim, a cloração dos agentes hidroxilados com oxiclreto de fósforo rendeu 2-metil-3-alil- ou 2-metil-3-cinamil-4-cloroquinolinas.

Dos quatro derivados quinolínicos avaliados, 2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (**11**) mostrou-se 1,13 vezes mais efetivo que sulfato de cloroquina contra as formas intraeritrocíticas do parasita, 1,69 vezes menos tóxico para os macrófagos peritoneais em relação ao fármaco padrão e valor de índice de seletividade igual a 280, enquanto sulfato de cloroquina apresentou valor de 146,84.

ABSTRACT

The emergence and spread of resistance to antimalarial drugs have highlighted the need for the discovery and development of novel antimalarial molecules. To achieve this goal, 4-hydroxyquinoline and 4-chloroquinoline derivatives were prepared. Their biological activity was tested against the AJ *Plasmodium chabaudi* strain and their toxicity was evaluated toward BALB/c mouse peritoneal macrophages.

The synthetic design was started by reacting ethyl-acetoacetate with allyl bromide or cinamyl bromide to obtain α -alkenyl- β -ketoesters. The α -alkenyl- β -enaminoesters were prepared by condensation of α -alkenyl- β -ketoesters with aromatic amine (aniline). The derivatives 2-methyl-3-allyl- or 2-methyl-3-cinamyl-4-hydroxyquinolines were obtained by Conrad-Limpach cyclization in reactional solvent diphenyl ether. The 2-methyl-3-allyl- or 2-methyl-3-cinamyl-4-chloroquinoline derivatives had been prepared by chloration of hydroxyl group with phosphorous oxychloride.

Among the quinoline compounds evaluated, 2-methyl-3-[(2*E*)-3-phenylpro-2-enyl]quinolin-4-ol (**11**) has shown more active than chloroquine sulphate (1,13-fold) against the parasite intraerythrocytic stage. The compound **11** has presented less toxic than this drug (1,69-fold) to peritoneal macrophages. The selectivity index value has been 280, while the value to chloroquine sulphate has been 146,84.

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1- INTRODUÇÃO

A malária é doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem pela fêmea de mosquito do gênero *Anopheles*. As principais espécies do parasito da malária humana são *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, os quais causam febre e anemia e *Plasmodium falciparum*, responsável pela forma insidiosa e mortal da parasitose, podendo causar, além dos sintomas citados, insuficiência renal, encefalopatia, edema cerebral e morte (Clark *et al.*, 2000; Lines *et al.*, 1992; Ramasamy, 1998; Sherman, 1988; Stanley, 1997).

A malária é uma das doenças mais disseminadas nas áreas tropicais e subtropicais, distribuindo-se pelo continente africano, asiático e americano. A estimativa anual é de 300 a 500 milhões de casos clínicos e entre 1,5 a 2,7 milhões de óbitos. Constitui emergência médica, a qual requer diagnóstico e tratamento rápidos (Alves *et al.*, 2000; Barroso, 2000; Hirst *et al.*, 2000; W.H.O., 2002a).

A malária é a mais expressiva das endemias no Brasil e a Amazônia Legal constitui área de transmissão, sendo dotada de vários fatores que contribuem para tal. Condições climáticas peculiares à área florestal, hidrografia abundante, chuvas torrenciais e enchentes, temperatura e umidade do ar elevadas, fluxos migratórios expressivos, baixos níveis sócio-econômicos e culturais da população, resistência do *Plasmodium* aos quimioterápicos disponíveis e localidades onde o mosquito *Anopheles* desenvolveu resistência aos inseticidas (Alves *et al.*, 2000; Chaves, Rodrigues, 2000) são fatores que culminam para a ocorrência da doença. No intuito de reverter tal situação, o desenvolvimento de compostos potencialmente antimaláricos, quer para o tratamento da parasitose, quer para o extermínio dos insetos tem sido estratégia utilizada para o controle da malária, bem como a mobilização política na implementação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (Loiola, Silva, 2002; Olliaro, Yuthavong, 1999; Funasa, 2002a; Funasa, 2002b).

Fármacos quinolínicos como cloroquina, quinina, mefloquina, amodiaquina constituem parte principal do arsenal terapêutico antimalárico desde a Primeira Guerra Mundial até os dias atuais. No entanto, o mecanismo de ação ao nível molecular dos fármacos quinolínicos não está completamente esclarecido, embora estudos relatem que tais agentes

podem interferir com a digestão de hemoglobina nos estágios eritrocíticos do ciclo de vida do *Plasmodium* (Olliario, Goldberg, 1995). O parasito degrada hemoglobina no vacúolo ácido em busca de aminoácido liberando o grupo heme (Roth *et al.*, 1986; Slater, Cerami, 1992) e espécies reativas de oxigênio (Atamna, Ginsburg, 1993) como subprodutos tóxicos ao parasito. As porções de heme são neutralizadas pela polimerização para formação de hemozoína ou pigmento malárico (Slater, Cerami, 1992), enquanto as espécies radiculares são destoxificadas por enzimas que desencadeiam mecanismos antioxidantes (Fairfield *et al.*, 1983; Fairfield *et al.*, 1988; Gamain *et al.*, 1996). Acredita-se que alta concentração intravacuolar de cloroquina interfira com a polimerização de heme e/ou destoxificação de espécies de oxigênio (Sugioka, Suzuki, 1991), matando o parasito com seu próprio lixo metabólico.

Com o advento da resistência do *Plasmodium* aos fármacos quinolínicos há necessidade de buscar novos agentes racionalmente planejados, doravante haja entendimento dos mecanismos moleculares de ação dos fármacos e de resistência do *Plasmodium* frente os mesmos (Foley, Tilley, 1998; Olliario, Yuthavong, 1999). Desta maneira, a modificação de fármacos já existentes permanece ainda como estratégia na pesquisa de novos compostos antimaláricos. Para tal, o processo de modificação molecular tem sido extensivamente utilizado visando efetuar modificações químicas com o intuito de obter moléculas com maior potência, especificidade de ação, baixa toxicidade e melhor aceitação pelo paciente (Barreiro, Manssour, 2001; Korolkovas, 1988).

1.2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A resistência do parasito aos antimaláricos tem ampla distribuição no mundo, constituindo um dos entraves para o controle ou combate da malária. Hoje em dia, a disseminação de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina praticamente se sobrepõe à distribuição geográfica da endemia. A resistência do *Plasmodium* aos fármacos está relacionada a fatores ligados ao parasito, pois apresentam genomas bastante complexos, possuindo facilidade de alterar o metabolismo nos microambientes de hospedeiros diferentes, dificultando o estudo dos mecanismos de ação dos fármacos antimaláricos e dos mecanismos de resistência, além de muitos antimaláricos estarem relacionados ao mesmo processo biológico ou à mesma enzima (Noronha *et al.*, 2000; W.H.O., 2002b; Trigg, Kondrachine,

1998). Fatores ligados às condições sócio-econômicas e o uso freqüente, abusivo e indiscriminado dos medicamentos corroboram para a disseminação de cepas resistentes (Noronha *et al.*, 2000; Olliaro, Yuthavong, 1999).

Fármacos quinolínicos têm sido utilizados para o tratamento da malária desde o século XVII (Wallace, 1996), quando a casca pulverizada da árvore de *Cinchona sp* foi reconhecida pelo potencial terapêutico. Porém, devido às variações na qualidade das preparações da casca, esforços foram conduzidos com o intuito de isolar os princípios ativos quinina e cinchonina (Holfheinz, Merkli, 1984). Em 1920, pesquisadores alemães sintetizaram a pamaquina (Greenwood, 1995) e durante a Segunda Guerra Mundial muitos fármacos foram sintetizados, tais como cloroquina, primaquina e mefloquina (Foley, Tilley, 1998). Apesar de existir variedade de fármacos disponíveis para o tratamento da malária (quinina, cloroquina, amodiaquina, primaquina, mefloquina, pirimetamina, sulfas, antibióticos, derivados de artemisinina) nenhum deles é o ideal devido ao surgimento de resistência (Boulos *et al.*, 1997), havendo necessidade urgente de novos antimaláricos eficazes e seguros, já que a quimioterapia permanece, ainda, como uma das armas efetivas de controle contra a parasitose (Boulos *et al.*, 1997; Braga, Fontes, 2000; Olliaro, Yuthavong, 1999).

Estudos de relação entre estrutura química e atividade biológica revelaram que a presença de um sistema anelar plano hidrofóbico contendo átomo de nitrogênio fracamente básico é requerimento mínimo para a atividade antimalárica dos compostos quinolínicos e grupos substituintes no sistema anelar permitem variações pertinentes à atividade antimalárica (Sweeney, 1984).

Muitos derivados de 4-hidroxiquinolinas são relatados na literatura apresentando atividade biológica como antiinflamatórios (Baba *et al.*, 1996; Hatzelmann *et al.*, 1993; Hatzelmann *et al.*, 1994), antiprotazoários, especificamente como coccidiostáticos contra as espécies de *Eimeria* (Patchett *et al.*, 1970; Rossi, Wilhelm, 1969), antitumorais (Deady *et al.*, 1997) e antimicrobianos (Nakagome *et al.*, 1971).

Ryley e Peter (1970) avaliaram ésteres quinolínicos, constatando atividade esquizonticida sangüínea contra *Plasmodium berghei* e *Plasmodium cynomolgi*. Puri e Duta (1990) avaliaram a atividade antimalárica de duas carboxiquinolinas, **WR 194095** e **WR**

197236 (**figura 1**), observando que não ocorreram recaídas quando administrados em macacos *Rhesus* infectados por *Plasmodium cynomolgi* B. Tais compostos foram curativos em doses diárias, intramusculares de 15 mg/Kg, durante 7 dias, não sendo observadas recaídas durante período de 120 dias.

FIGURA 1- Estrutura química de WR 194905 e WR 197236.

Compostos derivados de 4-cloroquinolinas foram ativos biologicamente contra cepas de *Entamoeba histolytica* e *Tricomonas vaginalis* (Beuglemans *et al.*, 1988), merecendo avaliação como agente potencial antimalárico.

Estudos preliminares de derivados quinolínicos (Veitía, 2002) foram feitos, avaliando a atividade biológica de 11 compostos frente à cepa K1, resistente à cloroquina, e cepa Palo Alto, sensível à cloroquina. O controle de sensibilidade dos isolados foi realizado através de difosfato de cloroquina, que apresentou valor de MIC de 8 μ mols por alvéolo em cepa K1 e 4 μ mols por alvéolo em cepa Palo Alto. Dos compostos ensaiados, os melhores resultados foram obtidos para 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina (**A**) e 3-carbetoxi-4-cloroquinolina (**B**), apresentando valores de MIC para K1 de 16 e 4 μ mols, respectivamente e para Palo Alto de 16 e 2 μ mols, respectivamente (**figura 2**).

FIGURA 2- Estrutura química dos compostos A e B (Fonte: Veitía, 2002).

O presente trabalho exploratório teve por objetivo planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados quinolínicos, visando efetuar modificações moleculares. Na posição 3 do anel foi planejada a introdução de grupos alil ou cinamil e, na posição 4, introdução de grupos hidroxila ou cloro, procurando-se avaliar a contribuição dos

substituintes mediante aspectos eletrônicos, estéricos e lipofílicos para a atividade antimalárica, bem como a toxicidade por eles exercida.

As estruturas planejadas para o trabalho estão mostradas no esquema retrosintético (esquema I.1).

ESQUEMA I.1

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1- MALÁRIA

2.1.1- GENERALIDADES

Apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Originada provavelmente no continente africano, acompanhou a saga migratória do ser humano pelas regiões do Mediterrâneo, Mesopotâmia, Índia e Sudeste Asiático. A chegada ao Novo Mundo ainda é hoje motivo de especulações, já que não se dispõe de informações confiáveis. As hipóteses são discutidas em torno de viagens transpacíficas em tempos remotos, bem como viagens de colonizadores espanhóis e portugueses, a partir do século XVI (Braga, Fontes, 2000; Dutra, 2001; Ferreira, Alvarado, 1991).

A malária também denominada paludismo, febre palustre, impaludismo ou maleita foi primeiramente citada na era pré-Cristã, por Hipócrates, que descreveu as características de ocorrência sazonal e de febre com padrão paroxístico e intermitente. Entretanto, somente no final do século XIX, quando bacteriologistas e patologistas estudavam as causas de diversas doenças infecciosas, com a observação de alterações mórbidas em órgãos e tecidos, bem como notando o papel de insetos na transmissão de algumas doenças, é que o conhecimento sobre a malária sofreu avanços significantes. Em 1880, o médico do exército francês Charles Alphonse Laveran, trabalhando na Argélia, foi o primeiro a observar e descrever parasitas da malária no interior de glóbulos vermelhos humanos. Em 1897, o médico britânico Ronald Ross, trabalhando na Índia, tornou possível a elucidação do modo de transmissão, ao encontrar formas do parasita no estômago de mosquitos que haviam se alimentado em um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasita da malária no homem, hospedeiro vertebrado, e na fêmea do mosquito *Anopheles*, agente transmissor e hospedeiro invertebrado, foi obtido, posteriormente, graças aos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 (Braga, Fontes, 2000; Bruce-Chwatt, 1978, D'Alessandro, Buttiens, 2001).

A partir do conhecimento do ciclo vital do parasita, estratégias diferentes de ataque à doença têm sido propostas, visando à interrupção da transmissão (Olliaro, Yuthavong, 1999). Dentre elas destaca-se o Programa de Erradicação da Malária, realizado em 1955 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), centrado principalmente em ações verticais, incluindo a borrifação de paredes com inseticida de ação residual (DDT) e o tratamento em massa com cloroquina, antimalárico de baixa toxicidade. No período de 1995 a 2000 a OMS instituiu um plano de ação que enfatizou a integração das atividades de controle às dos serviços gerais de saúde, reconhecendo as especificidades locais de cada situação a ser enfrentada. Todavia, a emergência da resistência de parasitas aos antimaláricos ora disponíveis, associada ao panorama político-econômico mundial, tem desencadeado agravamento da malária nas três últimas décadas (Braga, Fontes, 2000; Trigg, Kondrachine, 1998; W.H.O., 2002a).

2.1.2- EPIDEMIOLOGIA

A malária apresenta-se amplamente disseminada pelos continentes africano, asiático e americano (**figura 3**). O registro anual é de 300 a 500 milhões de casos ocorrentes e entre 1,5 a 2,7 milhões de óbitos no mundo. Deste número alarmante, 90% está concentrado na África Tropical, apresentando aproximadamente 1,7 milhões de mortes, representados, na maioria, por crianças menores de cinco anos de idade. O restante dos óbitos está distribuído pelas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas da Oceania (W.H.O., 2002a; W.H.O., 2002b).

FIGURA 3- Distribuição mundial da malária (Fonte: [http:// www.malaria.org](http://www.malaria.org)).

A doença é considerada endêmica quando existe incidência constante de casos no decorrer de anos sucessivos e, epidêmica quando ocorre agravamento periódico ou ocasional da curva endêmica. Classicamente, a endemicidade de uma região é definida com base no índice esplênico, o qual é determinado pela proporção de crianças entre 2 e 10 anos com baço palpável. Índice esplênico inferior a 10% é denominada hipo-endêmica; índice esplênico entre 11-50%, meso-endêmica; entre 51-75%, hiperendêmica; superior a 75%, holoendêmica (Ferreira, Alvarado, 1991).

Outra forma de avaliação epidemiológica da malária é através do perfil de incidência no decorrer do tempo, sendo considerada estável se o nível de transmissão é alto e não sofre oscilação no decorrer dos anos, embora flutuações sazonais possam ocorrer. Nessas áreas é comum a aquisição de imunidade coletiva, não sendo freqüente o aparecimento de epidemia. Já nas áreas de malária instável, como é o caso do Brasil, é comum a variação anual da incidência, podendo ocorrer epidemias, já que a maior parte da população exposta permanece vulnerável ao parasita (Ferreira, Alvarado, 1991).

A transmissão da doença é determinada pela associação de fatores biológicos do vetor, homem e parasita; fatores ecológicos, os quais compreendem as condições que favorecem ou dificultam a transmissão; fatores sócio-culturais, os quais determinam as atitudes e os comportamentos dos agrupamentos humanos, fatores econômicos e políticos (Braga, Fontes, 2000; Chaves, Rodrigues, 2000).

Em áreas de alta transmissão de malária, crianças e adolescentes são considerados principais fontes de infecção para o mosquito vetor, pois apresentam níveis de gametócitos circulantes superiores àqueles observados entre indivíduos adultos imunes. Mulheres grávidas, viajantes não imunes e pessoas expostas às áreas endêmicas constituem grupos de alto risco (Myrvang, Godal, 2000; Rietveld, 1999).

O continente africano permanece como o maior foco de malária do mundo, com alta morbidade, particularmente em crianças. A espécie predominante é o *P. falciparum*, na maioria dos países, mas o *P. vivax* e *P. malariae* ocorrem em menor proporção. *P. ovale* é

responsável por menos de 5% das infecções. Nos últimos anos, resistência do *P. falciparum* à cloroquina tem sido relatada em número crescente de países, sobretudo na África Central e Oriental (Kean, 1979; Onori, 1984).

O sudeste asiático constitui uma das áreas de maior endemicidade e países como Tailândia, Burma, Laos, Cambodja, Vietnã, Malásia apresentam alta prevalência de infecções causadas pelo *P. falciparum*, elevado grau de resistência, não só à cloroquina, mas também à associação sulfadoxina-pirimetamina. Na década de 1970 ocorreu recorrência da malária causada pelo *P. vivax* na Índia, Paquistão e Sri Lanka, conseqüentemente, o controle tem se tornado problema de difícil resolução nos últimos anos. Na China, Indonésia e Ilhas do Pacífico, a doença segue sendo altamente endêmica e de controle quase impossível a curto prazo (Hurwitz *et al.*, 1981; Reacher *et al.*, 1981).

A malária tem mostrado tendência ascendente no continente americano nos últimos anos. Alguns países como Argentina, Costa Rica, Panamá interromperam ou quase eliminaram a transmissão da parasitose. Por outro lado, a transmissão persiste em maior ou menor grau, dependendo da área considerada, em países como Brasil, Equador, México, Bolívia, Haiti, Honduras, Nicarágua e Peru, apesar de as campanhas de erradicação prosseguirem vigorosamente. *P. vivax* é a espécie do parasita predominante na América Central, *P. falciparum* no Haiti e ambos na América do Sul (Ferreira, Alvarado, 1991).

Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira (**figura 4**), com registro de aproximadamente 500 mil casos por ano, representando um dos problemas mais importantes de saúde pública, figurando entre as endemias que assolam o país (Alves *et al.*, 2000; Barroso, 2000; Hirst *et al.*, 2000; W.H.O., 2002a). A área endêmica brasileira está localizada na Amazônia Legal, incluindo os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Dutra, 2001).

FIGURA 4- Distribuição da malária no Brasil (Fonte: MS/FUNASA, 1998).

O desenvolvimento intensificado da Amazônia, ocasionado pelos projetos de colonizações do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), pela expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, extração de madeira e mineração, acelerou o processo migratório nas décadas de 1970 e 1980. Nessa região, as condições sócio-econômicas precárias da população migrante e fatores ambientais, como variação de índices pluviométricos, determinaram a disseminação da parasitose. Atualmente, a malária está concentrada na região da Amazônia Legal (**figura 5**), respondendo por, aproximadamente, 99% dos casos registrados no país. Nos Estados das demais regiões do país, os casos registrados são quase totalmente oriundos da região amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão. Em 1999 foram registrados mais de 630 mil casos, significando incremento de 34% em relação a 1998 (Funasa, 2002b).

FIGURA 5- Representação gráfica do número de casos de malária no período de 1980 a 2001 no Brasil (Fonte: [http:// www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br)).

Essa situação levou o Ministério da Saúde a elaborar o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), desencadeando ações na região Amazônica, executadas em parceria com estados e municípios, as quais colaboraram para a inversão da tendência de crescimento endêmico. No ano 2000 foram registrados cerca de 615 mil casos da doença no Brasil, sendo, 99,7% destes, na Amazônia Legal, sendo constatada redução de 3,5% no número de casos de malária em relação ao ano de 1999. Esta tendência de redução foi intensificada em 2001 com o registro de aproximadamente 380 mil casos, representando redução em torno de 40% (**figura 5**). Tal redução foi superior a 50% em alguns Estados da região endêmica como Amazonas, Acre e Roraima, quando comparado ao ano de 1999 (Funasa, 2002b; Loiola, Silva, 2002). Nos primeiros sete meses de 2002 foram registrados cerca de 186 mil casos de malária na Amazônia Legal, correspondendo à redução de 50% em relação ao mesmo período do ano 2000 (Funasa, 2002c).

2.1.3- ETIOLOGIA

As principais espécies do parasita da malária humana são:

Plasmodium falciparum é responsável pela forma insidiosa e mortal da parasitose, tem ciclo eritrocítico de 48 horas e produz a malária terçã maligna. O termo, “terçã”, designa o fato de a febre reaparecer de três em três dias, sendo denominada maligna por ser a forma clínica de malária mais perigosa e, até mesmo, fatal. É porém, a única forma que não apresenta estágio exoeritrocitário significativo, ou seja, estágio de invasão e desenvolvimento nos hepatócitos, e não apresenta recidivas, se o estágio eritrocitário for erradicado. Infecções causadas por *Plasmodium falciparum* são caracterizadas pela invasão dos eritrócitos, onde provocam alterações significantes na estrutura e função, causando retenção nos tecidos capilares e vênulas do coração, pulmões, rins, intestino e fígado, facilitando o movimento dos nutrientes para dentro das células, determinando o crescimento do parasita.

Plasmodium vivax causa a malária terçã benigna, sendo a forma mais disseminada, com menor gravidade e tem ciclo eritrocítico de 48 horas. A infecção tem taxa baixa de

mortalidade em adultos e é caracterizada por recaídas causadas por formas latentes teciduais.

Plasmodium ovale causa uma infecção rara de malária, inexistente no Brasil. É denominada terçã benigna, tendo ciclo de 48 horas e estágio exoeritrocitário e eritrocitário.

Plasmodium malariae causa a febre quartã, tendo ciclo de 72 horas. O ciclo exoeritrocitário não é pronunciado, podendo ocorrer ataques clínicos após anos da infecção (Cabantchik, 1989; Deitsch, Wellem, 1996; Ramasamy, 1998; Sherman *et al.*, 1992; Winograd, Sherman, 1989).

Infecções agudas causadas por *P. falciparum* produzem anemia grave, insuficiência renal, encefalopatia (malária cerebral), edema pulmonar e morte. *Plasmodium vivax* e *P. malariae* causam anemia e, em raras instâncias, ruptura esplênica e síndrome nefrótica (Clark, Schofield, 2000; Marsh *et al.*, 1996; Stanley, 1997; Taylor *et al.*, 1997).

2.1.4- AVANÇOS MOLECULARES DAS BASES PATOGÊNICAS DA MALÁRIA

O ciclo vital do agente etiológico da malária ocorre em dois hospedeiros. O mosquito *Anopheles* é o hospedeiro invertebrado abrigando o parasito para seu desenvolvimento sexuado. Os estágios assexuados acontecem no hospedeiro vertebrado, como no homem. O protozoário da malária é proveniente de espécie muito específica, alguns infectando pássaros, outros, macacos, ainda, roedores e outros, apenas homens. Somente os mosquitos do gênero *Anopheles* abrigam o protozoário em metade do ciclo de vida; outros mosquitos de gêneros diferentes não o fazem. (Ferreira, Alvarado, 1991).

2.1.4.1- Ciclo Biológico do *Plasmodium sp*: Aspectos Morfológicos e Mecanismos Celulares de Invasão no Hospedeiro Vertebrado

Os parasitos *Plasmodium falciparum* e, em grau menor, *Plasmodium vivax* são os principais agentes causadores da patologia da malária, promovendo comumente, anemia

grave. Porém, somente *P. falciparum* é responsável pelas complicações da malária grave, tais como malária cerebral, insuficiência renal, edema pulmonar, hipoglicemia, acidose metabólica e morte (Mendis *et al.*, 2001; Braga, Fontes, 2000).

Os eventos celulares do ciclo biológico do *Plasmodium sp* no hospedeiro vertebrado são mostrados na figura abaixo (**figura 6**).

A primeira fase do ciclo assexuado é denominada exoeritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular, ocorre no fígado do hospedeiro vertebrado, precedendo o ciclo eritrocítico. O desenvolvimento nos hepatócitos requer cerca de 7 dias para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de 14 dias para *P. malariae*. Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito inocula alguns esporozoítas geneticamente distintos que, ao invadirem o fígado podem se desenvolver rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito, sendo denominados hipnozoítas. Tais hipnozoítas são responsáveis pelas recaídas tardias da doença, ocorrendo após períodos variáveis de incubação. A maioria das cepas de *P. vivax* tem incubação de, aproximadamente, seis meses, apresentando ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos consequentes da esquizogonia tardia de parasitos dormentes no interior de hepatócitos (Braga, Fontes, 2000).

O mosquito inocula pequeno número de esporozoítas presentes em sua glândula salivar no tecido subcutâneo do hospedeiro. O esporozoíta é alongado, medindo cerca de 11 µm de comprimento por 1 µm de largura e apresenta núcleo central único. Sua estrutura interna é semelhante para as espécies diferentes de *Plasmodium*. A membrana é formada por duas camadas, sendo a mais externa formada pela proteína circum-esporozoíta (CS).

Os esporozoítas são difundidos através ou entre diversas células da pele e atingem a corrente sanguínea, sendo transportados para o fígado, onde invadem rapidamente e replicam nos hepatócitos (Mota, Rodriguez, 2001). Embora o mecanismo de invasão não seja totalmente compreendido, existe um modelo clássico que envolve invaginação da membrana plasmática do hospedeiro, a fim de formar vacúolo parasitóforo em torno do esporozoíta (Mota, Rodriguez, 2001).

FIGURA 6- Ciclo evolutivo do *Plasmodium sp* (Fonte: <http://www.malaria.org>).

Em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, após tempo curto de infecção, esporozoítas foram encontrados no citosol das células do hospedeiro, sem vacúolo parasitóforo, contrariando o modelo clássico. No entanto, desenvolvimento de parasitos mais evoluídos foi observado somente dentro de vacúolo parasitóforo bem delimitado (Mota, Rodriguez, 2001). Tais resultados contraditórios conduziram a investigações minuciosas e, recentemente, mecanismo alternativo de invasão foi proposto, consistindo na perturbação da membrana plasmática de ampla variedade de células hospedeiras provocada pelo esporozoíta (figura 7).

FIGURA 7- Mecanismo alternativo de invasão do esporozoíta nos hepatócitos (Mota, Rodriguez, 2001).

As células invadidas do hospedeiro possuem habilidade de reparar o dano e dar continuidade aos processos celulares vitais (Mota, Rodriguez, 2001). Esporozoítas que entram nas células hospedeiras através desse mecanismo são encontrados sem vacúolo parasitóforo até, finalmente, invadirem célula específica pelo mecanismo clássico, formando vacúolo, e passam pelo desenvolvimento. A eficiência da invasão e a especificidade da célula hospedeira sugerem a participação de receptores específicos neste processo (Braga, Fontes, 2000). Estudos relatam que o co-receptor mediador da invasão, presente nos esporozoítas, envolve, em parte, domínios de trombospondina na proteína circum-esporozoíta (CS), proteína amplamente expressa na superfície do esporozoíta e domínios na proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP).

FIGURA 8- Modelo de mecanismo proposto para invasão hepatocítica pelo esporozoíta (Adaptado de Robbins, 1996)

Estes domínios ligam-se especificamente aos proteoglicanos sulfato de heparana (**figura 8**) nos hepatócitos, em região oposta às células endoteliais e células de Kupffer, ambas localizadas na zona aferente do fígado. Portanto, os esporozoítas podem invadir diversos hepatócitos, entretanto, somente se desenvolvem em hepatócitos específicos (Mota, Rodriguez, 2001).

Os esporozoítas possuem microfilamentos através dos quais podem se locomover perfazendo movimento espiralado denominado motilidade “gliding”, utilizado para migrar

através de células hospedeiras hepáticas, sendo essencial para a invasão do hepatócito específico (Stewart, Vanderberg, 1991). Durante esse processo, os esporozoítas deixam para trás rastros de proteína do parasito (**figura 9**), como da proteína circum-esporozoíta (CS), encontrada no citosol das células hospedeiras (Frevert *et al.*, 1998).

FIGURA 9- Motilidade “gliding” efetuada pelo esporozoíta do *Plasmodium sp* para invasão do hepatócito (Mota, Rodriguez, 2001).

Após a invasão do hepatócito ocorre perda das organelas do complexo apical do esporozoíta e o parasito se torna arredondado. Esta forma é denominada trofozoíta que se multiplica por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, originando o esquizonte tecidual, composto por massa citoplasmática e milhares de núcleos filhos. O seu tamanho varia de 30 a 70 μm de diâmetro, provocando aumento subsequente do tamanho do hepatócito infectado. O esquizonte, por fim, origina em torno de 10.000 merozoítas, variando de acordo com a espécie de *Plasmodium*. (**figura 6**) (Miller *et al.*, 2002).

As células hepáticas rompem-se liberando milhares de merozoítas na circulação, os quais invadem somente os eritrócitos, iniciando o estágio eritrocítico ou ciclo de infecção. Os merozoítas (**figura 10**) são estruturalmente semelhantes aos esporozoítas, sendo porém menores e arredondados, apresentando 1 a 5 μm de comprimento, 2 μm de largura e uma membrana externa composta por três camadas. O ápice do merozoíta possui organelas secretórias características do filo *Apicomplexa* e funcionais no processo de invasão do eritrócito, muitos ribossomos, uma mitocôndria e um plastídeo. O núcleo está na região basal e há um citoesqueleto mínimo, no qual algumas das organelas ficam ancoradas, colaborando para definição do formato do merozoíta (Bannister *et al.*, 2000; Preiser *et al.*, 2000).

FIGURA 10- Representação morfológica e ultra-estrutural do merozoíta (Fonte: Bannister *et al.*, 2000).

Ao nível ultra-estrutural, o merozoíta (**figura 10**) possui muitas moléculas características da espécie relacionadas à invasão. A superfície externa suporta cobertura espessa de filamentos protéicos, dentre os quais uma proteína é de superfície do merozoíta (MSP-1). Tal proteína é utilizada para capturar o eritrócito, porém é clivada da superfície do merozoíta através de proteases desconhecidas, assim que o merozoíta invade o eritrócito (Bannister *et al.*, 2000; Preiser *et al.*, 2000).

A sequência de invasão é, provavelmente, similar para todas as espécies de *Plasmodium*. A interação do merozoíta com o eritrócito tem de envolver o reconhecimento de receptores específicos, orientação apical, formação de junção e sinalização (Miller *et al.*, 2002). As proteínas (antígenos) dos merozoítas que mediam a invasão eritrocítica são encontradas nas organelas apicais (micronemas, roptrias e grânulos densos) (Cowman *et al.*, 2000; Dubremetz *et al.*, 1998).

P. falciparum pode fazer uso de diversos mecanismos de invasão, sendo que a sua eficiência invasiva depende da presença de moléculas de reconhecimento, como exemplo da de ácido siálico. O antígeno de ligação ao eritrócito, EBA-175 (“erythrocyte-binding-antigen”), é proteína que apresenta dois domínios DBLs (“Duffy-binding-like”). Parece

estar localizado nos micronemas e tem mostrado ligar-se, especificamente, a resíduos de ácido siálico da glicoforina A (Miller *et al.*, 2002; Cowman *et al.*, 2000). As proteínas RBL-1 (“reticulocyte-binding-like”) deste parasito, com ligação provável aos reticulócitos, têm interação com proteínas sensíveis à neuraminidase e resistentes à tripsina dos eritrócitos (Rayner *et al.*, 2001).

As proteínas DBPs (“Duffy-binding-protein”) do merozoíta de *P. vivax* parecem estar localizadas nos micronemas, apresentam domínio DBL (“Duffy-binding-like”) e reconhecem apenas as proteínas do grupo sanguíneo *Duffy* positivo do hospedeiro. As proteínas RBL-1 e RBL-2 do parasito apresentam interações possíveis com proteínas localizadas no reticulócito do hospedeiro (Miller *et al.*, 2002). *P. vivax* é dependente destes mecanismos para processar invasão eritrocítica, necessitando tanto das proteínas DBPs, como das RBLs.

Além do antígeno EBA-175 (*P. falciparum*), das proteínas DBPs (*P. vivax*) e das RBLs (*P. falciparum* e *P. vivax*), outro grupo de proteínas de membrana tem sido bastante estudado parecendo conferir propriedade adesiva ao merozoíta no momento da invasão. AMA-1 é o membro protótipo desta família. Tal grupo está situado nas roptrias e foi primeiramente identificado no *P. knowlesi* como alvo inibitório da invasão através de anticorpos monoclonais. Os genes homólogos de AMA-1 em *P. falciparum* e *P. vivax* foram identificados e estão sendo pesquisados para o entendimento da relação da estrutura tridimensional da molécula e a sua função, bem como a capacidade de induzirem resposta imune protetora, já que podem ser candidatos à vacina no estágio sanguíneo (Chitnis, Blackman, 2000).

MAEBL é família de proteínas residentes nas roptrias do merozoíta, recentemente identificada em parasitos de roedores, *P. berghei* e *P. yoelii*. Os domínios ricos em cisteína de MAEBL exibem homologia funcional com as proteínas que apresentam domínios DBLs. Porém, apresenta dois domínios homólogos estruturais da proteína AMA-1 (Preiser *et al.*, 2000; Ghai *et al.*, 2002).

A localização destas proteínas no interior das organelas pode proteger o parasito de anticorpos mediados para inibição do processo invasivo, tanto que a liberação do conteúdo das organelas apicais ocorre somente após o contato íntimo com o eritrócito, limitando a exposição das proteínas aos anticorpos, provenientes da resposta imunológica (Miller *et al.*, 2002).

A **figura 11** representa as proteínas (antígenos) do parasito e as proteínas possíveis de interação no hospedeiro. As proteínas do parasito encontram-se divididas em duas famílias. A família DBL (“Duffy-binding-like”) (a) é presente no *P. vivax* e se liga às proteínas do grupo sanguíneo Duffy na superfície do eritrócito. Enquanto *P. vivax* possui uma única proteína DBP, *P. falciparum* tem várias que usam outras proteínas do eritrócito que não Duffy, podendo explicar, em parte, a habilidade do parasito invadir eritrócitos de todas as idades. A segunda família representada pelas proteínas RBL (“reticulocyte-binding-like”) (b), foi encontrada em *P. vivax* como RBL-1 e RBL-2 e descoberto que tais proteínas se ligam a proteínas nos reticulócitos, embora os domínios das proteínas não tenham sido identificados ainda.

FIGURA 11- Representação de antígenos do parasito reconhecidos por proteínas do hospedeiro (Adaptado de Miller *et al.*, 2002).

O processo de sinalização, responsável pela liberação dos conteúdos das organelas no contato com o eritrócito, é assunto crítico na biologia do parasito. Os parasitos da malária têm mecanismos intracelulares de sinalização mediados por fosfoinosítideo, AMP

cíclico e mecanismos dependentes de cálcio. Porém, as moléculas de superfície do merozoíta que desencadeiam a sinalização são completamente desconhecidas. Os eventos invasivos incluem também a formação de junção motora de actina-miosina que se encarrega de conduzir o parasito para dentro do eritrócito, possibilitando a formação do vacúolo parasitóforo (Miller *et al.*, 2002).

Após invasão eritrocítica completa, ocorre formação de parasitas intracelulares móveis denominados trofozoítas que se desenvolvem e se multiplicam. Após a replicação do núcleo, o parasito é denominado esquizonte e se desenvolve por esquizogonia, levando à formação de merozoítas que serão liberados na corrente sanguínea com o rompimento do eritrócito e, por fim, invadem novos eritrócitos, iniciando novo ciclo eritrocítico (**figura 6**) (Olliaro, Yuthavong, 1999; Cogswell, 1983; Ramasamy, 1998). O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 horas, nas infecções pelo *P. malariae* (Braga, Fontes, 2000).

Ao penetrarem nos eritrócitos, alguns merozoítas diferenciam-se em estágios sexuais masculino e feminino, denominados gametócitos, que não mais se dividem e somente têm desenvolvimento no mosquito vetor, para darem origem aos esporozoítas (Braga, Fontes, 2000; Ramasamy, 1998).

Durante a maturação no eritrócito, o parasita remodela a célula hospedeira, envolvendo a inserção de proteínas e fosfolípidos do parasita na membrana eritrocitária. A fonte de nutrição de trofozoítas e esquizontes sanguíneos é a hemoglobina, porém alguns componentes metabólicos necessários ao seu desenvolvimento são procedentes do plasma, como glicose, metionina, biotina, certas purinas, fosfato e ácido paraminobenzóico (PABA) (Braga, Fontes, 2000).

Muitas pesquisas têm sido direcionadas para o estudo da dependência bioquímica, pois o parasito precisa dos eritrócitos para fazer a replicação do DNA e produzir rapidamente numerosos merozoítas. O *Plasmodium sp* pode e deve sintetizar suas próprias pirimidinas (citosina, uracila, timina) porque não pode usar pirimidinas do hospedeiro.

Entretanto, o parasito não pode sintetizar purinas (adenina e guanina) e deve obtê-las dos eritrócitos do hospedeiro (Olliaro, Yuthavong, 1999; Defrees *et al.*, 1988). Hemoglobina e plasma do hospedeiro são digeridos pelas enzimas do parasito e usados como fonte de vários aminoácidos. A hemoglobina do hospedeiro é ingerida através de organela especializada do parasito denominada citóstoma e digerida dentro de vacúolo digestivo. Ocorre formação do pigmento malárico hemozoína que consiste em monômeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX (heme), metemoglobina e proteínas plasmodiais (Braga, Fontes, 2000). Após o término da esquizogonia e o rompimento dos eritrócitos parasitados, o pigmento malárico acumulado no citoplasma do eritrócito é liberado no plasma e, posteriormente, fagocitado pelas células de *Kupffer* no fígado ou pelos macrófagos do baço e de outros órgãos (Braga, Fontes, 2000). O parasita parece depender do hospedeiro como fonte de pentoses para síntese de DNA e RNA e requer colesterol e ácidos graxos para a biossíntese de glicerídeos e células da membrana, pois não é capaz de sintetizá-los *per se*. Além disso, necessitam da maioria das vitaminas e coenzimas requeridas pelo hospedeiro. Similar às bactérias, o parasita deve sintetizar seu próprio ácido fólico e, portanto, fármacos que bloqueiam a biossíntese de ácido fólico podem banir o crescimento do parasito da malária (Cabantchik, 1989; Francis *et al.*, 1997; Sherman, 1985; Sherman, 1988). Grandes quantidades de glicose são utilizadas pelo parasita, particularmente durante o estágio eritrocítico, podendo ter como resultado a hipoglicemia em alguns pacientes, precisando tratamento com glicose parenteral em casos críticos (Davis, 1997; Sherman, 1985; Sherman, 1988). A bioquímica da dependência do parasito em relação ao hospedeiro tem sido amplamente estudada, objetivando o conhecimento da vulnerabilidade do protozoário, para que se possa efetuar o planejamento de fármacos mais efetivos para a terapêutica da malária (Cabantchik, 1989; Foley, Tilley, 1997).

Apenas o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patologias da malária. A destruição dos eritrócitos e conseqüente liberação dos parasitos e dos metabólitos na circulação provocam resposta do hospedeiro, determinando alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária. Os possíveis mecanismos determinantes das diferentes formas clínicas da doença baseiam-se, fundamentalmente, na interação de fenômenos patogênicos como a destruição dos eritrócitos parasitados,

toxicidade resultante da liberação de citocinas e seqüestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar, no caso específico do *P. falciparum* (Braga, Fontes, 2000; Karunaweera *et al.*, 1992; Ramasamy, 1998; Stanley, 1997).

O processo de destruição dos eritrócitos está presente em todos os tipos de malária e, de certa forma, participam do desenvolvimento da anemia, embora a anemia não se correlacione com a parasitemia, na maior parte dos casos (Braga, Fonte, 2000).

O evento inicial da patologia malarial parece ser ativação e mobilização de macrófagos e monócitos, os quais promovem liberação de citocinas próinflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8, no momento da ruptura do esquizonte (Clark *et al.*, 1981). Pesquisas recentes têm identificado e caracterizado, material glicolipídico com propriedades semelhantes à toxina bacteriana entre os metabólitos. Tais estudos relataram que glicosilfosfatidilinositol (GPI), a molécula âncora das proteínas de superfície do merozoíta (MSP-1), bem como hemozoína induzem secreção de citocinas (TNF, IL-1, IL-6 e IL-8) (Schofield, Hackett, 1993; Naik *et al.*, 2000). Tais citocinas estão associadas aos sintomas de febre e mal-estar da malária aguda (Braga, Fontes, 2000). Naik e colaboradores (2000) mostraram que anticorpos IgG específicos anti-GPI estão relacionados à proteção da malária grave e concluíram que a produção de TNF é induzida por toxina. Terapia de anticorpo monoclonal anti-TNF reduziu febre em crianças com malária grave, porém foi incapaz de prevenir mortes relacionadas à malária cerebral (Van Hensbroek *et al.*, 1996). Entretanto, TNF é importante para controle da parasitemia, pois produção inicial de TNF pode ser usual para resposta próinflamatória atuando na redução da parasitemia (Miller *et al.*, 2002). Em contrapartida, produção excessiva de TNF em estágio tardio conduz à doença grave (Souza, Riley, 2002). Esta ação dual de TNF indica que regulação e ritmo de produção de citocina são eventos importantes para êxito de eliminar a infecção (Omer *et al.*, 2000). Estudos recentes da malária grave em humanos e camundongos têm avaliado os efeitos antinflamatórios e próinflamatórios das citocinas (Souza, Riley, 2002), relatando taxas elevadas de TNF e interleucina (IL)-10 em crianças com anemia grave (Day *et al.*, 1999). Morte em adultos foi associada a taxas elevadas de IL-6 e IL-10 (Kurtzhals *et al.*, 1998). Acredita-se que TNF atue de forma direta

sobre o endotélio e, de forma indireta, induzindo moléculas de citoaderência. Como consequência da lesão endotelial, pode haver extravasamento de líquido para o espaço intersticial de estruturas nobres como os alvéolos e glomérulos, produzindo manifestações de malária grave pulmonar e renal, respectivamente (Braga, Fontes, 2000). Outras ações tóxicas das citocinas foram demonstradas na malária grave, consistindo da atividade inibitória da gliconeogênese, responsável pela hipoglicemia e os efeitos sobre a placenta, responsáveis pela gravidade da malária, tanto para a mãe quanto para o feto (Braga, Fontes, 2000). Estudos têm demonstrado que as citocinas ativam a enzima sintase aumentado a produção de óxido nítrico pelos leucócitos, músculo liso, micróglia e endotélio vascular, sendo implicado na patogenia de algumas complicações da malária grave, como o coma, já que o óxido nítrico é potente inibidor de função celular (Souza, Riley, 2002).

Importante diferença entre *P. falciparum* e outras espécies do parasito que afligem o homem é a modificação mecânica da superfície do eritrócito provocada pelo *P. falciparum*, tanto que os parasitos assexuados podem aderir à placenta e ambos gametócitos e parasitos assexuados, ao endotélio (Chen *et al.*, 2000; Newbold *et al.*, 1999).

A superfície do eritrócito infectado com trofozoíta-esquizonte do *P. falciparum* sofre série de modificações morfológicas, apresentando-se revestida por protuberâncias constituídas por diversas proteínas induzidas pelo *P. falciparum*, dentre elas, a proteína de membrana eritrocítica (PfEMP-1) (Luse, Miller, 1971). As proteínas de membrana eritrocítica do *P. falciparum* (PfEMP-1), expressas na superfície externa dos eritrócitos infectados (Chen *et al.*, 2000; Newbold *et al.*, 1999) mediam o fenômeno de citoaderência ou adesão celular, pois se ligam a proteínas ou receptores nos tecidos e órgãos do hospedeiro. Os parasitos seqüestram em vários órgãos incluindo cérebro, rins, fígado, coração, pulmão, tecido subcutâneo e placenta (Miller *et al.*, 2002).

Proteínas diferentes do hospedeiro participam do processo de adesão celular, sendo o antígeno de diferenciação leucocitária (CD36) e a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), as mais importantes (Braga, Fontes, 2000). A proteína ICAM-1 parece ser o principal ligante na malária cerebral (Newbold *et al.*, 1999) e CD-36, nas complicações de

outros órgãos. TNF e outras citocinas podem estimular a expressão de moléculas de adesão, principalmente ICAM-1, nos capilares cerebrais (Braga, Fontes, 2000).

O fenômeno de adesão celular observado entre eritrócitos parasitados é denominado roseta, já entre eritrócitos parasitados e não parasitados, auto-aglutinação. As moléculas envolvidas nestes tipos de adesão incluem receptor complementar 1 (CR-1) e CD-36, respectivamente (Chen *et al.*, 2000; Rowe *et al.*, 1997).

A citoaderência endotelial, os fenômenos de rosetas e auto-aglutinação ocorrem nas vênulas capilares de órgãos vitais, como substância branca do cérebro, coração, fígado, rins, intestino, entre outros órgãos. Dependendo da intensidade, podem levar à obstrução da microcirculação e à conseqüente redução do fluxo de oxigênio, ao metabolismo anaeróbico e à acidose láctica. O cérebro, rins e fígado são alvos diretos dessa agressão, cujos danos são responsáveis pelas complicações da malária cerebral, insuficiência renal aguda e hepatite, comuns nos quadros de malária grave (Braga, Fontes, 2000).

A adesão celular protege o parasito contra destruição, já que os eritrócitos parasitados não aderentes são removidos rapidamente através do baço (Langreth, Peterson, 1985). Pesquisadores têm acreditado que citoaderência ou fenômeno de seqüestro é determinante chave da virulência do parasito e responsável pelo desenvolvimento de malária grave ou associado à malária cerebral, cuja síndrome é normalmente fatal (Cooke *et al.*, 2000).

O processo patogênico de adesão é muito estudado, porém pouco entendido devido à sua complexidade, pois entendimento preciso envolve caracterização de mecanismos moleculares da citoaderência, incluindo sítios de seqüestro, identidade dos receptores e mapeamento detalhado dos domínios moleculares (Cooke *et al.*, 2000). O entrave maior é que os poucos laboratórios existentes nas áreas endêmicas são pobremente equipados para conduzir estudos complexos como esses, havendo necessidade de coletar parasitos durante períodos de transmissão intensa da malária e enviá-los para centros mais estruturados. Então, surgem outras questões a serem consideradas no sentido dos parasitos

coletados representarem ou não, quando do estudo, os mesmos parasitos coletados dos indivíduos infectados no campo. Deveras ocorram inúmeros problemas, pesquisas têm ressaltado a importância de conexão entre cientistas de centros desenvolvidos com cientistas dos países endêmicos, os quais possuem melhor entendimento dos costumes locais e estabelecem comunicação com pessoas resistentes desses países, de extrema pobreza (Miller *et al.*, 2002).

2.1.4.2- Ciclo Biológico do *Plasmodium* sp: Aspectos Morfológicos e Mecanismos Celulares de Invasão no Hospedeiro Invertebrado

O ciclo no mosquito envolve a fertilização do gametócito feminino pelo masculino, dando origem ao ciclo sexuado. No intestino médio do mosquito, fatores como temperatura inferior a 30°C e aumento do pH por baixa pressão de CO₂ estimulam o processo de gametogênese, ou, transformação de gametócitos em gametas extracelulares, em poucos minutos após a ingestão do sangue. O gametócito feminino transforma-se em macrogameta que consiste em célula com estrutura proeminente na superfície, por onde se dá a penetração do microgameta. O gametócito masculino forma oito microgametas, os quais são células flageladas originárias de processo de exflagelação. Durante 20 a 30 minutos, um microgameta fecunda um macrogameta, formando o zigoto. Após 24 horas da fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, denominado de oocineto. Este apresenta forma alongada de aspecto vermiforme, móvel, contendo núcleo volumoso e excêntrico, atravessa a matriz peritrófica e atinge a parede do intestino médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, passando a ser chamado oocisto. O oocisto, por si, apresenta estrutura esférica de 40 a 80 µm, grânulos pigmentados em seu interior e envolto por cápsula com espessura de 0,1 µm. Em infecções antigas a parede do oocisto se mantém aderida ao intestino médio, tornando-se quitinosa. O processo de divisão esporogônica tem início e, após um período de 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto. A estimativa é que um único oocisto possa produzir, em média, 1.000 esporozoítas. Os esporozoítas formados durante a esporogonia são liberados e disseminados por todo o corpo do inseto através da hemolinfa até atingir as células das glândulas salivares. Estes

esporozoítas atingem o canal central da glândula e ingressam no ducto salivar para serem injetados, durante o repasto sangüíneo infectante (Braga, Fontes, 2000; Ramasamy, 1998).

2.1.5- DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da malária é possível somente pela demonstração do parasita ou de antígenos relacionados no sangue periférico do paciente. A OMS, em suas orientações atuais para o controle mundial, preconiza tanto o diagnóstico clínico quanto o diagnóstico laboratorial como norteadores para terapêutica da doença (W.H.O., 2002a).

No diagnóstico clínico, orientações dos programas oficiais de controle são seguidas, nas quais indivíduos com febre são considerados portadores de malária em situações de epidemias e em áreas de acesso difícil aos serviços de saúde pela população. Os sintomas da malária são inespecíficos, não prestando à distinção entre outras infecções agudas do homem e, além disso, indivíduos semi-imunes ao plasmódio podem ter parasitas, porém não apresentarem sintomas da doença (Segurado *et al.*, 1997). Por tudo isso, o elemento fundamental no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas, é considerar a possibilidade da doença (Braga, Fontes, 2000).

O diagnóstico laboratorial é feito pela pesquisa do parasita no sangue periférico, seja pelo método da gota espessa ou do esfregaço sangüíneo. Estas técnicas baseiam-se na visualização do parasita através de microscopia ótica, após coloração com corante vital (azul de metileno e Giemsa). Estes são os únicos métodos que permitem a diferenciação específica dos parasitas a partir de análise da sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado. É preciso salientar que para a detecção dos parasitas da malária por um exame microscópico comum, um mínimo de 10 plasmódios por milímetro cúbico de sangue é normalmente requerido. Em função da simplicidade de realização, baixo custo e eficiência diagnóstica, o exame da gota espessa tem sido utilizado em todo o mundo para o diagnóstico específico da malária. Determinação de densidade parasitária pode ser útil para avaliação prognóstica e deve ser realizada em todo paciente com malária, especialmente nos portadores de *P. falciparum* (Dutra, 2001).

O diagnóstico específico de malária, atendendo a todos requisitos solicitados pela OMS, é impraticável em muitos locais onde a malária ocorre, quer pela precariedade dos serviços de saúde ou pela dificuldade de acesso aos centros de diagnóstico pela população. Por esta razão, nos últimos 10 anos, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos pelos laboratórios farmacêuticos e comercializados. Apesar de promissores, tais testes ainda não são comercializados no Brasil e poucos estudos de campo foram feitos para determinar a efetividade no diagnóstico da malária (Moody, 2002; Labbe *et al.*, 2001).

2.1.6- RESISTÊNCIA

A resistência aos antimaláricos tem ampla distribuição no mundo e é um dos entraves para o controle da malária, valendo lembrar que a disseminação de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, hoje, praticamente se sobrepõe à distribuição geográfica da endemia (Noronha *et al.*, 2000).

O aparecimento de resistência está relacionado às alterações no alvo do fármaco, tais como mudança no pH do vacúolo digestivo, presença de glicoproteína Pgh, que possivelmente esteja envolvida no transporte de fármacos para o exterior do vacúolo. Os parasitas têm genomas extremamente complexos, possuindo facilidade em alterar seu metabolismo através de mutações cromossômicas nos microambientes de diferentes hospedeiros (Le Bras, 1999). O mecanismo de resistência às sulfonamidas e sulfonas é explicado pelo envolvimento de mutações da diidropteroatossintase, o alvo enzimático destes fármacos no parasita. Existem evidências indicando que as espécies de *P. falciparum* resistentes têm a característica de acumular menos fármaco, como é o caso que ocorre com cepas resistentes à cloroquina (Le Bras, 1999; Adam, 1989). Fatores ligados ao hospedeiro, às condições sócio-econômicas e, geralmente, o uso freqüente, abusivo e indiscriminado dos fármacos corrobora para a disseminação de cepas resistentes (Adam, 1989; Noronha, *et al.*, 2000).

O primeiro caso de resistência aos antimaláricos foi relatado em 1945 com a pirimetamina e outros antagonistas do ácido fólico e foi disseminado por vastas áreas das

regiões, assumindo, na atualidade proporções alarmantes. No Brasil, a resistência à quinina foi relatada pela primeira vez por Couto em 1908. Porém, a combinação de quinina e tetraciclina mostrou a eficácia deste esquema em relação à quinina utilizado como medicação única (Boulos *et al.*, 1986). Segurado e colaboradores (1997) avaliaram a resistência do *Plasmodium falciparum* aos fármacos antimaláricos rotineiramente empregados no Brasil e constataram alto grau de resistência à cloroquina e amodiaquina, indicando aumento na resistência do parasita à quinina na Amazônia brasileira. Reitera-se, assim, a necessidade de monitorização contínua da sensibilidade a antimaláricos, com o intuito de recomendar esquemas mais eficazes na terapêutica da malária, em especial, por *P. falciparum*.

2.1.7- QUIMIOTERAPIA

O tratamento adequado e oportuno da malária é hoje principal alicerce para controle ou combate da doença (Gogtay *et al.*, 2000). No entanto, tem se tornado complexo devido às limitações da quimioterapia para enfrentar aumento de espécies de *Plasmodium* resistentes (Trigg, Kondrachine, 1998). A escolha do esquema de tratamento deve ser adaptada às espécies diferentes de *Plasmodium*, pois estes exibem graus de resposta variáveis aos quimioterápicos e ser adaptado à situação do paciente (Rathod *et al.*, 1997).

A **tabela I** apresenta um resumo dos fármacos utilizados no tratamento e na quimioprofilaxia da malária.

TABELA I- Resumo de tratamento e quimioprophilaxia da malária[§].

INFECÇÕES	ATAQUE CLÍNICO	QUIMIOPROFILAXIA
Todas infecções por <i>Plasmodium</i> *	cloroquina (VO)** ou sulfadoxina-pirimetamina	cloroquina ou proguanil (VO)
<i>P. falciparum</i> resistente à CQ	quinina (VO)** e (i) tetraciclina ou (ii) doxiciclina [#] ou halofantrina ^{##} (VO) ou mefloquina [°] (VO)	cloroquina (VO) e (i) proguanil ou (ii) doxiciclina [#] ou (iii) pirimetamina-dapsona ou Mefloquina ^{°°} (VO)

[§]As combinações dos fármacos devem ser adequadas às áreas malarígenas; * exceto infecções por *P. falciparum* resistentes à CQ (cloroquina); **pode ser administrada por infusão, se VO (via oral) não for possível; [#]contra-indicada para crianças menores de 12 anos de idade, gestantes e lactantes; ^{##}pode causar problemas cardíacos; [°]incidência de efeitos colaterais; ^{°°}não deve ser utilizada para quimioprophilaxia, a não ser que haja risco de malária resistente à CQ (Adaptada de Rang *et al.*, 2001).

No Brasil, muitos fatores têm de ser levados em consideração para que se possa efetuar escolha do esquema de tratamento no Brasil. Medicação, via de administração e duração do tratamento devem ser adequados à gravidade da infecção e às condições do paciente, tais como idade, imunidade ao parasito e gestação. A **tabela II** apresenta esquema de tratamento sugerido pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN).

TABELA II- Esquema de tratamento da malária no Brasil.

FÁRMACO	DOSES			
	Adultos	Crianças	Gestantes	Duração
cloroquina	600 mg/d	150 mg/d	600 mg/d	3 d*
mefloquina	1000 mg/d	250 mg/d	500 mg/d	7 d
primaquina	15 mg/d	5 mg/d	contra-indicado	14 d
sulfato de quinina	1500 mg/d	500 mg/d	500 mg/d	7 d
artemeter	80 mg/d	3,2 mg/d	80 mg/d	6 d
artemeter	80 mg/d	3,2 mg/d	80 mg/d	6 d
artesunato	1 mg/Kg/d	1 mg/Kg/d	1 mg/Kg/d	4 doses
clindamicina	600 mg/d	300 mg/d	300 mg/d	6 d
doxiciclina	200 mg/d	8 a 100 mg/d	contra-indicado	6 d
tetraciclina	500 mg/d	8 a 250 mg/d	contra-indicado	6 d

* d = dias

Fonte: Solis, 2002.

A quimioterapia antimalárica pode ser classificada quanto à ação contra estágios diferentes do ciclo de vida do parasito (**figura 12**).

Esquizonticidas sangüíneos: fármacos que inibem o desenvolvimento de esquizontes na corrente sanguínea, no estágio eritrocítico. Dentre tais fármacos estão amodiaquina, cloroquina, hidroxicloroquina, quinina, mefloquina, artemisinina e derivados, halofantrina, tetraciclina, sulfas e sulfonas (Ferreira, 1998; Warshurst, 1999; Casteel, 1996).

Esquizonticidas teciduais: fármacos capazes de exterminar os esquizontes do estágio exoeritrocítico. Os fármacos assim classificados são primaquina, proguanila e pirimetamina. (Ferreira, 1998; Warhurst, 1999; Casteel, 1996).

Gametocitocidas: fármacos que destroem os gametócitos, formas sexuais eritrocíticas, como cloroquina, primaquina e quinina (Ferreira, 1998; Warhurst, 1999; Casteel, 1996).

Esporonticidas: fármacos capazes de bloquear a esporogonia, no mosquito, através de alterações nos gametócitos, impedindo a proliferação de formas infectantes. São eles proguanila, primaquina e pirimetamina (Ferreira, 1998; Warhurst, 1999; Casteel, 1996).

Durante anos, estágios eritrocíticos têm sido alvo de intervenção quimioterápica, já que em infecções causadas por *P. falciparum*, os trofozoítas maduros e esquizontes são seqüestrados em vênulas do cérebro e outros órgãos, conduzindo a complicações graves, podendo levar à morte do hospedeiro. Os estágios hepáticos também merecem atenção, pois são responsáveis pelos casos de recaídas de malária, causadas por *P. vivax* (Butcher, 1997).

FIGURA 12- Ação dos fármacos antimaláricos de acordo com a fase do ciclo do *Plasmodium sp* (Fonte: Ferreira, E. I. In: Silva, P., 1998).

A complexidade do ciclo evolutivo do *Plasmodium sp* é responsável pela dificuldade da identificação de alvos para os fármacos antimaláricos (Olliari, Yuthavong, 1999). O estágio pré-eritrocítico e estágio eritrocítico de *P. vivax* não podem ser estudados, pois não podem ser cultivados e testados. Atividade inibitória de formação do gametócito e atividade gametocítica não podem ser sistematicamente avaliadas, portanto, os compostos são selecionados e testados em ratos, através de modelos específicos para malária (Alecrim, 1986) que permitem idéia inicial da atividade e biodisponibilidade da substância. Por outro lado, tais modelos apresentam limitações como especificidade do composto para certas espécies de *Plasmodium* e diferenças do parasito em relação ao organismo humano nos perfis de absorção, metabolismo e eliminação. Macacos *Aotus* podem ser infectados com *P. falciparum*, porém esse modelo deve ser usado apenas em avaliações terciárias, posterior às avaliações *in vitro* e após as realizadas *in vivo* em roedores, devido ao custo elevado e às limitações impostas pelo conselho de ética (Olliari, Yuthavong, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados com intuito de investigar os alvos existentes ou descobrir outros, visando à obtenção de compostos estrategicamente planejados. Para isso, enzimas como diidrofolato redutase (DHFR) e proteinases ou reações como polimerização

de heme têm sido disponíveis, juntamente com bibliotecas combinatoriais. Deveras, mesmo com todos os avanços, a atividade biológica do composto tem de ser confirmada em sistema de crescimento do parasito (Olliaro, Yuthavong, 1999).

Olliaro e Yuthavong (1999) classificaram alvos para quimioterapia antimalárica em três categorias, como forma de conveniência para compreensão (**tabela III**).

- Alvos responsáveis por processos ocorrentes no vacúolo digestivo do *Plasmodium* *sp* como digestão de hemoglobina e destoxificação de heme, mecanismos antioxidantes de defesa do hospedeiro e parasito. Além, a membrana do vacúolo digestivo que parece estar envolvida no acúmulo de fármaco no interior do vacúolo e transporte de fármaco para o exterior do vacúolo digestivo.

- Enzimas envolvidas na síntese metabólica de ácido nucléico, de fosfolípídeo, glicólise e montagem de tubulina.

-Enzimas responsáveis pelos processos de membrana, incluindo transporte de nutrientes para o parasito, transporte de fármacos e sinalização.

TABELA III - Resumo das principais enzimas atuantes em processos vitais para o *Plasmodium* e que podem ser alvos quimioterápicos.

PROCESSO METABÓLICO	ENZIMA/ PROCESSO ENZIMÁTICO
Metabolismo da hemoglobina	Plasmepsina I, II (proteinases; catepsina-D) Falcipaina (cisteína proteinase; catepsina-L) Polimerização de heme, despolimerização Síntese de heme
Metabolismo de folato	DHFR-timidilato sintase
Síntese de pirimidinas, transporte de elétrons	Carbamoil-fosfato-sintase II Diidroorotato desidrogenase Citocromo oxidase
RNA /DNA	RNA polimerase Ribonucleotídeo redutase Topoisomerase I e II
Glicólise	Lactato desidrogenase
Metabolismo de fosfolípídeo	Síntese de fosfatidilserina
Defesa oxidante	Glutathione redutase Superóxido dismutase
Dano oxidante	Potencialização de fármacos oxidantes

Adaptada de Olliaro, Yuthavong, 1999.

Os antimaláricos podem também ser classificados quimicamente como diaminopirimidínicos (pirimetamina), aminoquinolínicos (cloroquina, primaquina e amodiaquina), quinolinometanólicos (mefloquina), fenantrenometanólicos (halofantrina), derivados lactônicos sesquiterpênicos (artemisinina), sulfas (sulfadoxina), sulfonas (dapsona), antibióticos (doxiciclina). Abaixo (**figura 13**) encontram-se representadas algumas estruturas químicas de fármacos antimaláricos (Casteel, 1996; Warhurst, 1999).

FIGURA 13- Estruturas químicas dos principais fármacos antimaláricos. Fármacos quinolínicos apresentam estruturas azuis (Fonte: Casteel, D.A. In: WOLFF, M.E., 1996).

2.1.7.1- Fármacos Quinolínicos

Fármacos contendo sistema quinolínico têm sido utilizados no combate à malária por muitos anos. Em 1940, cloroquina, o primeiro fármaco quinolínico sintético foi introduzido na terapêutica (Loeb *et al.*, 1946). O sucesso da cloroquina conduziu à esperança de que a malária pudesse ser erradicada do mundo. Na década de 1960, a profilaxia, através da cloroquina antimaláricos, teve grande impulso, juntamente com uso de inseticidas na tentativa de exterminar o mosquito. Os esforços foram infrutíferos, pois surgiram mosquitos resistentes aos inseticidas e cepas resistentes aos fármacos disponíveis.

A situação de resistência conduziu à pesquisa por agentes alternativos tais como amodiaquina e mefloquina (Foley, Tiley, 1998).

Fármacos 4-aminoquinolínicos

Os fármacos 4-aminoquinolínicos como cloroquina e amodiaquina são bem tolerados, baratos e efetivos na ausência de parasitos resistentes (Hawley *et al.*, 1996a). Estudos relatam que a capacidade destes compostos inibirem o crescimento do parasito é atribuída ao acúmulo dos fármacos em altas concentrações no interior do vacúolo digestivo do parasito (Geary *et al.*, 1986; De Duve *et al.*, 1974; Zarchin *et al.*, 1986).

- **Cloroquina**

A cloroquina (**figura 14**) é agente esquizonticida sangüíneo potente, eficaz contra formas eritrocíticas das quatro espécies de *Plasmodium*, quando sensíveis ao fármaco, porém não exerce efeito algum sobre esporozoítas, hipnozoítas ou gametócitos (Rang *et al.*, 2001). Estudos de microscopia eletrônica avaliaram o efeito que os fármacos 4-aminoquinolínicos provocavam em *P. falciparum* e constataram ocorrência de modificações morfológicas como inchaço do vacúolo digestivo, vesiculação e acúmulo de hemoglobina não digerida (Yayon *et al.*, 1984).

A farmacocinética da cloroquina tem sido revisada (Mc Chesney, Fitch, 1984; White, 1985; Na-Bangchang *et al.*, 1994). A cloroquina é administrada por via oral é bem absorvida e apresenta biodisponibilidade entre 70 a 80%. Distribui-se amplamente pelos tecidos, porém concentra-se nos eritrócitos parasitados. Com administração semanal de 300 mg de cloroquina, o pico plasmático do fármaco situa-se em torno de 200 ng/mL (0,4 μ M), caindo para 20 ng/mL, priorizando a dose sucessiva (Wetsteyn *et al.*, 1995). Este nível plasmático é comparável à concentração terapêutica para parasitos sensíveis à cloroquina, o qual apresenta-se em torno de 30 ng/mL. É liberada lentamente pelos tecidos e metabolizada no fígado. A excreção é através da urina apresentando perfil de 63% de cloroquina, na forma inalterada, 14% de desetilcloroquina, 1% de bisdesetilcloroquina, 4%

de 4-amino-7-cloroquinolina, 1,5% de 4-hidróxi-7-cloroquinolina e 17% de metabólitos não identificados (McChesney *et al.*, 1966). A eliminação é lenta e a principal fase possui meia-vida de 50 horas (Furst, 1996).

FIGURA 14- Estrutura química da cloroquina. A estrutura da quinolina é mostrada em azul (Fonte: Casteel, D.A. In: WOLFF, M.E., 1996).

A cloroquina apresenta índice terapêutico muito baixo para o tratamento da malária, sendo que a dose de cura para indivíduo adulto é de 10 mg/Kg, enquanto 30 mg/Kg representam dose potencialmente letal. Efeitos indesejáveis tais como náusea, vômitos, visão turva, cefaléia e sintomas de urticária podem ocorrer quando utilizada para tratar o ataque clínico (Luzzi, Peto, 1993). Porém, possui poucos efeitos colaterais quando administrada para quimioprofilaxia (Rang, *et al.*, 2001).

Cloroquina é fármaco de escolha quando viajantes se locomovem para áreas onde não há parasitos resistentes, caso contrário, as opções para quimioprofilaxia consistem na administração de mefloquina, associação de atovaquona-proguanil e doxiciclina. Menos comum, porém usual é primaquina ou associação de cloroquina e proguanil. A cloroquina pode ser administrada para indivíduos de todas idades e durante gravidez (Kain *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação através do qual a cloroquina exerce seu efeito não é totalmente esclarecido, no entanto, existem hipóteses diferentes abordadas por vários pesquisadores (Cohen, Yielding, 1965a; Warhurst, Hockley, 1967; El Shoura, 1994; De Duve *et al.*, 1974; Zarchin *et al.*, 1986; Hawley *et al.*, 1996a; Hawley *et al.*, 1996b; Hawley

et al., 1998; Krogstad *et al.*, 1985; Egan *et al.*, 1994; Egan *et al.*, 1997; Raynes, 1999; Vippagunta *et al.*, 1999; Famin, Ginsburg, 2002; Buller *et al.*, 2002).

A hipótese mais antiga sugere que a atividade antimalárica da cloroquina seja proveniente de interações do fármaco com DNA. Esta hipótese foi sustentada por estudos que demonstraram interação de 4-aminoquinolínicos com DNA (Cohen, Yielding, 1965a) e habilidade de alguns quinolínicos inibirem replicação de DNA e síntese de RNA em concentrações altas (Cohen, Yielding, 1965b). Tal hipótese foi contrariada através de estudos feitos por Allison e colaboradores (1965), pois relataram que o processo de replicação do DNA no *Plasmodium sp* deveria ser menos susceptível à cloroquina do que o sistema humano, já que cloroquina interage com mais eficiência com DNA rico em guanina e citosina, enquanto o genoma do *Plasmodium sp* é rico em bases adenina e timina (Foley, Tilley, 1998).

Outra hipótese consiste no modelo da base fraca o qual permite o acúmulo de cloroquina no interior do vacúolo digestivo do parasito, dependendo apenas do gradiente de pH entre o meio extracelular e o vacúolo digestivo. Cloroquina é base fraca diprótica, capaz de atravessar membranas do eritrócito parasitado na forma de base livre, sendo protonada no vacúolo digestivo do parasito, o qual apresenta característica ácida (pH 5 – 5,2). O fármaco protonado torna-se impermeável à membrana e se acumula no interior do parasito (Hawley *et al.*, 1996b). O acúmulo desta base fraca provoca aumento temporário de pH no compartimento ácido, causando inibição de enzimas vacuolares participantes do processo de digestão de hemoglobina (De Duve *et al.*, 1974; Zarchin *et al.*, 1986). Estudos têm indicado que a difusão passiva é suficiente para explicar a cinética de acúmulo da cloroquina (Krogstad *et al.*, 1985). No entanto, estudos mais recentes (Sanchez *et al.*, 1997) têm provado que a entrada da cloroquina é suportada por mecanismo mediado por carreador, implicando transportador de troca de Na^+ / H^+ . Tal transportador da membrana plasmática do parasito está envolvido com entrada de prótons gerados durante a glicólise (Bosia *et al.*, 1993). A proposta (**figura 15**) para a cloroquina é que ela se ligue no sítio do Na^+ sendo transportada para o interior e ocorra troca por prótons. Tal hipótese foi

corroborada através de constatação de que 5-(*N*-etil-*N*-isopropil)amilorida apresentou interação com sítio de ligação ao Na^+ no transportador, inibindo acúmulo de cloroquina, de forma competitiva e dependente da dose (Aronson, 1985).

FIGURA 15- Mecanismo proposto para entrada e acúmulo de cloroquina em parasito sensível ao fármaco. A cloroquina se acumula no vacúolo digestivo como resultado de difusão passiva através do gradiente de pH e/ ou via transportador Na^+/H^+ (Adaptado de Foley, Tiley, 1998).

Outro modo de ação possível da cloroquina é como agente inibidor de captação (Gonzalez-Noriega *et al.*, 1980) ou degradação de hemoglobina (Gonzalez-Noriega *et al.*, 1980; Famin, Ginsburg, 2002). Em células de mamíferos cultivadas, tratamento com cloroquina reduziu a captação de hidrolases ácidas nos lisossomas, pela interação prejudicial em células de superfície, promovendo inibição de endocitose (Gonzalez-Noriega *et al.*, 1980). Além, cloroquina prejudica a renovação de receptores, os quais parecem ser necessários para captação de enzimas lisossomais (Gonzalez-Noriega *et al.*, 1980). O tratamento com cloroquina de eritrócitos infectados por trofoítas inibiu degradação de proteínas, sugerindo que a função lisossomal pode conduzir à atividade inibitória de degradação de hemoglobina e, por fim, morte do parasito por falta de alimento (Vander Jagt *et al.*, 1986). Contudo, pesquisadores têm observado que, enquanto a inibição do processo de digestão de hemoglobina é reversível, inibição do crescimento dos parasitos sensíveis à cloroquina é processo irreversível (Ginsburg, Krugliak, 1992). Esta hipótese conduz à

sugestão que tais fármacos podem inibir o processo digestivo e terem mecanismo adicional irreversível (Raynes, 1999).

Mecanismo de ação alternativo proposto para cloroquina consiste na inibição da biossíntese de hemozoína (Slater, Cerami, 1992). Durante o catabolismo de hemoglobina do hospedeiro é formado sub-produto tóxico, denominado ferro II-protopofirina IX [Fe(II)PPIX] ou heme monomérico (Goldberg *et al.*, 1992). O parasito destoxifica heme, seqüestrando a porção tóxica e formando polímero insolúvel inerte, conhecido como hemozoína ou pigmento malárico (Dorn *et al.*, 1998a; Raynes, 1999), já que não possui enzima heme oxigenase para quebrar o anel porfirínico, através de processo oxidativo, como ocorre em eucariontes mais evoluídos (Schacter, 1988).

A teoria da atividade inibitória de cloroquina na polimerização de heme e o entendimento mecanístico do processo de polimerização têm sido baseados em ensaios *in vitro*, os quais medem a incorporação de hematina livre [α -hematina ou Fe(III)PPIX] na formação de polímero β -hematina crescente, em 37° C e pH 4,8, condições similares às do vacúolo digestivo (Egan *et al.*, 1994; Dorn *et al.*, 1998a; Dorn *et al.*, 1998b). β -hematina é estruturalmente equivalente à hemozoína (Fitch, Kanjanangulpan, 1987) e o termo heme é reservado para Fe(II)PPIX (Dorn *et al.*, 1998b).

Estudos de difração de raios X têm caracterizado o polímero hemozoína (β -hematina) como complexo de coordenação não-covalente com íon ferro de uma porção de hematina quelada por cadeia de ácido propiônico da porção da hematina adjacente. O grupo propiônico pode formar ligação de hidrogênio com grupo propiônico de outro complexo, formando estrutura dimérica de hemozoína (**figura 16**) (Ridley *et al.*, 1995; Raynes, 1999).

FIGURA 16- Estrutura provável de hemozoína (pigmento malárico) (Fonte: Raynes, 1999).

Estudos sugeriram que polimerização de heme para hemozoína foi catalisada pela enzima hemepolimerase (Slater, Cerami, 1992). O processo *in vitro* de polimerização foi inibido pela cloroquina, propondo-se que cloroquina forma complexo com heme ou inibe, diretamente, a enzima hemepolimerase, levando ao acúmulo de heme tóxico. Entretanto, Egan e colaboradores (1994) observaram que a formação de hemozoína poderia ocorrer espontaneamente, sob condições predominantes no vacúolo digestivo do parasito. Tais pesquisadores mostraram que a reação de polimerização ocorria na ausência de proteínas e enzimas e poderia ser facilitada quimicamente. Ainda, relataram que cloroquina inibiu o processo espontâneo de polimerização, enquanto compostos quinolínicos, sem atividade antimalárica, não afetaram a reação e concluíram que a formação de hemozoína não requeria hemepolimerase (Egan *et al.*, 1994).

Outras investigações sugeriram que um componente promotor de polimerização era requerido *in vivo* e que este componente deveria ser a estrutura inibida pela cloroquina, pois a polimerização espontânea de hemozoína mostrou-se muito lenta sob as condições assumidas no vacúolo, não sendo capaz de explicar a eficiência do processo de degradação de heme (Raynes *et al.*, 1996). Dorn e colaboradores (1995) propuseram que o componente

catalítico em extratos de trofozoíta deveria ser polímeros de hemozoína pré-formados, os quais agem como sítios de nucleação para alongamento de polímeros heme. Porém, este mecanismo auto-catalítico não pode explicar a formação de polímeros heme em estágios iniciais de desenvolvimento do parasito. Para tal, propõe-se que no estágio de anel do parasito, a formação de polímeros heme pode ser catalisada por componentes lipídicos (Bendrat *et al.*, 1995) ou proteínas ricas em histidina (Sullivan *et al.*, 1996).

Apesar de as correlações entre inibição de polimerização de heme e atividade antimalárica serem razoáveis, há algumas controvérsias se a polimerização de heme é ou não o alvo *in vivo* dos antimaláricos quinolínicos. A confusão aumenta quando se observa que as concentrações de cloroquina requeridas para inibirem a sequestração de heme são maiores ao serem comparadas àquelas necessárias para inibirem 50% de crescimento do parasito. Das observações feitas que cloroquina pode se acumular no vacúolo digestivo, ela pode competir pelo substrato de heme e interagir fortemente com heme livre (Banyal, Fitch, 1982). Cloroquina mostrou que induz bloqueio de polímeros de hemozoína pré-formados (Sullivan *et al.*, 1996), prevenindo a destoxificação de heme. É possível, também, que o fármaco ou complexo heme-fármaco se ligue ao(s) componente(s) (hemozoína pré-formada ou proteínas), catalisando a polimerização de heme, conduzindo aos níveis aumentados de heme livre e complexos heme-fármaco. Finalmente, estudos têm sugerido que antimaláricos quinolínicos podem ligar-se ao heme seqüestrado e perturbar a coordenação dos polímeros, causando despolimerização de hemozoína e gerando mais porções de heme. A inibição de polimerização ou despolimerização de hemozoína resultaria na incapacidade do parasito em destoxificar heme e renderia parasitos susceptíveis aos efeitos tóxicos de heme (Raynes, 1999; Famin, Ginsburg, 2002).

As relações entre estrutura química e atividade antimalárica para cloroquina e derivados têm sido extensivamente estudadas (Slater, 1993; Bray *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1996; De *et al.*, 1998; Egan *et al.*, 2000; Kaschula *et al.*, 2002). Em geral, tem sido afirmado que compostos contendo dois ou mais átomos de nitrogênio capazes de serem protonados numa faixa de pH são potencialmente antimaláricos. A atividade é afetada por modificações químicas de acordo com a posição no sistema quinolínico, com a natureza dos

substituintes e ainda, de acordo com a alteração da cadeia lateral aminica na posição 4 do anel (Coatney, 1963; Ridley *et al.*, 1996; Stocks *et al.*, 2002; Ryckebusch *et al.*, 2003). A distância molecular entre o nitrogênio da quinolina e o nitrogênio alquilamino afeta o nível de atividade (Koh *et al.*, 1994) e pode ser importante para determinar a habilidade destes compostos se ligarem ao heme (O'Neill *et al.*, 1997). Compostos contendo amina terciária, geralmente, são mais efetivos que os com amina primária ou secundária (McChesney, Fitch, 1984; Ryckebusch *et al.*, 2003). De e colaboradores (1998) demonstraram que compostos relacionados à cloroquina com cadeia diaminoalquílica lateral curta (2 a 3 carbonos) ou longa (10 a 12 carbonos) e substituídos na posição 7 do anel quinolínico com iodo e bromo apresentaram atividade antimalárica contra cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina. Egan e colaboradores (2000) suportaram tal resultado e tentaram esclarecer dúvidas a respeito da contribuição dos substituintes na posição 7 do anel quinolínico. Constataram que a introdução do substituinte cloro na posição 7 pareceu ser fator responsável por inibir formação de β -hematina. Já compostos não substituídos na posição 7, não exibiram atividade inibitória de formação de β -hematina, nas condições experimentais utilizadas, confirmando os dados obtidos por Vippagunta e colaboradores (1999).

Neste mesmo estudo (Egan *et al.*, 2000), os autores propuseram modelo para as relações entre estrutura química e atividade antimalária para a cloroquina, mostrada na **figura 17**.

Segundo resultados obtidos por Egan e colaboradores (2000), o núcleo 4-aminoquinolínico promoveu complexação com ferriprotoporfirina IX [Fe(III)PPIX] através de interações π - π , porém não foi suficiente para inibir formação de hemozoína. Introdução de grupo cloro na posição 7 do anel quinolínico foi responsável por inibir formação de hemozoína, mas, provavelmente, teve pouca influência em relação à força de associação com Fe(III)PPIX. Cadeia lateral aminoalquílica foi requerida para atividade antimalárica ressaltada. Os autores sugeriram que ela auxiliou no acúmulo da cloroquina no vacúolo digestivo do parasito e pareceu aumentar a força de associação com Fe(III)PPIX, em alguns casos.

FIGURA 17- Modelo proposto para as relações entre estrutura química e atividade antimalárica para cloroquina (Fonte: Egan *et al.*, 2000).

- **Amodiaquina**

Amodiaquina (**figura 18**) é derivado 4-aminoquinolínico que tem sido administrada para tratamento e profilaxia da malária causada por *P. falciparum* (Hawley *et al.*, 1996b). Tal fármaco é estruturalmente relacionado à cloroquina, diferindo apenas pela presença de anel aromático *p*-hidroxianilino ao invés da cadeia aminoalquílica da cloroquina, provocando mudança de pKa, lipofilicidade e flexibilidade da cadeia lateral. (Foley, Tilley, 1998).

FIGURA 18- Estrutura química da amodiaquina. A estrutura da quinolina é mostrada em azul (Fonte: O'Neill *et al.*, 1994).

Amodiaquina é inibidor de crescimento do *P. falciparum in vitro* mais potente que cloroquina (Ekweozor *et al.*, 1987). A meia-vida é em torno de 50 horas, sendo rapidamente metabolizada *in vivo* a derivado desetilico (Churchil *et al.*, 1985), o qual tem atividade reduzida. Ambas, amodiaquina e desetilamodiaquina, sofrem metabolismo dependente do citocromo P450 para formarem derivados tóxicos do tipo quinona imina (Foley, Tilley, 1998).

Seu uso clínico tem sido restrito por estar associada a efeitos adversos como hepatotoxicidade (Neftel *et al.*, 1986) e agranulocitose (Lind *et al.*, 1973), quando utilizada para fins profiláticos. O'Neill e colaboradores tentaram explicar os efeitos adversos mediante processo de bioativação oxidativa, baseados no conhecimento de que acetaminofeno, o qual possui grupo hidroxianilino, sofre oxidação catalisada pelo citocromo P450 e forma quinona imina reativa. Pesquisadores extrapolaram tais observações para amodiaquina, já que esta também apresenta o mesmo grupo, questionando a possibilidade desta sofrer oxidação enzimática. Como resultado do estudo feito em ratos, amodiaquina foi excretada na bile como conjugados 5- tioéter (glutaciona e cisteinilados), indicando que amodiaquina sofreu bioativação *in vivo*, formando amodiaquinoquinona imina (AQQI) ou semiquinona imina (AQSQI), com subsequente adição conjugada de glutaciona (Harrison *et al.*, 1992; Maggs *et al.*, 1988) (**figura 19**). A formação de uma destas espécies reativas *in vivo* e a ligação às macromoléculas celulares poderia afetar, de forma direta, a função celular ou, indiretamente, através de mecanismos imunológicos. Corroborando tais informações, anticorpos IgG que reconhecem grupos 5-cisteinilados foram detectados em pacientes que apresentaram efeitos adversos produzidos pela amodiaquina (Clarke *et al.*, 1990).

FIGURA 19- Via oxidativa para amodiaquina (7) (Fonte: O'Neill *et al.*, 1994).

Amodiaquina inibe, de forma competitiva, o acúmulo de cloroquina e vice-versa, sugerindo que estes compostos apresentam mecanismo de acúmulo similar (Fitch, 1973). Amodiaquina é base fraca diprótica, mas os valores de pKa são mais baixos que cloroquina, tanto que seria esperado que ela se acumulasse com menos eficácia no vacúolo digestivo do parasito. Porém, amodiaquina é acumulada com muito mais eficácia que cloroquina, indicando que a entrada é realizada por mecanismo adicional (Hawley *et al.*, 1996c).

Amodiaquina tem mostrado que inibe polimerização de heme *in vitro*, com eficiência similar à da cloroquina (Slater, 1993), sugerindo que sua atividade antimalárica é exercida por mecanismo parecido (Foley, Tilley, 1998).

O'Neill e colaboradores (1997) desenvolveram síntese, avaliaram a atividade antimalárica e efetuaram modelagem molecular de análogos da amodiaquina. Como resultado e em concordância com estudos prévios (Koh *et al.*, 1994), propuseram modelo demonstrando as relações entre estrutura química e atividade antimalárica (figura 20).

FIGURA 20- Grupos farmacofóricos da amodiaquina e fatores do receptor proposto (Koh *et al.*, 1994) em comparação com a estrutura de Fe(III)PPIX (Fonte: O'Neill *et al.*, 1997).

Koh e colaboradores (1994) demonstraram que amodiaquina pode adotar conformação bioativa com separação internitrogênio (*N* quinolina – *N* dietila) de 8,30 Å. Eles ainda sugeriram que a conformação bioativa e a separação internitrogênio são dependentes de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre a função hidroxila e o próton no nitrogênio carregado da cadeia lateral com grupo dietilamino. Neste estudo, os autores assumiram que apenas o nitrogênio da cadeia lateral foi protonado e, então propuseram o modelo mostrado na **figura 20** para o farmacóforo. O receptor foi proposto baseado na estrutura de ferriprotoporfirina IX [Fe(III)PPIX] (**figura 20**), consistindo de região planar de 30 a 40 Å, a qual pode acomodar o anel quinolinico. Um átomo central de ferro aceptor de elétrons pode se ligar ao nitrogênio do anel quinolinico e dois grupos carboxilatos aniônicos que podem interagir com nitrogênio carregado positivamente da cadeia lateral dos derivados aminoquinolínicos. Além, propuseram que os sítios aceptores potenciais no receptor, como átomo de ferro III e oxigênios dos grupos carboxilatos, apresentaram distâncias interatômicas similares entre os átomos doadores do fármaco. A distância entre átomo central de ferro e oxigênios de grupos carboxilatos é em torno de 8,20 Å, medida através de cristalografia em raios X (O'Neill *et al.*, 1997).

Fármacos 8-aminoquinolínicos

Os primeiros achados em relação ao planejamento e preparação de fármacos antimaláricos sintéticos foram suportados pela observação de que o composto azul de metileno exercia alguma atividade antimalárica (Foley, Tilley, 1998). Análogos do azul de metileno foram preparados pela substituição de grupo metil por cadeia lateral básica, a qual conferiu melhora na atividade. Isto conduziu à crença de que a cadeia básica era importante para atividade antimalárica e impulsionou a síntese do primeiro antimalárico, pamaquina, (**figura 21, estrutura 8**) em meados de 1920.

FIGURA 21- Estrutura química de pamaquina (8) e primaquina (9). Os substituintes que diferem as estruturas estão destacados em azul (Fonte: Foley, Tilley, 1998).

Pamaquina foi capaz de promover cura radical, porém mais tarde, mostrou ser altamente tóxica, dando lugar para primaquina (**figura 21, estrutura 9**), seu primeiro análogo sintético menos tóxico.

- **Primaquina**

Primaquina é administrada por via oral, sendo bem absorvida. Seu metabolismo é rápido e apenas quantidade muito pequena do fármaco encontra-se presente no organismo após 10 a 12 horas. O tempo de meia-vida é entre 3 e 6 horas (Rang *et al.*, 2001).

Primaquina exerce ação antimalárica contra os hipnozoítas hepáticos, sendo único fármaco capaz de efetuar cura radical das formas de malária nas quais os parasitos *P. vivax* e *P. ovale* possuem estado latente no fígado. Não afeta os esporozoítas e exerce pouca ação contra o estágio eritrocítico do parasito, podendo ser resultado de mecanismo de colapso oxidativo dos metabólitos hidroxilados da primaquina (Vasquez-Vivar, Augusto, 1992; Vennerstron *et al.*, 1999). Entretanto, possui ação gametocítica, constituindo o agente antimalárico mais eficaz na prevenção da transmissão da doença por todas as quatro espécies de *Plasmodium* (Brueckner *et al.*, 1998; Vennerstrom *et al.*, 1999; Rang *et al.*, 2001).

Poucos efeitos indesejáveis são relatados para primaquina na maioria dos pacientes, quando utilizada em doses terapêuticas usuais, podendo ocorrer sintomas gastrintestinais relacionados à dose (Rang *et al.*, 2001).

No entanto, uso de doses elevadas tem sido relacionado com efeitos adversos ocasionados, possivelmente, pelo mecanismo pró-oxidante dos metabólitos hidroxilados da primaquina (**figura 22**).

FIGURA 22- Metabolismo oxidativo de primaquina para derivados tóxicos quinona imina (Fonte: O'Neill *et al.*, 1995).

Primaquina é metabolizada pelo citocromo P450, originando metabólitos que agem nos eritrócitos, causando aumento da produção de metemoglobina, diminuição dos níveis de glutathione e podendo ocasionar hemólise em indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. Quando esta deficiência ocorre, os eritrócitos são incapazes de regenerar NADPH, cuja concentração é reduzida pelos derivados metabólicos oxidantes da primaquina. Como consequência, as funções metabólicas gerais dos eritrócitos encontram-se comprometidas, ocorrendo a hemólise. Os metabólitos da primaquina exibem maior atividade hemolítica do que o fármaco. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase deve ser avaliada antes da administração de primaquina. A deficiência é observada em até 15% dos indivíduos negros do sexo masculino e em outros grupos étnicos. (Rang *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação dos fármacos 8-aminoquinolínicos parece ser bastante distinto dos 4-aminoquinolínicos (Meshnick, Marr, 1992; Collins, Jeffery, 1996), podendo levar à cura radical de infecções ocasionadas por *P. vivax*. Estudos têm verificado que primaquina é convertida a metabólitos quinona no fígado (O'Neill *et al.*, 1998). O tratamento causa inchaço da mitocôndria dos parasitos no estágio tecidual, sugerindo que o fármaco exerce sua atividade por interferência com função mitocondrial (Boulard *et al.*,

1983). O mecanismo de ação pode estar relacionado com o do fármaco atovaquona, o qual parece promover inibição do complexo citocromo bc1 da cadeia respiratória mitocondrial, causando colapso do potencial de membrana mitocondrial (Srivastava *et al.*, 1997).

Fármacos quinolinometanóis

Os quinolinometanóis, quinina e cinchonina e seus respectivos estereoisômeros, quinidina e cinchonidina, são alcalóides isolados da casca da árvore *Cinchona sp* e possuem propriedades antimaláricas. Quinina e quinidina permanecem na terapêutica antimalárica, sendo administrados isolados ou em combinação com antibióticos antimaláricos. Quinidina é mais potente que quinina, porém apresenta alta cardiotoxicidade (Casteel, 1996).

Em 1963, o Instituto de Pesquisas Walter Reed iniciou avaliações em larga escala de compostos antimaláricos potenciais devido ao problema de resistência à cloroquina, detectada durante a Guerra do Vietnã. Em 1986, cerca de 300.000 compostos haviam sido ensaiados. Poucos compostos emergiram destes ensaios e os 4-quinolinometanóis, análogos da quinina, foram os mais promissores. Tais compostos provaram ser ativos contra ambos *P. falciparum* e *P. vivax*, porém, os primeiros compostos exibiram ação fotossensibilizante (Foley, Tiley, 1998). Posteriormente, mefloquina foi sintetizada e não apresentou tal ação (Sweeney, 1984). Este fármaco foi introduzido no mercado em 1985 pela F. Hoffmann-La Roche denominado Lariam[®], tendo sido utilizado na quimioterapia antimalárica por mais de 20 anos contra cepas resistentes à cloroquina. (Palmer *et al.*, 1993). No entanto, seu uso tem se limitado devido ao surgimento de resistência e problemas de toxicidade (Foley, Tilley, 1998).

- **Mefloquina**

Mefloquina (**figura 23**) foi originalmente sintetizado por Ohnmacht e colaboradores (1971). O fármaco é esquizotícidico sangüíneo, apresenta atividade contra *P. falciparum* e *P. vivax*, porém não exerce efeito sobre as formas hepáticas dos parasitos, razão pela qual o tratamento das infecções por *P. vivax* deve ser acompanhado de administração de primaquina, a fim de erradicar hipnozoítas (Nguyen-Cong, Rode, 1996; Rang *et al.*, 2001).

FIGURA 23- Estrutura química da mefloquina. A estrutura da quinolina é mostrada em azul (Fonte: Casteel, D.A. In: WOLFF, M.E., 1996).

Mefloquina é administrada por via oral e rapidamente absorvida, atingindo concentrações máximas entre 8 e 24 horas. O fármaco é distribuído em vários órgãos e tecidos, concentrando-se nos eritrócitos. A ligação a proteínas plasmáticas é em torno de 98% e a biodisponibilidade é maior que 85%. A meia-vida plasmática é muito longa (até 30 dias), podendo contribuir para o surgimento de resistência do *Plasmodium sp* ao fármaco (Casteel, 1996; Foley, Tilley, 1998; Rang *et al.*, 2001). Apresenta metabolização parcial *in vivo* para derivado carboximefloquina, inativa contra *Plasmodium falciparum* (Bangchang *et al.*, 1992).

O uso de mefloquina tem sido associado com efeitos adversos neuropsiquiátricos como ansiedade, depressão, alucinações e psicose aguda (Schlagenhauf *et al.*, 1996; Foley, Tilley, 1998). Administração de mefloquina para tratamento de ataque agudo pode provocar distúrbios gastrintestinais. Possível explicação para os efeitos adversos neurotóxicos é habilidade da mefloquina interagir com glicoproteína P e modular sua função (Riffkin *et al.*, 1996). Acredita-se que a glicoproteína P seja importante no processo de destoxificação do parasito, em especial, na barreira hematoencefálica (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Efeito inibitório do fármaco na glicoproteína humana poderia permitir que ele atravessasse a barreira hematoencefálica e exercesse a neurotoxicidade ou exacerbasse a toxicidade de outros compostos encontrados simultaneamente (Foley, Tilley, 1998). Mefloquina é contra-indicada para gestantes e mulheres propensas a engravidar até 3 meses após interrupção do fármaco devido à meia-vida prolongada e à incerteza quanto à possibilidade de teratogenicidade (Rang *et al.*, 2001).

Quando mefloquina é utilizada para quimioprofilaxia, as ações indesejáveis costumam ser mais discretas, porém o fármaco não deve ser usado desta maneira, a não ser que haja risco elevado de adquirir resistência à cloroquina (Rang *et al.*, 2001).

Estudos ultra-estruturais indicam que mefloquina causa mudanças morfológicas no vacúolo digestivo do *P. falciparum*. Tais mudanças são semelhantes às alterações observadas após tratamento com cloroquina, exceto que mefloquina parece provocar desgranulação de hemozoína (Olliaro *et al.*, 1989). Alguns pesquisadores têm sugerido que o mecanismo de ação dos quinolinometanóis pode ser similar ao da cloroquina (Slater, 1993). Entretanto, não está claro que heme é o único, ou mesmo, o principal alvo para ação antimalárica dos quinolinometanóis. Mefloquina apresenta interação relativamente fraca com heme livre e tem mostrado inibir polimerização de heme *in vitro* com eficiência igual (Slater, 1993) ou mais baixa que cloroquina (Raynes *et al.*, 1996). Devido à menor basicidade da mefloquina, parece que a concentração intravacuolar requerida para inibir polimerização de heme é improvável. Ainda, enquanto tratamento com cloroquina de ratos infectados com *P. berghei* causou produção diminuída de hemozoína, mefloquina e quinina não apresentaram este efeito (Chou, Fitch, 1993).

Dados disponíveis de estudos apontam que mefloquina interfere no processo digestivo em estágios diferentes da cloroquina (Geary *et al.*, 1986). As evidências de envolvimento de uma glicoproteína P, denominada homóloga 1 da glicoproteína P (Pgh-1), na resistência do *Plasmodium sp* têm aumentado. Acredita-se que tal glicoproteína seja responsável por conferir multi-resistência do *Plasmodium sp* aos fármacos devido à sua ação como proteína de efluxo de fármacos dependente de ATP. Além, estudos têm mostrado que mefloquina é inibidor potente desta glicoproteína (Riffkin *et al.*, 1996). Como consequência, a possibilidade de Pgh-1 ser alvo de ação da mefloquina tem sido considerada (Foley, Tilley, 1998).

Estudos destacam alguns aspectos da relação entre estrutura química e atividade antimalárica da mefloquina (Karle, Karle, 1991; Sweeney, 1981).

A substituição de grupo 2-piperidínico saturado por grupo 2-piridínico não-saturado resultou em perda de atividade antimalárica (Sweeney, 1981). Os grupos hidroxila e amina são requeridos para atividade, pois modificações moleculares nestes grupos causaram anulação da atividade farmacológica. Autores sugeriram que estes grupos deveriam ter localização específica e precisariam estar livres para poderem formar ligações de hidrogênio com constituintes celulares, possivelmente, com o sítio receptor (Chien, Cheng, 1973; Chien, Cheng, 1976; Karle, Karle, 1991). Estudos sugeriram, ainda, que mefloquina, além de possuir grupos livres para ligações de hidrogênio, precisaria ter geometria específica para que ocorresse interação com componentes celulares (Karle, Karle, 1991). Desta forma, os anéis quinolínico e piperidínico deveriam estar colocados, um em relação ao outro, em ângulo de 68 a 77°. O anel quinolínico deveria ser *equatorial* ao anel piperidínico. O átomo de nitrogênio em grupo alifático deveria ser *gauche* em relação ao grupo hidroxila, posicionado mais próximo possível do anel quinolínico. A distância do nitrogênio alifático ao oxigênio do grupo hidroxila deveria ser de 2,73 a 2,85 Å (Karle, Karle, 1991).

O grupo trifluorometila na posição 2 do anel quinolínico confere atividade antimalárica elevada, sem fototoxicidade (Casteel, 1996). Foi comprovado que este grupo confere estabilidade à molécula, consituindo alvo do metabolismo do fármaco. Substituição do grupo trifluorometil por grupo arila na posição 2 do anel quinolínico mostrou atividade antimalárica aumentada, porém apresentou níveis de fototoxicidade elevados (Casteel, 1996).

O anel quinolínico é importante para atividade antimalárica, porém pode ser substituído por grupos isósteros, sem perda de atividade (Dias *et al.*, 2000).

2.1.7.2- Derivados Quinolínicos Potencialmente Antimaláricos

Número acentuado de trabalhos tem sido desenvolvido com intuito de obtenção de compostos quinolínicos mais ativos que os fármacos disponíveis (Sánchez-Delgado *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 1996; Obaldia *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 1997; De *et al.*, 1998;

Raynes *et al.*, 1999; Egan *et al.*, 2000; Shanks *et al.*, 2001a; Delaure *et al.*, 2001; Ayad *et al.*, 2001; Stocks *et al.*, 2002; Puri, Dutta, 2003; Hale *et al.*, 2003), menos tóxicos (Sánchez-Delgado *et al.*, 1996; Brueckner *et al.*, 1998; Shanks *et al.*, 2001b; Delaure *et al.*, 2001) e, ainda, compostos desprovidos de problemas metabólicos (O'Neill *et al.*, 1994; O'Neill *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1997).

Muitos estudos têm direcionado seus interesses para entendimento do mecanismo de acúmulo dos fármacos quinolínicos e seus derivados no vacúolo digestivo do parasito, avaliando para tal, fatores estruturais dos compostos que podem conferir esta propriedade (Hawley *et al.*, 1996b; Hawley *et al.*, 1996c). Outros estudos estão sendo realizados para compreensão de hipóteses de mecanismo de ação que envolva interações de compostos quinolínicos com hematina e atividade inibitória de hemozoína (Raynes *et al.*, 1996; Vippagunta *et al.*, 1999; Egan *et al.*, 2000; Ayad *et al.*, 2001; Buller *et al.*, 2002).

Compostos derivados de cloroquina

Mais de 130 análogos da cloroquina, com cadeias laterais mais curtas, foram preparados e testados contra parasitos *P. falciparum* *in vitro* e contra parasitos *P. berghei* em camundongos em estudo realizado por Ridley e colaboradores (1996). Devido à atividade relevante contra pequeno número de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e boa atividade oral contra *P. berghei*, quatro compostos foram selecionados para avaliação mais detalhada sobre farmacocinética e toxicidade. Todos os quatro compostos mostraram resultados semelhantes quando testados contra cepa sensível à cloroquina (NF54) e cepa K1 resistente à cloroquina. O valor estimado para concentração inibitória de 50% de crescimento do parasito (IC₅₀) de *P. falciparum* contra K1 foi menor (49 a 61nM) do que o valor para cloroquina (315 nM). IC₅₀ contra cepa sensível à cloroquina foi maior para os compostos (18 a 25 nM) do que para cloroquina (16nM).

A **tabela IV** apresenta dois dos compostos ensaiados, com os melhores valores para atividade antimalárica frente às cepas de *P. falciparum* diferentes. O composto Ro 47-0543 mostrou melhor atividade contra cepas sensíveis à cloroquina, enquanto o composto Ro 41-3118, contra cepas resistentes à cloroquina.

TABELA IV- Inibição de crescimento do parasito *in vitro* por 4-aminoquinolínicos selecionados.

Composto	Estrutura	Atividade <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> (48h) [IC ₅₀ (nM)]	
		NF54	K1
Ro 47-0543		18 (±5)	59 (±15)
Ro 41-3118		24 (±6)	49 (±14)

O modelo animal, representado por camundongos apresentou perfil curioso, pois o composto Ro 41-3118 foi menos ativo que os outros três compostos e que a cloroquina, com valor de dose eficaz para matar 90% dos parasitos (ED₉₀) de 6,0 mg/Kg. O valor de ED₉₀ para a cloroquina foi comparado aos dos outros compostos e conduziu à conclusão que eles têm atividades similares contra *P. berghei* sensível à cloroquina (tabela V).

Como conclusão, os autores ressaltaram que todos os quatro compostos foram menos efetivos contra cepa K1 do que contra cepas sensíveis NF54. Eles sofreram desalquilação *in vivo*, originando metabólitos que conferiram fator de resistência cruzada *in vitro* e, além disso, apresentaram grau de toxicidade baixo, equivalente à cloroquina. Deveras, tais compostos não foram considerados promissores para avaliações mais avançadas, porém os autores reforçaram que mudanças mínimas na cadeia lateral da cloroquina poderiam ser essenciais para resultarem no surgimento de resistência (Ridley *et al.*, 1996; Foley, Tilley, 1998).

TABELA V- Resposta do parasito *P. berghei* aos 4-aminoquinolínicos selecionados em comparação com cloroquina.

Composto	Estrutura	Dose oral única (mg/Kg)	
		ED ₅₀	ED ₉₀
cloroquina		2,0	4,5
Ro 47-0543		2,0	3,7
Ro 47-9396		2,3	3,5
Ro 48-0346		3,2	4,2

Sánchez-Delgado e colaboradores (1996) sintetizaram dois compostos resultantes de modificação da cloroquina pela coordenação a centros metálicos como rutênio (*Ru*) e ródio (*Rh*). Os complexos foram altamente ativos contra cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina *in vitro*, contra *P. berghei in vitro* e *in vivo*. Ainda, os complexos não se mostraram tóxicos (Sánchez-Delgado *et al.*, 1996). Os autores sugeriram que compostos formados por complexos metálicos poderiam ser alternativa para desenvolvimento de agentes quinolínicos potenciais antimaláricos.

Nesta mesma linha de pesquisa, Navarro e colaboradores (1997) sintetizaram composto, cuja estrutura foi resultante da complexação de cloroquina e ouro (*Au*). Este complexo apresentou atividade *in vitro* elevada contra duas cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina consideravelmente superior à atividade dos complexos com *Ru* e *Rh*, relatadas em estudo anterior (Sánchez-Delgado *et al.*, 1996). O complexo *Au*-cloroquina foi ativo *in vitro* e *in vivo* contra *P. berghei* (Navarro *et al.*, 1997).

Muitos análogos da cloroquina com cadeia amínica na posição 4 do anel quinolínico têm sido relatados, apresentando variação do número de átomos de carbono da cadeia amínica. Compostos com 2 a 3 átomos de carbono ou 10 a 12 átomos de carbono foram ativos (**tabela VI**) contra isolados sensíveis e resistentes à cloroquina e contra *P. falciparum* multi-resistente *in vitro* (De *et al.*, 1996). Entretanto, compostos com cadeias laterais diaminoalquílicas com número de carbonos intermediários (tetra-, penta-, hexa- e octametileno) foram ativos contra isolados de *P. falciparum* sensíveis (IC₅₀ de 4 a 7 nM), porém não, contra isolados de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (IC₅₀ de 41 a 90 nM) (De *et al.*, 1996).

TABELA VI- Atividade antiplasmodial (IC₅₀) dos análogos da cloroquina contra *P. falciparum* *in vitro*.

Composto	R	IC ₅₀ (nM)	
		Haiti 135 ^a	Indochina I ^b
cloroquina	CHMe(CH ₂) ₃	7	95
14	(CH ₂) ₂	7	5
15	(CH ₂) ₃	5	6
16	(CH ₂) ₁₀	6	13
17	(CH ₂) ₁₂	13	11

^aHaiti 135: *P. falciparum* sensível à cloroquina;

^bIndochina: *P. falciparum* resistente à cloroquina.

Após demonstrarem que variedade de compostos com cadeias laterais diaminoalquílicas mostraram atividade, De e colaboradores (1998) se preocuparam em estudar a importância da posição 7, pois os compostos avaliados anteriormente (De *et al.*, 1996) possuíam grupo cloro nesta posição do anel quinolínico. Eles sintetizaram série de aminoquinolinas com substituintes diferentes na posição 7 e testaram a atividade contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina. Alguns dos compostos sintetizados e avaliados quanto à atividade antimalárica, encontram-se na **tabela VII**, apresentando os valores de IC₅₀ frente isolados sensíveis (Haiti 135) e resistentes

(Indochina I) à cloroquina. O valor de IC_{50} apresentou desvio padrão aproximado de $\pm 10\%$ para cada composto testado em triplicata.

Aminoquinolinas substituídas com iodo na posição 7 (**X**) do anel quinolínico tiveram atividade antiplasmodíca excelente contra isolados sensíveis e resistentes à cloroquina, fossem compostos de cadeias curtas ou longas, como demonstrado na **tabela VII**. Os compostos substituídos com bromo na posição 7, com cadeias curtas e longas, também foram ativos contra ambos isolados. Porém, derivados quinolínicos substituídos na posição 7 por grupo flúor apresentaram atividade reduzida em relação aos compostos 7-cloro (**tabela VI**), 7-iodo ou 7-bromo (**tabela VII**).

TABELA VII- Atividade antiplasmodial (IC_{50}) alguns dos análogos da cloroquina mais ativos contra *P. falciparum* in vitro.

Composto	X	R	IC_{50} (nM)	
			Haiti 135	Indochina I
cloroquina	Cl	CHMe(CH ₂) ₃	8	95
18	I	(CH ₂) ₂ CH ₃	3	4
19	I	CHMeCH ₂	7	7
20	I	(CH ₂) ₁₀	6	16
21	Br	(CH ₂) ₂	7	7
22	Br	(CH ₂) ₂ CH ₃	4	6
23	Br	(CH ₂) ₁₀	6	17
24	F	(CH ₂) ₁₀	7	40
25	F	(CH ₂) ₁₂	8	25
26	CF ₃	(CH ₂) ₁₂	5	25

Compostos 7-flúor com cadeias curtas foram menos ativos contra isolados sensíveis à cloroquina (IC_{50} de 23 a 35 nM), se comparados ao próprio fármaco (IC_{50} de 8 nM) e pouco ativos contra isolados resistentes (IC_{50} de 60 a 120 nM) (De *et al.*, 1998). Os compostos **24** e **25**, de cadeias longas, mostraram atividade moderada (IC_{50} de 7 a 8 nM) contra isolados sensíveis e foram menos ativos contra isolados resistentes (IC_{50} de 25 a 40 nM). Aminoquinolinas substituídas com grupo trifluorometil na posição 7 foram, em geral, menos ativas contra ambos isolados (De *et al.*, 1998). Composto **26** foi exceção, pois a

atividade contra isolado sensível mostrou ser satisfatória (IC_{50} de 5 nM), porém, atividade contra isolado resistente à cloroquina, demonstrou ser moderada (IC_{50} de 25 nM). Em contraste, a maioria dos derivados aminoquinolínicos substituídos na posição 7 por grupo metóxi foi inativa contra ambos isolados (IC_{50} de 90 a 3000 nM) (De *et al.*, 1998).

Através dos resultados obtidos, De e colaboradores (1998) sugeriram que o número de carbonos entre os 2 nitrogênios da cadeia lateral diaminoalquílica das aminoquinolinas substituídas por grupo 7-bromo e 7-iodo foi fator determinante da atividade contra isolados de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, como também o é para os compostos substituídos por grupo 7-cloro. Quanto aos grupos na posição 7 do anel quinolínico, nem a lipofilicidade ou a hidrofiliabilidade foram fatores significantes para atividade antimalárica. Isto foi observado através das aminoquinolinas substituídas em 7 com grupo iodo que foram muito mais ativas do que as substituídas com trifluorometil, embora ambos grupos apresentem lipofilicidade similar. Já as aminoquinolinas substituídas com grupo metóxi não foram ativas, mesmo o grupo metóxi apresentando caráter hidrofílico. Contrariando as expectativas dos autores (De *et al.*, 1998), a eletronegatividade na posição 7 do anel não correlacionou com a atividade antimalárica, justificando o fato de os compostos substituídos com grupo iodo, bromo ou cloro terem sido mais ativos que os substituídos com grupo flúor ou trifluorometil.

Vippagunta e colaboradores (1999) prepararam treze compostos no sentido de entenderem a especificidade estrutural entre derivados da cloroquina pela hematina, testando a hipótese da hematina ser o alvo potencial de atividade dos antimaláricos quinolínicos. O estudo avaliou a afinidade de ligação dos compostos à hematina, inibição de crescimento do parasito *P. falciparum* em cepas sensíveis e resistentes à cloroquina e, por fim, a capacidade dos compostos inibirem a polimerização da hematina. Os compostos avaliados encontram-se indicados na **figura 24 e tabela VIII**.

FIGURA 24- Estruturas químicas de análogos da cloroquina modificados na cadeia lateral (Fonte: Vippagunta *et al.*, 1999).

TABELA VIII- Estruturas químicas de análogos da cloroquina modificados no anel quinolínico.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
33	H	H	H	H
34	Br	H	H	H
35	O ₂ N	H	H	H
36	H ₂ N	H	H	H
37	H	Cl	H	H
38	Cl	H	H	CH ₃
39	Cl	H	CH ₃	H

Os resultados obtidos através das avaliações realizadas neste estudo confirmaram a importância da cadeia lateral como determinante para obtenção de compostos eficientes. O análogo **30** apresentou pouca atividade contra cepa resistente (K1) à cloroquina, confirmando observações prévias (Aderounmu, 1984; Geary *et al.*, 1987). Análogo **31**, cuja cadeia alquílica lateral foi estendida por um carbono, mostrou-se menos potente do que cloroquina contra dois clones de *P. falciparum*. Já o composto **32**, com carbono metínico ao

invés do nitrogênio terciário da cloroquina, teve potência diminuída contra cepas sensíveis (NF54) à cloroquina, porém a potência aumentou contra cepa K1, implicando que átomo de nitrogênio terciário alifático da cloroquina poderia ser fator estrutural associado à resistência (Vippagunta *et al.*, 1999). Com exceção dos compostos **35** e **39**, todos os outros análogos da cloroquina, os quais foram substituídos com grupos diferentes no anel quinolínico, mostraram potência muito menor que cloroquina contra cepa NF54. Os compostos **35** e **39** foram mais potentes que cloroquina contra cepa K1 e ambos apresentaram índice de resistência muito mais baixo que a cloroquina. Substituição do átomo de cloro por hidrogênio **33** ou cloro na posição 6 do anel **37** promoveu diminuição da atividade antimalárica, quando comparada a do fármaco em questão, embora o índice de resistência tenha permanecido inalterado, como relatado por De e colaboradores (1996).

A **tabela IX** ilustra os valores de inibição de crescimento de *P. falciparum* *in vitro* para os compostos **35** e **39**.

TABELA IX- Valor de IC₅₀ para inibição do crescimento do parasito em cepas sensíveis (NF54) e resistentes (K1) à cloroquina dos análogos **35** e **39**.

Composto	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (nM)	
	NF54	K1
cloroquina	13	350
35	15	68
39	20	59

A atividade inibitória dos compostos em relação à polimerização de hematina também foi investigada (Vippagunta *et al.*, 1999). Os compostos **27**, **30**, **34**, **38** e **39** foram inibidores de polimerização *in vitro* da hematina, tão efetivos quanto cloroquina. Os compostos **28**, **29**, **31** e **32**, com cadeia lateral modificada, apresentaram menor potência. Por fim, substituição do cloro na posição 7 do anel quinolínico por qualquer grupo aboliu atividade inibitória de polimerização da hematina, como pode ser visto nas estruturas **33**, **36** e **37**. Na tabela abaixo (**tabela X**), encontram-se valores de IC₅₀ para atividade inibitória da polimerização de hematina efetuada por alguns análogos da cloroquina.

TABELA X- Valor de IC₅₀ para atividade inibitória da polimerização de hematina promovida pelos análogos 27, 28, 30, 33, 34, 38, 39 e cloroquina.

Composto	Polimerização hematina IC ₅₀ (μM)
cloroquina	15 ±5
27	16 ±2
28	70 ±1
30	15 ±1
33	>2500
34	18 ±2
38	17 ±1
39	15 ±1

Os dados obtidos permitem afirmar que o anel quinolínico exerce influência predominante na atividade inibitória da polimerização de hematina. Isto foi reforçado pelas observações dos potenciais eletrostáticos de contornos moleculares. Alguns dos análogos ensaiados apresentaram superfícies eletrostáticas isopotenciais idênticas, como ilustrado na **figura 25**.

Compostos **27** e **32** foram considerados inibidores potentes da polimerização de hematina, enquanto compostos desprovidos de grupo aceptor de elétrons na posição 7 do anel quinolínico, como compostos **33** e **37** foram inativos. Portanto, tais substituintes foram requeridos para atividade contra polimerização de hematina e, especificamente, grupo cloro na posição 7, foi ótimo para atividade.

FIGURA 25- Potenciais eletrostáticos de contornos moleculares tridimensionais em –5 Kcal/mol para compostos (27), (32) e cloroquina (Fonte: Vipagunta *et al.*, 1999).

Os autores (Vippagunta *et al.*, 1999) chegaram à conclusão de que o composto contendo cadeia alquílica lateral na posição 4 da cloroquina e presença de átomo de nitrogênio terciário, exerceu importância estrutural quanto à resistência. Grupo cloro na posição 7 do anel quinolínico de cloroquina determinou especificidade estrutural em relação à afinidade com hematina. Ainda, dados obtidos sugerem que grupos aceptores de elétrons na posição 7 do anel quinolínico foram necessários para atividade contra crescimento do parasito e polimerização de hematina.

Egan e colaboradores (2000) avaliaram atividade, de forma detalhada, de vários quinolínicos quanto à habilidade de complexação com Fe(III)PPIX, de inibir formação de β -hematina e a atividade antiplasmodica *in vitro* frente cepas de *P. falciparum* sensíveis (D10) à cloroquina. Compostos **40**, **41** e **42** (tabela XI) foram promissores, apresentando atividade antiplasmodica elevada, formaram complexos com Fe(III)PPIX, inibiram formação de β -hematina e todos possuíam cadeia lateral amínica.

Compostos que não apresentavam cadeia lateral amínica conseguiram formar complexos forte com Fe(III)PPIX e inibir formação de β -hematina, porém a atividade antiplasmodial ficou comprometida (3,8 a 5 μ M). Tais diferenças na atividade antiplasmodial suportaram a hipótese de necessidade de acúmulo do composto no vacúolo digestivo do parasito, mediante mecanismo influenciado pelo pH. Além disso, confirmaram dados obtidos em estudos prévios (Vippagunta *et al.*, 1999) de que compostos sem grupo cloro na posição 7 do anel quinolínico não eram capazes de inibir formação de β -hematina e propuseram modelo de relação entre estrutura química e atividade antiplasmodial para cloroquina (figura 17).

TABELA XI- Proporção do complexo formado entre quinolina e Fe(III)PPIX e atividade antiplasmodial *in vitro* contra cepa D10 de *P. falciparum* de alguns compostos quinolínicos relatados no estudo de Egan e colaboradores, 2000.

Composto	R	Estequiometria ^a	IC ₅₀ (nM) ^b ±EPM (n=3) ^c
cloroquina		1:1	38 ±14
40	(CH ₂) ₂ NH ₂	1:1	92 ±12
41	(CH ₂) ₂ NEt ₂	2:1	49 ±14
42	(CH ₂) ₂ NMe ₂	1:1	80,9 ±6,2

^a Quinolina : Fe(III)PPIX:

^b valor de IC₅₀ para atividade antiplasmodial dos quinolínicos;

^c erro padrão da média de 3 determinações.

Kaschula e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos promovidos pela substituição de vários grupos na posição 7 do anel quinolínicos, bem como tentaram esclarecer a necessidade do grupo cloro nesta mesma posição para inibir a formação de β-hematina. Neste sentido, verificaram se haveria relação quantitativa entre a força de inibição de β-hematina e atividade antimalárica. Para tal, sintetizaram 11 compostos com substituintes diferentes na posição 7, como mostrado na **tabela XII**.

A atividade antimalárica para todos os compostos **43** a **53** foi testada *in vitro* contra cepa (D10) de *P. falciparum* sensível à cloroquina. Os valores de IC₅₀ para os compostos **45**, **48** a **52** estavam de acordo com valores da literatura (De *et al.*, 1998). As diferenças foram constatadas devido às condições experimentais diferenciadas.

O estudo confirmou a dependência linear dos valores de IC₅₀, em relação à atividade inibitória de formação de β-hematina fortalecendo a idéia de que a atividade dos compostos resultou da inibição de formação de hemozoína. Avaliou o pH do meio, necessário para entrada dos compostos no vacúolo digestivo do parasito, suportando a hipótese de que a atividade dos compostos foi exercida, adicionalmente, devido à influência do pH do meio.

TABELA XII- Estruturas químicas das quinolinas utilizadas no estudo.

Composto	X
43	NH ₂
44	OH
45	OCH ₃
46	H
47	CH ₃
48	F
49	I
50	Br
51	Cl
52	CF ₃
53	NO ₂

Os resultados mostraram ser verdadeira a hipótese de que aminoquinolínicos antimaláricos devem acumular-se no sítio de ação através de influência do pH do meio e pK_a do composto devido à característica básica da quinolina e átomos de nitrogênio da cadeia lateral. O íon aminoquinolínio livre, então pareceu associar-se com hematina no vacúolo, como resultado de propriedades fortes de interação inerentes ao núcleo quinolínico (Egan *et al.*, 2000). O grupo da posição 7 do anel quinolínico determinou a habilidade do complexo composto-hematina resistir à incorporação da molécula de hematina em hemozoína (Kaschula *et al.*, 2002).

Stocks e colaboradores (2002) efetuaram estudos de compostos relacionados à cloroquina, porém com cadeias laterais substituídas com grupos diferentes. Tais grupos foram escolhidos com base em relatos prévios (De *et al.*, 1998) de substituintes que sofreram desalquilação *in vivo*, provocando redução de caráter lipofílico dos compostos, aumentando resistência cruzada destes frente a cloroquina (Bray *et al.*, 1996). Contrariamente, estudos têm relatado compostos que não sofreram metabolização para derivados desalquilados (O'Neill *et al.*, 1997; Raynes *et al.*, 1999). Compostos preparados (**figura 26**) por Stocks e colaboradores (2002) apresentaram cadeia lateral substituída com

grupos inertes, tais como *t*-butil, piperidil e pirrolidino, ao invés da cadeia lateral com grupo dietilamino da cloroquina.

Como resultado, obtiveram compostos muito mais ativos contra cepas resistentes à cloroquina que o próprio fármaco. Derivados que continham grupo terminal *t*-butil na porção amínica na cadeia lateral foram os mais ativos. O composto **54** apresentou atividade (4,3 nM) contra cepa sensível quatro vezes maior que o fármaco (19 nM) (**tabela XIII**).

FIGURA 26- Estruturas químicas de derivados quinolínicos de cadeia curta (Stocks *et al.*, 2002).

Todos os derivados mostraram resistência cruzada reduzida à cloroquina. O composto **59** exibiu atividade aumentada em quase 20 vezes, contra cepa resistente à cloroquina. Outros compostos substituídos na posição 7 do anel quinolínico por grupo trifluorometil não apresentaram atividade muito alterada, contra ambas cepas. Porém, substituição do grupo *t*-butil por grupo morfolino **57** provocou redução substancial da atividade.

TABELA XIII- Atividade antimalárica dos derivados quinolínicos frente a cepas sensível (HB3) e resistente (K1) à cloroquina.

Composto	Atividade antimalárica	
	HB3 (nM)	K1 (nM)
cloroquina	19,0 ±2,1	190 ±15
54	4,3 ±1,3	15,3 ±2,9
55	6,8 ±0,8	13,0 ±2,3
56	6,8 ±1,2	13,2 ±1,1
57	150 ±41	240 ±29
58	10,6 ±0,5	22,2 ±35
59	5,5 ±0,7	9,8 ±0,6

Os autores afirmaram que os compostos de cadeia curta atuam com o mesmo mecanismo de ação da cloroquina, pois todos inibiram a entrada do fármaco em eritrócitos parasitados intactos, de forma dependente da dose. Não foi possível determinação de IC₅₀ para composto **57**, justificando a ausência de valor (N/A) na **tabela XIV**. Todos os compostos **54** a **59** inibiram formação de β -hematina, de maneira dependente da concentração. Porém, nenhum dos compostos foi mais potente que cloroquina. Com exceção de (**57**), todos os compostos possuíram habilidade similar de inibir cristalização de Fe(III)PPIX, apresentando valores para IC₅₀ entre 65 e 86 mM, como arrolado na **tabela XIV**. O inibidor menos potente foi composto o **57**, mostrando concentração inibitória de 102 nM.

Estudos de modelagem molecular, em condições especificadas pelos autores (Stocks *et al.*, 2002), avaliaram a habilidade destes derivados da cloroquina **54** a **59** formarem complexo com Fe(III)PPIX. Eles verificaram que não houve correlação entre atividade antimalárica e energia de ligação a Fe(III)PPIX ou distâncias intermoleculares dos derivados de cadeia curta, nas condições atribuídas. No modelo solvatado por água, todos os derivados exibiram tamanhos de ligação menores entre nitrogênio intermolecular da cadeia lateral e oxigênio carbonílico de Fe(III)PPIX, quando comparado ao modelo no vácuo. Quando tais compostos foram comparados à cloroquina, apresentaram distância reduzida (< 2,8 Å) entre nitrogênio protonado da cadeia lateral e os carboxilatos na hematina.

TABELA XIV- Valores de IC₅₀ para inibição de entrada de cloroquina em eritrócitos parasitados intactos e atividade inibitória de formação de β-hematina pelos compostos (54 a 59) e cloroquina.

Composto	Inibição da entrada de cloroquina IC ₅₀ (mM)	Formação de β-hematina IC ₅₀ (mM)
cloroquina	0,95 ±0,02	38 ±5
54	0,71 ±0,01	70 ±12
55	0,91 ±0,21	86 ±6
56	1,62 ±0,05	78 ±4
57	N/A	102 ±10
58	2,03 ±0,46	65 ±2
59	2,09 ±0,25	71 ±8

A modelagem sugeriu que as principais interações para o composto **54** foram interações π - π do anel quinolínico com anel porfirina de hematina e interação adicional potencial entre nitrogênio protonado e carboxilatos de hematina (distância de *NH* do composto **54** a *O* da hematina igual a 2,6 Å). A **figura 27** ilustra interações entre o composto **59** e o receptor hipotético, em meio aquoso.

FIGURA 27- Complexo de mais baixa energia de Fe(III)PPIX com composto (59)
(Fonte: Stocks *et al.*, 2002).

Stocks e colaboradores concluíram que os derivados de cloroquina com cadeia lateral mais curta mostraram atividade antimalárica excelente contra isolados de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina. Potência *in vitro* melhorada destes

compostos não foi diretamente correlacionada à interação dos compostos a Fe(III)PPIX. Os autores sugeriram que a atividade elevada destas substâncias, quando comparada à cloroquina, poderia ser devido à capacidade delas se acumularem no vacúolo digestivo do parasito, em altas concentrações. Ainda, destacaram que tais derivados serão submetidos a outros ensaios para avaliação de atividade antimalárica e metabolismo.

Compostos derivados de amodiaquina

Muitos análogos da amodiaquina têm sido avaliados com intuito de obtenção de dados para entendimento da relação entre estrutura química e atividade antimalárica (Werbel *et al.*, 1986; Hawley *et al.*, 1996b). Outros têm sido sintetizados e avaliados para bloquear conversão metabólica da amodiaquina em derivados quinona imina (O'Neill *et al.*, 1994; O'Neill *et al.*, 1997; Delarue *et al.*, 2001), pois tais metabólicos estão sendo relacionados à toxicidade provocada pela amodiaquina.

Werbel e colaboradores (1986) sintetizaram série de compostos relacionados à amodiaquina, avaliaram atividade antimalárica da série contra ambas cepas sensíveis e resistentes e realizaram estudo quantitativo de relação entre estrutura química e atividade biológica. Deste estudo, surgiu tebuquina (**figura 28, estrutura 60**), o derivado promissor.

FIGURA 28- Estrutura química de tebuquina (Fonte: Werbel *et al.*, 1986).

Tebuquina apresentou atividade *in vivo* contra uma linha de cepa altamente resistente (RC) à cloroquina de *P. berghei* e atividade levemente reduzida contra cepa resistente à mefloquina. O composto foi ativo, tanto por via oral, quanto por via subcutânea. Testes realizados em macacos *Aotus* infectados com cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina mostraram que tebuquina foi curativa em doses de 1 ou 2 mg/Kg. Estudos de

farmacocinética do composto **60** em ratos confirmaram que tebuquina apresenta meia-vida biológica longa (Werbel *et al.*, 1986).

Os autores sugeriram ensaios toxicológicos como próxima etapa de estudos de tebuquina, já que consideraram este derivado de amodiaquina agente antimalárico promissor (Werbel *et al.*, 1986).

Tebuquina apresenta porção aminofenol, como amodiaquina, portanto seria esperado que fosse passível de oxidação mediada pelo citocromo P450, para formar derivado quinona imina, responsável pela toxicidade de amodiaquina. Neste sentido, O'Neill e colaboradores (1996) propuseram substituição isostérica da função hidroxila de tebuquina por grupo flúor, a fim de obterem derivado antimalárico potencial, desprovido dos efeitos tóxicos associados à amodiaquina. Tal proposta foi baseada em estudos prévios (O'Neill *et al.*, 1994) que mostraram a substituição da hidroxila de amodiaquina pelo grupo flúor promovendo um análogo (**figura 29, estrutura 61**) ativo contra cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina e que não foi susceptível à bioativação para derivado quinona imina.

FIGURA 29- Estrutura química de isótero de amodiaquina (Fonte: O'Neill, *et al.*, 1994).

O'Neill e colaboradores (1996) relataram a síntese e o efeito de substituição de hidroxila por flúor na atividade antimalárica *in vitro* para derivado de tebuquina (**figura 30, estrutura 62**).

FIGURA 30- Estruturas químicas de tebuquina (60) e fluorotebuquina (62) (Fonte: O'Neill, *et al.*, 1996).

Duas cepas foram utilizadas para avaliação antimalárica do composto **62**, cepa sensível à cloroquina (3D7) e cepa não clonada e resistente à cloroquina (K1). A **tabela XV** mostra que fluorotebuquina (**62**) foi mais potente que cloroquina contra ambas cepas de *P. falciparum*. Entretanto, fluorotebuquina foi menos potente que tebuquina (**60**) contra estas cepas (O'Neill *et al.*, 1996).

TABELA XV- Valores de IC₅₀ para compostos 60, 62 e cloroquina.

Composto	IC ₅₀ (nM)	
	3D7	K1
cloroquina	20	250
(60)	18	21
(62)	58	74

Foram propostos novos derivados de tebuquina (**60**) (O'Neill *et al.*, 1997) com o intuito de avaliar os efeitos na atividade antimalárica e na toxicidade. Os novos compostos tiveram o grupo hidroxila substituído por flúor e hidrogênio e o grupo *t*-butil do nitrogênio terciário foi substituído por dietilamino (**tabela XVI**). Os derivados **62** a **65** foram testados *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* sensíveis (HB3) e resistentes (K1) à cloroquina.

Estudos de modelagem molecular foram realizados com intuito de examinar os efeitos promovidos pelas substituições químicas, efetuadas nos compostos, com relação à interação com heme.

TABELA XVI- Estruturas químicas dos compostos avaliados por O'Neill e colaboradores (1997).

Composto	R	R1	R2
(62)	F	H	<i>t</i> -butil
(63)	F	Et	Et
(64)	OH	Et	Et
(65)	H	H	<i>t</i> -butil

A **tabela XVII** compara a atividade antimalárica dos derivados, mostrando que substituição da hidroxila de tebuquina por flúor no composto **62** causou perda de atividade antimalárica.

TABELA XVII- Valores de IC₅₀ para atividade antimalárica *in vitro* dos compostos **62** a **65**, comparados aos valores para cloroquina, amodiaquina e tebuquina.

Composto	IC ₅₀ (nM)			
	HB3	D.P.M. ^a ±	K1	E.P.M. ^b ±
cloroquina	9,75	2,7	250	7,1
amodiaquina	3,7	0,8	27,2	4,3
tebuquina	0,9	0,3	20,8	1,4
(62)	61,6	4,1	74,3	1,4
(63)	104,1	4,7	101,3	6,8
(64)	24,2	1,8	42,1	3,6
(65)	56,6	1,8	74,2	3,2

^adesvio padrão da média;

^berro padrão da média

Substituição de grupo *t*-butil do composto **62** por grupo dietilamino resultou em profunda redução da atividade antimalárica, visível no composto **63**. Considerando-se as perdas de atividade, ambas substâncias com grupo flúor (**62** e **63**) foram mais ativos que cloroquina, contra cepa resistente (K1) do parasito. Remoção do grupo hidroxila na

tebuquina para o composto **65**, também conduziu à redução significativa da atividade antimalárica. O composto **65** apresentou atividade similar ao composto **62** contra cepa resistente à cloroquina (**tabela XVII**).

Através dos estudos de modelagem, os autores propuseram modelo de interação entre amodiaquina e heme. Fatores pertinentes ao receptor proposto foram baseados em dados previamente obtidos por Koh e colaboradores (1994). Consideraram também que amodiaquina deveria assumir conformação bioativa para que houvesse interação com heme (Koh *et al.*, 1994), conforme pode ser visto na **figura 20**.

Os autores (O'Neill *et al.*, 1997) propuseram que diferenças observadas na atividade antimalárica dos derivados da tebuquina em cepas sensíveis à cloroquina poderiam ser devidas às modificações químicas que afetaram parâmetros físico-químicos e, estes por sua vez, foram relevantes para determinar acúmulo celular dos compostos no parasito. O composto **62** corroborou tais implicações, pois acumulou bem menos do que tebuquina no vacúolo digestivo. Todos os derivados foram capazes de ligar-se a heme, com energias favoráveis para interação, porém apresentaram capacidade de acúmulo e potência reduzidos.

Estudo em meio aquoso sobre a interação molecular de tebuquina com heme sugeriu que o grupo hidroxila permitiu orientação favorável do grupo alquilamino para os carboxilatos de heme, formando ligação de hidrogênio. O complexo também foi estabilizado por interações hidrofóbicas entre o anel quinolínico e o sistema anelar porfirínico. Deveras, os valores de energia dos complexos aminoquinolina-heme não apresentaram correlação direta com atividade antimalárica.

Muitos estudos têm sido realizados com compostos quinolínicos que contêm bases de Mannich em suas estruturas (Scott *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1988; Barlin *et al.*, 1992).

Scott e colaboradores (1987) relataram a atividade antimalárica *in vitro* de bases de Mannich quinolínicas derivadas de amodiaquina contra isolados de *P. falciparum* sensíveis

e resistentes à cloroquina e efetuaram estudos de toxicidade dos compostos mais ativos. Os compostos avaliados no estudo são apresentados na **tabela XVIII**.

Os resultados para os compostos **66** a **72** relatados na **tabela XIX** mostram que a atividade contra ambos isolados foi alta. O composto **72** foi 2 a 3 vezes mais ativo que os compostos **68**, **69** e **70**. Porém, o composto **66** foi o composto menos ativo. A **tabela XIX** revela que todos os compostos foram mais ativos que cloroquina contra isolados sensíveis (FCQ-27) e resistentes (K1) à cloroquina. Eles foram mais ativos que amodiaquina contra isolados resistentes e foram mais efetivos que a mefloquina contra isolado sensível.

TABELA XVIII- Bases de Mannich quinolínicas utilizadas em estudo efetuado por Scott e colaboradores (1987).

Composto	R1	R2
(66)	CH ₂ NEt ₂	H
(67)	CH ₂ NMe ₂	CH ₂ NMe ₂
(68)	CH ₂ NEt ₂	CH ₂ NEt ₂
(69)	CH ₂ N	CH ₂ N
(70)	CH ₂ NPr ₂	CH ₂ NPr ₂
(71)	CH ₂ N	CH ₂ N
(72)	CH ₂ N	CH ₂ N

TABELA XIX- Atividade antimalárica *in vitro* de série de bases de Mannich quinolínicas, cloroquina, amodiaquina e mefloquina contra isolados de *P. falciparum* (Scott *et al.*, 1987).

Composto	IC ₅₀ (nM)	
	FCQ-27	K1
cloroquina	13,0 ±6,4	325 ±199
amodiaquina	2,9 ±0,3	11,7 ±5,5
mefloquina	10,1 ±5,4	4,9 ±3,3
(66)	2,1 ±0,4	5,5 ±2,7
(67)	4,3 ±1,8	7,0 ±2,3
(68)	1,0 ±0,5	2,6 ±0,3
(69)	0,8 ±0,4	2,1 ±0,7
(70)	1,7 ±1,6	2,0 ±0,7
(71)	4,5 ±0,4	6,8 ±2,2
(72)	0,5 ±0,3	0,8 ±0,4

Os testes de toxicidade dos compostos **68** e **72** revelaram que eles foram menos tóxicos que amodiaquina (tabela XX).

TABELA XX- Avaliação de toxicidade dos compostos 68, 72, amodiaquina e cloroquina.

Composto	Dose	Nº de animais	Nº de animais em período de tempo após i.p. ^a	
			30 min.	7 dias
cloroquina ^b	100	2	0	0
amodiaquina ^c	200	6	1	1
	150	6	6	6
(68)	200	6	5	5
(72)	200	6	5	5
	150	6	6	6

^a i.p.: injeção intra-peritoneal em camundongos; ^bdifosfato; ^ccloridrato.

Os autores elegeram o composto **72** para avaliações futuras, pois apresentou atividade antimalárica elevada e toxicidade baixa (Scott *et al.*, 1987).

Em 1988, Scott e colaboradores sintetizaram mais três bases de Mannich quinolínicas e avaliaram a atividade *in vitro* contra *P. falciparum* e *in vivo* contra isolados de *P. berghei* sensíveis e resistentes à cloroquina.

Os compostos quinolínicos **73**, **74** e **75**, avaliados no estudo (Scott *et al.*, 1988), foram mais ativos que cloroquina contra ambos isolados (tabela XXI) de *P. falciparum*.

TABELA XXI- Atividade antimalárica dos compostos (73), (74), (75), amodiaquina e cloroquina contra isolados de *P. falciparum*. Os valores de IC₅₀ são quantificados em nM.

Composto	R	FCQ27		K1	
		IC ₅₀ ^a	IC ₉₀ ^b	IC ₅₀	IC ₉₀
cloroquina		12,1 ±5,3	(30,6)	331 ±194	(1526)
amodiaquina		3,9 ±1,8	(12,7)	12,8 ±5,2	(35,5)
(73)		1,5 ±0,6	(3,3)	3,1 ±1,6	(7,3)
(74)		1,4 ±0,4	(2,9)	1,2 ±0,3	(2,4)
(75)		3,7 ±0,6	(6,4)	8,9 ±6,1	(30,4)

^a Resultados de IC foram obtidos pela média de ± desvio padrão de 3 a 14 testes calculados após locação através função logaritmica logística.

^b Valor de IC foi o valor máximo relatado de 3 testes.

O composto **74** apresentou atividade similar contra ambos isolados, sendo que o valor médio para IC₅₀ foi de 1,2 nM e foi significativamente mais ativo que amodiaquina

contra isolado K1. Os valores de IC₉₀ demonstraram que as relações entre dose e resposta de todos os compostos foram iguais ou superiores em relação ao valor da cloroquina e a da amodiaquina contra ambos isolados de *P. falciparum*.

Os resultados do estudo *in vivo* (**tabela XXII**) mostraram que o composto **74** apresentou atividade apreciável contra cepa de *P. berghei* sensível (ANKA) à cloroquina. Além, a atividade deste composto não foi reduzida contra cepa altamente resistente (EC123) à cloroquina.

TABELA XXII- Atividade antimalárica *in vivo* do composto 74, cloroquina e amodiaquina contra cepa de *P. berghei* em camundongos.

Composto	Dose curativa (mg/Kg)	
	ANKA	EC123
cloroquina	72	480
amodiaquina	48	80
(74)	40	40

Barlin e colaboradores (1992) relataram os resultados de testes em outras bases de Mannich quinolínicas (**tabela XXIII**) para atividade antimalárica *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* sensíveis (FCQ27) e, *in vivo*, contra *P. vinckei vinckei* em camundongos.

Todas as dibases de Mannich **76 a 80** foram mais ativas que cloroquina no ensaio *in vitro* contra cepas sensíveis à cloroquina. Tais compostos foram submetidos, também, à avaliação biológica contra isolados resistentes (K1) à cloroquina e todos foram igualmente efetivos (**tabela XXIII**). Os compostos **77, 78, 79 e 80** foram testados *in vivo* contra *P. vinckei vinckei* em camundongos e efetuaram cura com uma única dose de 200 mg/Kg e o composto **78** foi o mais efetivo, pois todos os 3 animais utilizados sobreviveram por 90 dias. O composto piperidino **80** foi mais efetivo que o composto **77**, seu análogo pirrolidino.

Neste mesmo trabalho, monobases de Mannich foram avaliadas, sendo que o composto **81** foi o mais ativo *in vitro* contra cepa sensível (FCQ27). Todos os outros compostos testados apresentaram atividades menores que cloroquina. Na **tabela XXIV** está demonstrada a estrutura química do composto **81**, bem como valor de IC₅₀.

Os testes *in vivo* realizados contra *P. vinckei vinckei* em camundongos revelaram que o composto **81** foi ineficaz na dose de 200 mg/Kg.

TABELA XXIII- Atividade antimalárica *in vitro* contra isolados de *P. falciparum* para alguns dos compostos relatados pelos autores (Barlin *et al.*, 1992).

Composto	R	X	Y	IC ₅₀ (nM)	
				FCQ27	K1
(76)	NEt ₂	H	H	5	12,5- 25,0
(77)		H	H	3,6	6,3- 12,5
(78)		Me	H	3,1	6,3- 12,5
(79)		H	Me	2,2	12,5- 25,0
(80)		H	H	4,3	-
cloroquina				10,8	>200

TABELA XXIV- Atividade antimalárica *in vitro* do composto 81 e cloroquina contra cepa de *P. falciparum* sensível (FCQ27) à cloroquina.

Composto	R	IC ₅₀ (nM)
(81)		8
cloroquina		10,8

Em 2001, Delarue e colaboradores sintetizaram séries distintas de 4-aminoquinolinas, as quais preservaram a estrutura anelar de amodiaquina, porém com ausência de grupo hidroxila, já que tem sido considerado responsável pela toxicidade de amodiaquina. As séries possuíam cadeias laterais variáveis e foram mantidas as porções dicatiônicas, consideradas importantes para interação com carboxilatos de heme. Avaliações biológicas foram efetuadas e cada composto teve a medida de habilidade de inibir crescimento de cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina *in vitro*. Os compostos mais potentes foram testados *in vivo* contra *P. berghei* em camundongos. As estruturas gerais das séries sintetizadas e avaliadas biologicamente no estudo encontram-se arroladas na **figura 31**.

Verificou-se relação entre a atividade e o número de grupos metílicos. O melhor resultado foi observado para o composto **82**, como mostrado na **tabela XXV**. Este composto foi desprovido de toxicidade quando avaliado em modelo de células humanas (MRC-5) em 6,3 μ M e em modelo de macrófagos peritoniais de camundongos em 3,1 μ M (Delarue *et al.*, 2001). Substituição da porção 4-metilpiperidina por variedade de substituintes aminícos levou a diferenças nos valores de atividade (Delarue *et al.*, 2001). Outro derivado bastante potente foi composto **83**, o qual induziu diminuição de 60% de parasitemia em 7 dias na dose de 40 mg/Kg em camundongos infectados por *P. berghei* (Delarue *et al.*, 2001).

FIGURA 31- Estruturas químicas gerais das séries de 4-aminoquinolinas. Os compostos 82–97 são alguns dos compostos sintetizados e avaliados biologicamente (Fonte: Delarue *et al.*, 2001).

Valores de IC_{50} dos compostos **82** e **83** contra cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina (FcB1R) encontram-se na **tabela XXV**.

TABELA XXV- Sensibilidade *in vitro* de cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina (FcB1R) na presença dos compostos 82, 83, cloroquina e amodiaquina.

Composto	<i>n</i>	NRR ₁	IC ₅₀ (nM) ^a
(82)	1	4-metilpiperidina	77,7 ±52,3
(83)	1	piperidina	44,5 ±9,7
cloroquina			126 ±26
amodiaquina			7,4 ±2,7

^a3 experimentos

Para a série dos ésteres, as melhores atividades foram relatadas para os compostos **84** e **85**. Os efeitos citotóxicos em células humanas (MRC-5) foram observados em 6,3 μ M (Delarue *et al.*, 2001). A substituição do anel piperidínico do composto **84** por diversos grupos, básicos ou não, induziu variações na citotoxicidade em células humanas (MRC-5) (Delarue *et al.*, 2001). Introdução de grupo morfolino **86** foi interessante, pois não apresentou efeitos citotóxicos, enquanto atividade antimalárica foi conservada. O composto

84 foi avaliado *in vivo* contra *P. berghei* e apresentou toxicidade elevada contra camundongos em dose de 40 mg/Kg. Todos os animais morreram no sétimo dia, sendo verificada redução de 100% de parasitemia no quarto dia.

Como conclusão para esta série de compostos, os autores sugeriram que adição de segunda porção básica foi, provavelmente, responsável pelo aumento de acúmulo intracelular no vacúolo do parasito e pela interação com segundo carboxilato de heme em distâncias de 4 a 5 carbonos do anel fenílico, apresentando valores de IC_{50} similares ao da amodiaquina (Delarue *et al.*, 2001). A atividade antimalárica dos compostos **84**, **85**, **86**, cloroquina e amodiaquina contra cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina (FcB1R) é apresentada na **tabela XXVI**.

TABELA XXVI- Atividade antimalárica dos ésteres aminoquinolínicos 84 a 86, cloroquina e amodiaquina frente à cepa (FcB1R).

Composto	n	X	IC_{50} (nM)
(84)	4	piperidina	$15,5 \pm 4,2^b$
(85)	5	piperidina	$27,4 \pm 10,3^a$
(86)	4	morfolina	$14,1 \pm 1,5^a$
cloroquina			126 ± 26^a
amodiaquina			$7,4 \pm 2,7^a$

^a3 experimentos; ^b4 experimentos

Na série das aminas, a maioria dos compostos apresentou valores de IC_{50} menores que 20 μ M. Muitos deles foram mais efetivos que amodiaquina (**tabela XXVII**), entretanto, as toxicidades mostraram-se ressaltadas, com exceção do derivado morfolino **91**, o qual apresentou comportamento único, como também ocorreu com o composto esterificado **86**. O composto **91** foi completamente curativo, reduzindo a parasitemia em 100% no quarto

dia, através da dose de 40 mg/Kg, para infecção em camundongos causada por *P. berghei* (Delarue *et al.*, 2001).

As atividades dos compostos mais promissores contra cepa de *P. falciparum* resistente (FcB1R) à cloroquina estão mostradas na **tabela XXVII**, juntamente com os valores de atividade de cloroquina e amodiaquina.

TABELA XXVII- Atividade antimalárica das aminas mais ativas contra cepa FcB1R.

Composto	NRR ₁	IC ₅₀ (nM)
(87)	NMe(CH ₂) ₂ NMe ₂	5,0 ±0,8 ^b
(88)	NH(CH ₂) ₂ -pirrolidina	6,6 ±1,6 ^a
(89)	NH- <i>t</i> -butil	3,7 ±1,8 ^b
(90)	pirrolidina	6,9 ±3,3 ^b
(91)	morfolina	9,5 ±3,4 ^b
(92)	4-hidroxipiperidina	6,5 ±2,0 ^b
(93)	<i>N</i> -fenilpiperazina	5,5 ±0,6 ^b
(94)	<i>N</i> -piperonilpiperazina	6,9 ±2,6 ^b
(95)	NHCH ₂ C ₆ H ₄ Cl (<i>para</i>)	4,6 ±0,2 ^a
(96)	NHCH ₂ C ₆ H ₄ OMe (<i>para</i>)	4,4 ±0,1 ^a
(97)	NHCH ₂ C ₆ H ₄ CF ₃ (<i>para</i>)	5,5 ±0,1 ^a
cloroquina		126 ±26 ^b
amodiaquina		7,4 ±2,7 ^b

^a2 experimentos: ^b3 experimentos

Os autores lançaram hipótese de que a série das aminas apresentou atividade similar ou maior que amodiaquina dado que estes compostos poderiam apresentar os dois pontos de interação com heme como amodiaquina, porém de forma realçada, já que tais derivados apresentam grupos laterais lipofílicos como *t*-butil, fenil e polifenil. Ausência de toxicidade para os derivados com grupo morfolino, tanto ésteres como aminas, frente às células humanas ou macrófagos de camundongos permaneceu sem explicação pelos autores.

Estas famílias de derivados foram consideradas pelos autores (Delarue *et al.*, 2001) como nova contribuição para estabelecimento de fatores estruturais importantes para induzirem ausência de resistência cruzada com cloroquina e diminuição de toxicidade.

Compostos derivados de primaquina

Malária aumenta espécies reativas de oxigênio, causando diminuição da defesa antioxidante do hospedeiro. A maioria dos antimaláricos induz colapso oxidativo pelo aumento de produção de espécies reativas de oxigênio, matando o parasito, porém, podem exercer efeito deletério para o hospedeiro (Srivastava *et al.*, 1993). Portanto, antimalárico ideal deveria gerar menos espécies reativas de oxigênio e interferir o mínimo possível com a defesa antioxidante. Neste sentido, novo composto 8- aminoquinolínico, análogo de primaquina, CDRI 80/53, ou também denominado bulaquina, (**figura 32; estrutura 98**) tem sido considerado agente potencial anti-relapsos contra malária e encontra-se na fase I da triagem clínica (2001).

Dutta e colaboradores (1989) mostraram que 8,75 mg/Kg de CDRI 80/53 e 7,00 mg/Kg de primaquina curaram infecção causada por *P. cynomolgi* em macacos *Rhesus*. Entretanto, CDRI 80/53 foi menos tóxico que primaquina, pois promoveu formação reduzida de metemoglobina (Puri *et al.*, 1989) e menor hepatotoxicidade (Pandey *et al.*, 1990).

FIGURA 32- Estruturas químicas de primaquina (9) e seu análogo CDRI 80/53 (98)
(Fonte: Pandey *et al.*, 1990).

Srivastava e colaboradores (1993) compararam o efeito de CDRI 80/53 com primaquina no colapso oxidativo hepático e no sistema de defesa antioxidante. Através dos resultados apresentados no estudo, os autores concluíram que o composto CDRI 80/53 não

interferiu com a atividade da enzima superóxido dismutase, em doses baixas, no período de 3 dias e diminuiu a atividade da catalase em 35%. Já primaquina, em doses baixas, causou inibição em 22% da superóxido dismutase e a catalase caiu para 40% comparada ao camundongo controle. Doses mais elevadas de primaquina e CDRI 80/53 resultaram em maior inibição de índices do sistema de defesa antioxidante.

Com estes resultados, Valecha e colaboradores (2001) deram prosseguimento às avaliações clínicas, num ensaio duplo-cego em pacientes infectados com *P. vivax*. Não foi observada diferença estatística da taxa de relapso do parasito entre dois grupos tratados com primaquina e CDRI 80/53, durante um ano. A eficácia de ambos compostos foi considerada equivalente. Porém, como a incidência de efeitos hemolíticos ocasionados por CDRI 80/53 é menor em modelos animais e estudos *in vitro*, bulaquina oferece vantagem significativa em relação à primaquina. Entretanto, mais estudos serão realizados com intuito de avaliar segurança e eficácia de bulaquina em indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato-desidrogenase e no regime de tratamento de 14 dias.

O'Neill e colaboradores (1995) sintetizaram análogo da primaquina (**figura 33; estrutura 99**), substituído com grupo flúor na posição 5 do anel quinolínico. A justificativa para síntese deste composto foi baseada no princípio de que os metabólitos 5-hidroxilados de primaquina formam metabólitos quinona imina tóxicos (**figura 22**). O derivado **99** teve sua toxicidade avaliada *in vitro* em microsossomos hepáticos e eritrócitos humanos. A atividade antimalárica foi testada *in vivo* contra *P. berghei* em camundongos. Os dois ensaios, tanto *in vitro* como *in vivo*, foram comparados com primaquina.

Este estudo preliminar comprovou que introdução do grupo flúor na posição 5 do anel quinolínico da primaquina não resultou na perda da atividade antimalárica *in vivo*, pois o valor de IC₅₀ para o composto **99** foi de 7,78µM/Kg ± 0,93 e para primaquina foi de 2,20 µM/Kg ± 0,79.

FIGURA 33- Estrutura química de 5-fluoroprimaquina 99 (Fonte: O'Neill *et al.*, 1995).

A primaquina foi bioativada pelos microsossomos de seis espécies diferentes, formando metabólitos hemotóxicos. A bioativação variou muito, refletindo as expressões de citocromo P450 hepático que cada espécie pode conferir. A avaliação de toxicidade mostrou que 5-fluoroprimaquina foi menos susceptível à bioativação, embora esta tenha sido observada no modelo com microsossomos hepáticos de duas espécies, incluindo humanos (O'Neill *et al.*, 1995). Os autores sugeriram que para melhor conhecimento da contribuição do grupo flúor como bloqueador da 5-hidroxilação haveria necessidade de estudos em modelos animais para avaliarem o perfil metabólico de primaquina e fluoroprimaquina. Porém, neste estudo o flúor apresentou limitações como grupo bloqueador de biotransformações oxidativas (O'Neill *et al.*, 1995).

Novo análogo da primaquina, denominado tafenoquina (**figura 34; estrutura 100**), foi desenvolvido pelo exército americano em busca de um composto mais seguro, mais efetivo e com tempo de ação maior que primaquina.

FIGURA 34- Estrutura química de tafenoquina (100) (Fonte: Puri, Dutta, 2003).

Tafenoquina é composto ativo contra *Plasmodium sp* em estágios hepáticos, gametócitos e esporozoítas (Kyle, Webster, 1997; Brueckner *et al.*, 1998). Diferente de primaquina, tafenoquina tem atividade pronunciada contra *Plasmodium sp* nos estágios sangüíneos, inclusive contra parasitos multi-resistentes aos fármacos (Cooper *et al.*, 1994; Brueckner *et al.*, 1998).

Estudos pré-clínicos indicaram que tafenoquina foi muito menos tóxica que primaquina. Os efeitos colaterais foram poucos, causando problemas gastrintestinais. O metabolismo foi estudado através de microssomos do fígado de ratos e indicou que tafenoquina é metabolizada de forma lenta, porém extensivamente. (Idowu *et al.*, 1995).

Em estudos clínicos na fase I, tafenoquina mostrou absorção rápida, em torno de duas horas e tempo de meia-vida longo, cerca de 50 vezes mais longo que primaquina, ou ainda, duas a três semanas. Quando ela foi administrada com alimento, a absorção aumentou em torno de 50%. Única dose de 600 mg de tafenoquina resultou em concentrações quantificáveis por mais de cinco semanas, enquanto, primaquina administrada, diariamente, na dose de 15 mg por 14 dias, não apresentou concentrações detectáveis em um ou dois dias após última dose. Estas propriedades foram consideradas vantajosas em relação à primaquina, pois poderia permitir que a administração fosse feita uma vez na semana, para profilaxia ou terapia de dose única, para cura radical de malária causada por *P. vivax*. Os efeitos colaterais foram mínimos e considerados normais, estando de acordo com os resultados dos estudos pré-clínicos, representados por sintomas gastrintestinais e dores de cabeça, mesmo em doses elevadas entre 300 a 600 mg. Por outro lado, primaquina causou tais sintomas com doses de 30 a 60 mg. Quando administrada com alimentos, os efeitos gastrintestinais foram diminuídos (Brueckner *et al.*, 1998). O uso de tafenoquina foi restrito para indivíduos que não apresentaram deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase, pois indivíduos deficientes poderiam sofrer hemólise e para mulheres não-grávidas, devido ao seu efeito hemolítico potencial no feto (Shanks *et al.*, 2001a; Shanks *et al.*, 2001b). Tanto tafenoquina como primaquina foram capazes de induzir metemoglobinemia branda reversível (Brueckner *et al.*, 1998).

Tafenoquina tem sido avaliada em voluntários humanos e tem mostrado atividade profilática potente contra *P. falciparum* (Shanks *et al.*, 2001b). A profilaxia em quenianos foi eficaz em doses de 200 e 400 mg/Kg por semana, porém a dose efetiva mais baixa não havia sido identificada.

Estudo profilático randomizado, duplo-cego, tendo placebo como controle, foi conduzido em pacientes adultos do norte de Gana, a fim de determinar a dose mínima eficaz de tafenoquina, administrada semanalmente, responsável pela prevenção da malária causada por *P. falciparum* (Hale *et al.*, 2003). Em comparação com o placebo, todas as quatro doses demonstraram proteção significativa contra a infecção, sendo que 25 mg por semana apresentaram eficácia de 32% (intervalo de confiança de 95% - 20 a 43%), 50 mg por semana mostrou 84% (intervalo de confiança de 95% - 75 a 91%), 100 mg por semana, 87% (intervalo de confiança de 95% - 78 a 93%) e 200 mg por semana, 86% (intervalo de confiança de 95% - 76 a 92%). A dose de 250 mg por semana de mefloquina demonstrou proteção significativa contra *P. falciparum*, sendo a eficácia de 86% (intervalo de confiança de 95% - 72 a 93%). Tafenoquina foi segura, bem tolerada e eficaz contra *P. falciparum*, nas doses de 50, 100 e 200 mg, por semana, para esta população estudada.

Tafenoquina tem demonstrado que é mais eficaz como agente esquizonticida sangüíneo do que primaquina, pois foi corroborado que esta ação se deve à sua capacidade de acúmulo dentro do eritrócito e meia-vida longa (Brueckner, 1998).

Estudos recentes sugeriram que tafenoquina pode ter eficácia curativa como agente esquizonticida sangüíneo em doses subterapêuticas quando administrada com cloroquina contra cepa resistente de *P. vivax*, em modelos experimentais com macacos *Aotus* (Puri, Dutta, 2003).

À vista dos fatos apresentados, tafenoquina tem sido sugerida como candidata a fármaco profilático, possuindo meia-vida longa, ação tecidual e esquizonticida sangüíneo (Puri, Dutta, 2003; Hale *et al.*, 2003). No entanto, ainda são necessárias avaliações de

segurança para uso de tafenoquina em indivíduos deficientes de glicose-6-fosfato-desidrogenase e em grávidas (Hale *et al.*, 2003).

Compostos derivados de mefloquina

Modificações moleculares foram realizadas na molécula de mefloquina para obtenção de análogos ferrocênicos sintéticos, com o intuito de realçar a atividade antimalárica (Biot *et al.*, 2000). Os ensaios *in vitro* com *P. falciparum* foram realizados em cepa sensível (HB3) à cloroquina e cepa resistente (Dd2) à mefloquina. Os análogos ferrocênicos exibiram atividade antimalárica mais baixa que mefloquina ou quinina contra ambas cepas e concluíram que o sistema anelar piperidínico parece ser importante para atividade diferencial em relação aos compostos sintetizados neste trabalho (Biot *et al.*, 2000).

Isósteros de mefloquina foram previamente sintetizados e avaliados biologicamente *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* resistentes à mefloquina e cloroquina (Dias *et al.*, 2000). Dentre os compostos sintetizados, os isósteros **101** e **102** apresentaram atividade contra tais cepas (**figura 35**).

FIGURA 35- Estruturas químicas dos isósteros de mefloquina (Fonte: Dias *et al.*, 2000).

A partir destes resultados, tais isósteros de mefloquina foram submetidos ao estudo de modelagem molecular (Menezes *et al.*, 2002). Os fatores estruturais e eletrônicos das formas monoprotonadas dos compostos foram analisados utilizando-se métodos de mecânica quântica e cálculos manuais de “docking” para predizerem possível interação dos

compostos com heme. Estudo foi realizado para comparar os sistemas anelares dos compostos **101** e **102** e o núcleo quinolínico de mefloquina monoprotonada. As distâncias interatômicas, ângulos de ligação e ângulos diedros dos compostos **101** e **102** foram próximos dos da mefloquina. A superposição dos compostos **101** e **102** na mefloquina mostraram que o sistema pirazol-piridínico dos compostos é coplanar ao núcleo quinolínico da mefloquina. Os fatores eletrônicos calculados, tais como HOMO e LUMO foram comparáveis aqueles da mefloquina. Fatores eletrônicos e geométricos permitiram que estes compostos estabelecessem interações com heme similares aos relatados para o fármaco mefloquina (Menezes *et al.*, 2002).

Bisquinolinas

Bisquinolinas consistem de duas porções quinolínicas unidas por ligante de estrutura e tamanho variado. Devido ao desenvolvimento de parasitos resistentes à cloroquina, pesquisadores têm mantido a estrutura funcional da cloroquina, efetuando modificações moleculares, com intuito de lograr os parasitos, de modo que os substituintes não sejam reconhecidos por proteínas envolvidas no processo de resistência à cloroquina. Para tal, bisquinolinas volumosas têm sido sintetizadas e avaliadas biologicamente, esperando-se que elas sejam acumuladas mais facilmente no vacúolo digestivo e liberadas com dificuldade para fora do vacúolo pelas cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Vennerstrom *et al.*, 1992).

Várias bisquinolinas têm sido examinadas e piperaquina (**figura 36, estrutura 103**) apresentou atividade *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Guan *et al.*, 1983), contra *P. berghei* em camundongos e contra *P. falciparum* em humanos (Chen, 1991).

Bisquinolinas tendo estrutura geral (**104**) (**figura 36**) foram sintetizadas, apresentando em **R** série de cadeias alquílicas de tamanhos variados e mostraram eficácia contra *P. berghei* em camundongos e contra cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à clorquina (Vennerstron *et al.*, 1992).

FIGURA 36- Estruturas químicas de bisquinolinas (103) e (104) efetivas contra cepas de *P. falciparum* sensível e resistente à cloroquina (Fonte: Raynes *et al.*, 1995).

As bisquinolinas sintetizadas, até então, conservaram a porção cloroquinolina da cloroquina e tais partes eram ligadas por cadeias básicas. No entanto, Raynes e colaboradores (1995) sintetizaram bisquinolinas, as quais apresentaram duas porções de cloroquina mantidas e ligadas por cadeias bisamídicas. Tais compostos foram avaliados *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* sensível e resistente à cloroquina. As bisquinolinas examinadas neste estudo (Raynes *et al.*, 1995) apresentaram valores de IC_{50} menores que os compostos avaliados previamente (Vennerstrom *et al.*, 1992). O valor máximo de atividade foi observado para o composto **105**, onde a cadeia ligante das 2 porções quinolinicas está na posição 8 do anel (**tabela XXVIII**). A razão dos compostos avaliados por Vennerstrom e colaboradores (1992) terem sido mais ativos que os compostos deste estudo (Raynes *et al.*, 1995) não foi entendida pelos autores, porém, lançaram hipótese de que a entrada dos compostos no vacúolo poderia ocorrer de forma diferente, garantindo maior eficiência aos compostos sintetizados primeiramente. Os autores discutiram, ainda, que a atividade antimalárica baixa poderia ser atribuída à falta de grupo cloro na posição 7 do anel quinolínico. Dentre todos os compostos, **105** foi duas a três vezes mais efetivo que cloroquina, como inibidor de crescimento de cepas resistentes, (FAC8) e (K1) (Raynes *et al.*, 1995). Eles acrescentaram que modificações moleculares na estrutura do composto (**105**) poderiam melhorar a atividade antimalárica.

TABELA XXVIII- Valores de IC_{50} para composto 105 e cloroquina contra cepas de *P. falciparum* sensível (D10) e resistentes (FAC8) e (K1) à cloroquina.

(105)			
Composto	IC_{50} (μM)		
	D10	FAC8	K1
cloroquina	0,04 $\pm$ 0,02 (3) ^a	0,4 $\pm$ 0,2 (3)	0,54 $\pm$ 0,07 (2)
(105)	0,13 $\pm$ 0,06 (4)	0,12 $\pm$ 0,07 (3)	0,23 $\pm$ 0,11 (2)

^aNúmero de experimentos entre parênteses

Desta forma, deram início a outro trabalho, ora incorporando grupo cloro na posição 6 do anel quinolínico, ora adicionando grupos ligantes com função amida na posição 6 ou 8 dos anéis quinolínicos (Raynes *et al.*, 1996). Os compostos foram avaliados *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* sensível (D10) e resistente (FAC8) à cloroquina, sendo os mais ativos ilustrados na figura 37.

FIGURA 37- Estruturas químicas de bisquinolinas 106 e 107, substituídas com grupo cloro nas posições 6 e cadeia amídica nas posições 8 dos anéis quinolínicos. Estrutura química de bisquinolina 108, substituída com cadeia amídica nas posições 6 dos anéis quinolínicos (Fonte: Raynes *et al.*, 1996).

A habilidade dos compostos **106** a **108** inibirem crescimento de cepas de *P. falciparum* sensível e resistente à cloroquina apresenta-se na **tabela XXIX**.

TABELA XXIX- Valores de IC₅₀ para inibição *in vitro* de crescimento do *P. falciparum* pelas bisquinolinas e cloroquina.

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	D10	FAC8
cloroquina	0,03 ±0,02 (3) ^a	0,27 ±0,02 (2)
(106)	0,08 ±0,05 (3)	0,13 ±0,07 (3)
(107)	0,12 ±0,06 (3)	0,14 ±0,03 (3)
(108)	1,1 ±0,1 (3)	0,6 ±0,2 (2)

^aNúmero de experimentos entre parênteses:
cada experimento foi realizado em duplicata

Os compostos **106** e **107** foram os inibidores de crescimento do parasito mais eficazes. A atividade de **107** foi associada à de estudo prévio (Raynes *et al.*, 1995), onde compostos que possuíam cadeias ligantes entre os anéis de 6 carbonos, apresentaram atividade maior. Adição de cloro nestes compostos não aumentou a atividade antimalárica, como era esperado. O composto mais ativo dos substituídos com cadeia amídica nas posições 6 dos anéis foi **108**, embora tenha apresentado valores de IC₅₀ muito maiores que cloroquina contra ambas cepas.

A proposta de resistência à cloroquina tem sido relacionada a uma proteína de efluxo do fármaco. Também tem se apoiado no fato de que o parasito opera em pH mais elevado no vacúolo digestivo, o qual diminui o nível de acúmulo de cloroquina. Se a proteína de efluxo realmente está envolvida, é possível que a estrutura das bisquinolinas não sejam bom substrato para tal proteína. No entanto, em gradiente de pH diminuído no vacúolo digestivo, as bisquinolinas teriam facilidade de acúmulo. Portanto, mais estudos são necessários para distinguirem entre estas duas possibilidades.

Ridley e colaboradores (1997) avaliaram as propriedades antimaláricas do enantiômero *S, S* Ro 47-7737 (**109**), previamente sintetizado. Os testes foram realizados *in*

vitro com *P. falciparum*, *in vivo* usando *P. berghei* e *P. yoelii*, duas espécies que infectam roedores.

FIGURA 38- Estrutura química de enantiômero *S,S* Ro 47-7737 (109) (Fonte: Ridley *et al.*, 1997).

O composto **109** foi altamente ativo contra ambas cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina. Teve atividade oral, apresentou ação rápida e tempo longo de efeito e foi considerado agente profilático poderoso. Porém, as atividades fototóxica e carcinogênica apresentadas pelo composto **109**, restringiram seu uso. Os autores descartaram possibilidade deste agente ser submetido a outros ensaios devido à toxicidade demasiada (Ridley *et al.*, 1997).

Cowman e colaboradores (1997) sintetizaram uma série de bis-4-quinolinometanóis e testaram a atividade antimalárica dos compostos. O melhor composto (**110**) (figura 39) foi ativo contra cepas de *P. falciparum* sensível e resistente à cloroquina e contra cepa do parasito resistente à mefloquina. Porém, foi tóxico em modelos animais (Cowman *et al.*, 1997).

FIGURA 39- Estrutura química de bis-4-quinolinometanol 110 (Fonte: Cowman *et al.*, 1997).

Então, o grupo efetuou outra abordagem para bisquinolinas, sintetizando compostos com duas porções de cloroquina, unidas através de ligante alquílico, nas posições 2 dos anéis quinolínicos (Ayad *et al.*, 2001). Os compostos foram avaliados contra cepas de *P. falciparum* sensível (D10) e resistente (K1) à cloroquina, bem como foi testada a capacidade deles inibirem o processo de destoxificação de heme.

O composto **111** (figura 40) foi o mais ativo de três compostos sintetizados e também o mais efetivo nos ensaios de destoxificação de heme. Os valores de IC₅₀ para inibição de crescimento do parasito estão mostrados na **tabela XXX**.

FIGURA 40- Estrutura química da bisquinolina 111 (Fonte: Ayad *et al.*, 2001).

TABELA XXX- Valores de IC para inibições do processo de destoxificação de heme e crescimento *in vitro* de *P. falciparum*.

Composto	IC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (μM)
	D10	K1	β-hematina ^a
cloroquina	40	540	75
mefloquina	90	30	
(111)	43 ± 4	17 ± 11	86 ± 7

^aFormação de β-hematina

Os dados mostraram que o composto **111** exerceu atividade antimalárica similar à da cloroquina contra cepa sensível (D10) e foi mais eficaz contra cepa resistente (K1) que cloroquina. Ainda, apresentou atividade superior à da mefloquina contra ambas cepas. O composto **111** inibiu a formação de β-hematina com a mesma eficiência que cloroquina. O valor de IC₅₀ para inibição de formação de β-hematina para mefloquina não foi apresentado, pois estudos têm relatado que ela inibe com menos eficiência que cloroquina (Ayad *et al.*, 2001).

Os trabalhos mais recentes têm tentado utilizar estratégias para obtenção de compostos quinolínicos potenciais, de modo que não sejam reconhecidos por proteínas envolvidas no efluxo de fármacos, como cloroquina, responsáveis pela resistência do parasito. As bisquinolinas são estruturas mais volumosas que cloroquina e, por isso, os pesquisadores têm postulado que o transportador protéico tem maior dificuldade para lançá-las para fora do vacúolo. Pensando nestes fatores e levando em consideração a capacidade de inibição de crescimento apresentada pelas bisquinolinas frente a cepas sensíveis e resistentes à cloroquina, Girault e colaboradores (2001) deram novo enfoque para os compostos quinolínicos potenciais antimaláricos.

Girault e colaboradores (2001) sintetizaram bis-, tris- e tetraquinolinas, avaliaram atividade antimalárica frente à cepa resistente à cloroquina e testaram toxicidade de 39 compostos. Destes, selecionaram os mais ativos contra cepa de *P. falciparum* resistente (FcB1R) à cloroquina e que apresentaram toxicidade baixa frente a células MRC-5 (linhagem celular embrionária diplóide) e frente a macrófagos peritoniais de camundongos. Por fim, ensaiaram tais compostos contra várias cepas de *P. falciparum*. As estruturas dos compostos promissores encontram-se demonstrados na **figura 41** e **tabela XXXI**.

FIGURA 41- Estruturas químicas das bisquinolinas 112 e 113, selecionadas para avaliação contra várias cepas de *P. falciparum* (Fonte: Girault *et al.*, 2001).

Dentre as bisquinolinas derivadas de amina, o composto escolhido foi **112**, pois não apresentou toxicidade, embora não tenha apresentado a melhor atividade em relação às outras bisquinolinas aminícas. O problema destas bisquinolinas foi a toxicidade muito alta em ambos ensaios de células MRC-5 e macrófagos (Girault *et al.*, 2001). A presença de

piperidina terminal (**113**) favoreceu a atividade antimalárica, porém ainda foram observados efeitos tóxicos nos ensaios. Entretanto, as tetraquinolinas **114** a **119** não apresentaram propriedades citotóxicas, apenas o composto **118** apresentou toxicidade na concentração de 32 μ M.

TABELA XXXI- Diferentes grupos substituintes para tetraquinolinas **114** a **119** selecionadas, para avaliação contra cepas de *P. falciparum*.

Composto	X
(114)	$(\text{CH}_2)_2$ -piperazina $(\text{CH}_2)_2$
(115)	$(\text{CH}_2)_2$
(116)	$(\text{CH}_2)_3$
(117)	$(\text{CH}_2)_5$
(118)	$(\text{CH}_2)_7$
(119)	$(\text{CH}_2)_{10}$

Então, os compostos foram avaliados frente às várias cepas de *P. falciparum* para verificar a habilidade deles inibirem crescimento do parasito em diferentes graus de resistência à cloroquina. Os autores testaram, também a capacidade dos compostos **112** a **119** inibirem a polimerização de heme. A eficiência dos compostos **112** a **119** estão mostrados na **tabela XXXII**.

TABELA XXXII- Valores de IC₅₀ para inibição de crescimento do *P. falciparum* em cepas com graus diferentes de resistência à cloroquina pelos compostos 112 a 119 e cloroquina.

Composto	IC ₅₀ (nM) ^a			
	W2	FcB1R	D6	F32
cloroquina	175 ±31	110 ±26	54 ±12	19 ±4
(112)	170,1 ±19,7	112,8 ±24,9	74,5 ±7,3	64,6 ±2,2
(113)	50,2 ±7,0	38,6 ±17,7	18,9 ±4,9	16,1 ±2,5
(114)	111,9 ±13,4	76,9 ±9,4	59,7 ±4,4	68,3 ±3,1
(115)	29,5 ±5,7	38,1 ±14,3	21,9 ±5,8	23,7 ±2,2
(116)	29,2 ±2,6	18,3 ±9,3	18,5 ±3,9	17,9 ±2,4
(117)	47,8 ±6,4	32,7 ±13,5	29,3 ±8,1	34,5 ± 1,7
(118)	67,2 ±4,9	22,6 ±7,2	41,7 ±8,2	46,3 ±4,6
(119)	179,9 ±5,5	79,1 ±27,6	123,2 ±38,0	132,6 ±4,1

^aAs cepas foram consideradas resistentes à cloroquina para IC₅₀ maior que 100 nM

Modificações moleculares promovidas por acilação do grupo amino no composto **112**, através de grupos substituintes com ligantes de tamanho variável e dimerização das moléculas resultantes foram avaliadas, quantificadas em ensaios contra cepas de *P. falciparum* e na polimerização de heme (Girault *et al.*, 2001).

O composto **112** inibiu a polimerização de heme na concentração de 170 µM, com menos potência que cloroquina. A presença de grupo amino terminal acceptor de ligação de hidrogênio no composto **113** proporcionou aumento da atividade antimalárica, entretanto foi tóxico em células MRC-5 e em macrófagos peritoniais na concentração de 8 µM. Variações moleculares baseadas na dimerização do composto **112** conduziu ao aumento de atividade antimalárica, cerca de seis vezes maior para o composto **116**. Ainda, efeitos citotóxicos *in vitro* não foram observados para os compostos **114** a **119**. Somente o composto **118** apresentou citotoxicidade na concentração de 32 µM. A presença de 2 grupos aceptores de prótons, como no composto **114** foi desfavorável para atividade, quando comparado aos compostos com cadeias ligantes alquílicas simples **115** a **118**. Tais resultados confirmam outros relatados (Ginsburg *et al.*, 1989), provando que alcalinização do vacúolo digestivo pelos fármacos quinolínicos não correlaciona com a atividade antimalárica. Os compostos mais ativos **114** a **119** inibiram crescimento do parasito na

mesma faixa, expressando graus diferentes de resistência à cloroquina e à mefloquina, desde que as cepas F32 e W2 são dez e cinco vezes mais resistentes à mefloquina, respectivamente. As quatro porções quinolínicas foram vitais para aumento de atividade antimalárica. O fato de os valores de IC_{50} para os compostos **113** a **119** terem sido similares para o crescimento de cepas diferentes de *P. falciparum* e a faixa inibitória de polimerização de heme apresentar valores equivalentes ao da cloroquina, sugeriu que a concentração maior dos compostos resultou em efluxo mais fraco ocasionado por transportador do parasito, embora mecanismo de ação divergente ao da cloroquina tivesse sido considerado também (Girault *et al.*, 2001). Concluindo, moléculas menos ativas e mais tóxicas que os compostos com cadeias lineares foram obtidas através de ciclização, provocando rigidez das moléculas. A dimerização conduziu às tetraquinolinas, as quais apresentaram potência maior contra cepas resistentes à cloroquina se comparada ao fármaco, além de não serem citotóxicas (Girault *et al.*, 2001).

2.2- PLANEJAMENTO SINTÉTICO DE NOVOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS

Um dos métodos de planejamento no estudo de relação entre estrutura química e atividade biológica para novos fármacos mais empregados é a modificação molecular, o qual consiste em partir de uma substância com atividade farmacológica conhecida, empregada ou não na terapêutica sintetizando análogos estruturais. Modificações químicas em sua estrutura são feitas com intuito de obter derivados com propriedades físico-químicas alteradas, muitas vezes, com atividade biológica e/ou toxicológica diferentes em relação à substância de partida. A modificação molecular apresenta vantagens expressivas como a grande probabilidade dos compostos terem propriedades farmacológicas similares e, até mesmo, superiores ao protótipo. A síntese pode ser otimizada, sendo realizada em menos tempo e ter custo reduzido (Korolkovas, 1988). A modificação molecular é ferramenta de grande valia para obtenção de compostos antimaláricos, já que possibilita a obtenção de moléculas eficazes contra cepas de *Plasmodium sp* resistentes aos fármacos existentes na quimioterapia (Scott *et al.*, 1987; Vennerstrom *et al.*, 1992; Sánchez-Delgado *et al.*, 1996; De *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997; De *et al.*, 1998; Vippagunta *et al.*, 1999; Delaure *et al.*, 2001; Girault *et al.*, 2001; Stocks *et al.*, 2002).

A preparação dos compostos quinolínicos consiste, primeiramente, na obtenção de β -enaminoésteres, partindo-se de β -cetoésteres- α -alquilados (Marvel, Hager, 1941; Antonioletti *et al.*, 1992) e aminas aromáticas primárias, tendo em vista rota sintética econômica. Diversos métodos encontram-se descritos na literatura para a obtenção de tais intermediários (Reynolds, Hauser, 1955a; Braibante *et al.*, 1990; Baraldi *et al.*, 1983; Valduga *et al.*, 1998). Posterior ciclização de enaminas através da reação de Conrad-Limpach origina 4-hidroxiquinolinas derivadas (Gould, Jacobs, 1939; Reynolds, Hauser, 1955b). Por fim, a substituição do grupo hidroxila na posição 4 do anel quinolínico por cloro (Riegel *et al.*, 1946) gera 4-cloroquinolinas funcionalizadas.

O esquema retrosintético do planejamento dos derivados quinolínicos é representado no **esquema II.1**.

ESQUEMA II.1

Os grupos alila e cinamila, presentes na posição 3 do anel quinolínico provêm de brometo de alila e brometo de cinamila, respectivamente. Os agentes alquilantes reagem com o acetoacetato de etila, formando os compostos β -dicarbonílico- α -alquenilados. A condensação destes com anilina rende enaminas intermediárias, as quais são submetidas à termociclização. As substâncias 2-metil-3-alquil-4-hidroxiquinolinas são submetidas à reação com oxicloreto de fósforo, formando derivados 2-metil-3-alquil-4-cloroquinolinas.

2.2.1- ALQUILAÇÃO DE COMPOSTOS β -DICARBONÍLICOS

Os compostos β -dicarbonílicos e derivados são intermediários importantes na Síntese Orgânica, pois permitem a introdução de diversos grupos funcionais que alteram a reatividade.

O acetoacetato de etila é agente dicarbonílico de fácil acesso, baixo custo e, por isso, muito utilizado como material de partida em Síntese Orgânica. A alquenação deste ocorre mediante formação de carbânions altamente reativos, os quais atuam como fortes nucleófilos na presença de substratos alquilantes que possuam bons grupos abandonadores. No entanto, a posição da alquenação pode variar de acordo com a facilidade de retirada de hidrogênios. Assim, a acidez dos diferentes hidrogênios devido à presença de carbonilas, favorece a reação nesta posição. Destarte, os hidrogênios entre as carbonilas do acetoacetato de etila são facilmente removidos pelo emprego de uma base forte como etóxido de sódio.

A alquenação do acetoacetato de etila (**1**) (**esquema II.2**) pode ser feita utilizando etóxido de sódio em etanol, à temperatura de refluxo, obtendo-se rendimento aproximado de 70% (Marvel, Hager, 1941). Em tais reações há, inicialmente, a formação de um enolato pelo ataque da base ao próton em α à carbonila do éster ou à hidroxila da forma enólica. A reação subsequente com brometo alílico pode resultar em dois produtos, um monoalquilado (**2**) e outro dialquilado (**3**).

ESQUEMA II.2

A preparação de α -alquenil- β -cetoésteres é possível, também, através de acetoacetato de etila (**1**) e hidróxido de lítio em THF, sob refluxo (**esquema II.3**). Reação com brometo de alila forma composto alquenilado, observando-se 79% do produto

monoalquilado (**2**), 5% de produto dialquilado (**3**). Esta metodologia seletiva e largamente aplicável opera sob condições brandas e simples, com reagentes baratos, facilmente disponíveis, em soluções concentradas e volumes reduzidos de solvente (Antonioletti *et al.*, 1992).

ESQUEMA II.3

2.2.2- β-ENAMINOÉSTERES

β-Enaminoésteres são intermediários versáteis para a síntese de análogos naturais, biologicamente ativos, como taxol, agentes anticonvulsivantes, antiinflamatórios, antitumorais, antibacterianos quinolônicos e antimaláricos quinolínicos (Ferraz *et al.*, 1995; Azzaro *et al.*, 1981; Valduga *et al.*, 1998; Michael *et al.*, 2001; Dondoni, Perrone, 1993; Baraldi *et al.*, 1983; Tatee, *et al.*, 1986; Bartoli *et al.*, 2001; Boger *et al.*, 1989). Tais compostos são atrativos, também, devido às reações regioseletivas tanto com eletrófilos como com nucleófilos. Os nucleófilos reagem no carbono carbonílico e no carbono β ao grupo carbonila, enquanto eletrófilos reagem no oxigênio carbonílico, no nitrogênio e no carbono α ao grupo carbonila (**esquema II.4**). Na presença de bases, os eletrófilos reagem no carbono α e no carbono γ ao grupo carbonila seletivamente (para β-enaminocetonas).

ESQUEMA II.4

β-Enaminonas apresentam sistema conjugado, o qual pode ser um sistema mono enamino da 1,3-dicetona ou de 3-cetoéster. Estes apresentam três centros nucleofílicos (1, 3 e 5) e dois centros eletrofílicos (2 e 4) (**esquema II.5**), sendo portanto, moléculas

funcionalizadas e reativas. A reatividade desses compostos varia de acordo com os substituintes ligados aos átomos de carbono ou nitrogênio, ocasionando alteração na densidade eletrônica dos centros reativos e na conformação do sistema (Ueno, Martell, 1955). Constituem elementos de grande importância na Síntese Orgânica.

ESQUEMA II.5

O método clássico empregado para obtenção de β -enaminas é reagir amina primária ou secundária e compostos 1,3-dicarbonílicos sob refluxo em solventes aromáticos com retirada azeotrópica de água através de aparelho de Dean-Stark (Reynolds, Hauser, 1955; Baraldi *et al.*, 1983). Quando as aminas aromáticas utilizadas apresentam baixa reatividade, procedimentos drásticos fazem-se necessários, tais como operação em autoclave a altas temperaturas (Azzaro *et al.*, 1981). No entanto, estas condições podem conduzir à formação de produtos secundários, como acetoamidas, em alta proporção. A reação limita-se ao uso de aminas que apresentam ponto de ebulição alto.

Aminas primárias com impedimento estrutural e que apresentam ponto de ebulição baixo foram submetidas à reação com β -cetoésteres (**esquema II.6**), através de suporte sólido [alumina ou montemorilonita (K10)], apresentando seletividade e rendimentos elevados, em torno de 90 % (Braibante *et al.*, 1990).

ESQUEMA II.6

Rechsteiner e colaboradores (1993) empregaram acetoacetato de metila e pirrolidina (amina secundária) utilizando suporte sólido [montemorilonita (K10)] e obtiveram 95 % de rendimento do β -enaminoéster correspondente (**esquema II.7**). Ainda, Varma e colaboradores (1997) mostraram que reações de aminas primárias com cetonas foram

aceleradas, substancialmente, por microondas sob condições ausentes de solvente, na presença de suporte sólido [montemorilonita (K10)], resultando enaminas com rendimentos elevados.

ESQUEMA II.7

β -enaminocetonas (**esquema II.8**) foram preparadas, posteriormente (Braibante *et al.*, 1990; Valduga *et al.*, 1998), por utilização de suporte sólido [montmorillonita (K10)], porém através de metodologia usando sonicação []]]]. Esta metodologia mostrou-se vantajosa, pois os produtos formados apresentaram rendimentos elevados e o tempo das reações foi curto.

ESQUEMA II.8

2.2.3- SISTEMAS QUINOLÍNICOS A PARTIR DE COMPOSTOS β -CETOÉSTERES

Composto β -cetoéster, como acetoacetato de etila, pode reagir com amina aromática formando β -anilnocrotonato ou anil. Este, pode ser ciclizado através do método de Conrad-Limpach, quando aquecido à temperatura de 250 °C, rendendo 2-alkil-4-hidroxiquinolina (**esquema II.9**).

ESQUEMA II.9

Limpach relatou que os rendimentos na ciclização aumentaram de 30 para 95 % quando solvente inerte como óleo mineral ou difeniléter foi utilizado. A proporção de solvente foi de 4 a 10 partes para cada parte do crotonato. O tempo de ciclização foi cerca de 20 minutos, sob aquecimento de 240 a 250 °C. A aplicação da reação de Conrad-Limpach se ampliou para muitos tipos de aminas aromáticas. Alguns substituintes relatados para o anel benzeno incluem grupos alquílicos, grupos nitro, halogênio e alcoóis. A preparação de anilino crotonatos (**4**) ocorre sob condições reacionais controladas, obtendo-se 60% de 2-metil-4-hidroxiquinolina, sob temperatura ambiente em 5 dias. O rendimento do produto **5** foi aumentado para 70%, quando os materiais de partida foram tratados com acético acético em quantidade catalítica na presença de drierite (sulfato de cálcio) e etanol, em banho a 100 °C por 4 horas (Elderfield, 1952).

No entanto, quando β -cetoéster e amina aromática foram aquecidos à temperatura de 130 a 140 °C, acetoacetanilida **6** foi obtida em 50% de rendimento. A ciclização deste intermediário conduziu à formação de 2-hidróxi-4-metilquinolina (**7**), através de reação denominada síntese de Knoor (**esquema II.10**) (Elderfield, 1952; Smith, 2002).

ESQUEMA II.10

Os fatores que podem influenciar na formação de um regioisômero ou outro foram estudados (Hauser, Reynolds, 1948). As formações de anilino crotonato **4** ou acetoacetanilida **6** são reversíveis, pois quando o crotonato **4** foi aquecido com um equivalente de água e traços de ácido em 130 a 140 °C, formou-se anilida **6**. Quando esta foi submetida à ebulição com etanol e drierite, o crotonato **4** foi formado. Entretanto, desde que os produtos foram interconvertidos, pareceu provável que a influência da temperatura na rota reacional conduziu ao deslocamento do equilíbrio das reações (**esquema II.11**) (Hauser, Reynolds, 1948).

ESQUEMA II.11

Preparação de 4-cloroquinolinas (9) (**esquema II.12**) a partir de 4-hidroxiquinolinas (8) é feita através de metodologia simples, a qual consiste no tratamento de 4-hidroxiquinolinas com oxiclreto de fósforo ou mistura de oxiclreto de fósforo e pentaclreto de fósforo (Riegel *et al.*, 1946; Elderfield, 1952; Snyder *et al.*, 1947; Tarbell, 1946; Elderfield *et al.*, 1946; Price, Roberts, 1946). A quantidade de oxiclreto de fósforo nestas reações de substituição do grupo hidroxila pelo cloro é, normalmente, excessiva e os rendimentos dos derivados clorados são elevados (Riegel *et al.*, 1946).

ESQUEMA II.12

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1- MATERIAIS

3.1.1- FÁRMACO

- Sulfato de cloroquina (Sigma)

3.1.2- REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS (PREPARAÇÕES E ANÁLISES QUÍMICAS)

- acetato de etila (Merck)
- acetoacetato de etila (Merck)
- álcool cinâmico (Aldrich)
- álcool etílico absoluto (Merck)
- álcool metílico (Merck)
- alumina ácida (Merck)
- anilina (Merck)
- bicarbonato de sódio (Synth)
- brometo de alila (Merck)
- cloreto de sódio (Merck)
- clorofórmio (Merck)
- clorofórmio deuterado (Isotec)
- cromatofolhas AI TLC, Sílica gel 60 F254 (Merck)
- diclorometano (Merck)
- difeniléter (Aldrich)
- dimetilsulfóxido deuterado (Isotec)
- etanol (Synth)
- éter etílico (Merck)
- hexano (Synth)
- hidróxido de lítio monoidratado (Merck)
- hidróxido de sódio (Synth)
- oxicloreto de fósforo (Merck)
- peneira molecular 5Å (Aldrich)
- sílica gel 60, tamanho de partícula 0,063-0,2000 mm (Merck)

- sódio metálico
- sulfato de sódio anidro (Nuclear)
- tetraidrofurano (THF) (Merck)
- tribrometo de fósforo (Aldrich)

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

3.1.3- REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS (AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA)

- metanol (Merck)
- corante de Giemsa
- éter etílico (Merck)
- RPMI 1640 (Sigma)
- 10% de soro fetal bovino
- gentamicina (cedido pelo Hospital da Clínicas)
- PBS/ formaldeído
- dimetilsufóxido (Merck)
- hipoxantina triciada (Sigma)
- líquido de cintilação aquaflúor
- placas com 96 alvéolos

3.1.4- EQUIPAMENTOS (PREPARAÇÕES E ANÁLISES QUÍMICAS)

Além da vidrarias e aparelhagem empregadas em laboratório, foram utilizados os equipamentos:

- aparelho para determinação de faixa de fusão BÜCHI 510390
- balança analítica METLER AE 163
- balança técnica MARTE AS5500C
- cromatógrafo gasoso HP 6890
- espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRÜKER, modelo Advance DPX-300

- cromatógrafo gasoso/ espectrômetro de massas SHIMADZU GCMS modelo QP 550A
- estufa para secagem FANEM modelo 515C
- forno KUGELROHR BÜCHI GKR-51 (destilação horizontal)
- rotaevaporador R-114 BÜCHI
- aparelho de ultrassom modelo USC 700, frequência 40 KHz, potência 100W.
- bomba de alto vácuo modelo E2M5 EDWARDS
- lâmpada de radiação ultravioleta 254/365 nm; SPETROLINE modelo ENF-260C para revelação de cromatograma
- forno de microondas doméstico Electrolux modelo ME27F com 2450 MHz
- mufla modelo M 525 série II NEY

3.1.5- EQUIPAMENTOS (AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA)

- fluxo laminar TROX
- estufa de cultura CO₂ WATER ICUBATOR FORMA SCIENTIFIC
- centrífuga MISTRAL 2L MSE
- microscópio OLYMPUS CH2
- balança OHAUS
- aspirador e lavador de células CELL HARVESTER LKB 1295-001
- espectrômetro de cintilação WALLAC, modelo RACK BETA 1209
- espectrofotômetro LABSYSTEM MULTISKAN MS-UNISCIENCE

3.2- MÉTODOS SINTÉTICOS

3.2.1- PREPARAÇÃO de 2-acetil-pent-4-enoato de etila (2)

Método 1 (Antonioletti *et al.*, 1992)

Procedimento

Em balão de duas bocas munido de condensador de refluxo, tubo secante e funil de adição foram adicionados acetoacetato de etila (1) (130 mmols; 16,92 g) e hidróxido de lítio monoidratado (100 mmols; 4,19 g) em 40 mL de THF. A mistura foi aquecida durante uma hora à temperatura de 50 °C. A seguir foi adicionado brometo de alila (100 mmols; 12,09 g) e a reação foi mantida à mesma temperatura e agitação constante durante 24 horas. A mistura resultante foi concentrada e logo após, extraída com acetato de etila e lavada com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O resíduo foi destilado à pressão reduzida e caracterizado por RMN ¹H e ¹³C.

Método 2 (Marvel, Hager, 1941)

Procedimento

Em balão de duas bocas munido de condensador de refluxo, tubo secante e funil de adição foram adicionados 100 mL de álcool etílico e sódio metálico recém cortado (0,2 atg; 4,6 g), sendo mantidos sob agitação magnética até o sódio ter sido completamente consumido. Após, foi adicionado acetoacetato de etila (220 mmols; 28,63 g) e a mistura reacional foi mantida à temperatura de 60 °C por 30 minutos sendo, então, adicionado brometo de alila (200 mmols; 24,19 g) permanecendo, assim, por 18 horas até que o pH da mistura se mostrasse neutro. A mistura foi resfriada, filtrada para retirada do brometo de

sódio e o filtrado foi extraído com acetato de etila e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. O resíduo foi destilado sob pressão reduzida e caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C .

3.2.2- PREPARAÇÃO de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila (4)

Metodologias diferentes foram empregadas para a obtenção de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila com o intuito de compará-las e estabelecer a mais efetiva em termos de rendimento do produto reacional.

Reação geral

Método 1- Através de ultrassom

Procedimento

Em tubo de ensaio foram adicionados 2-acetil-pent-4-enoato de etila (2) e anilina (3), na proporção de 1:2 mmols, respectivamente, e 0,1g de peneira molecular 5 Å. A reação foi mantida em ultrassom, à temperatura ambiente por 6 horas, tendo sido acompanhada por cromatografia em camada delgada, através de sistema eluente de 4 partes de hexano para 1 parte de acetato. Após, a mistura reacional foi retirada do tubo através de diclorometano, transferido para balão de 25 mL e o solvente foi evaporado. Então, o produto foi destilado (destilação horizontal) e submetido à caracterização por RMN ^1H e ^{13}C .

Método 2- Através de microondas

Procedimento

Em bécker foram adicionados 2-acetil-pent-4-enoato de etila (2) e anilina (3). A reação foi submetida à irradiação em microondas, conforme condições especificadas (tabela III.1). O produto foi retirado do recipiente (teflon) através de etanol, extraído em

diclorometano, filtrado e concentrado. Após, o produto foi destilado sob pressão reduzida e submetido à caracterização por RMN ^1H .

TABELA III.1-Condições reacionais para formação de β -enaminoéster (4) através de microondas.

REAÇÃO	(mmol)	(mmol)	POTÊNCIA (W)	TEMPO (min.)	Al_2O_3 (g)	RECIPIENTE
R1	1	1	540	10	0,2*	Teflon
R2	1	1	630	10	0,2*	Teflon
R3	1	1	630	10	0,2**	Teflon
R4	1	1	540	10	0,1*	Pyrex
R5	2	2	630	10	1,0**	Teflon
R6	2	2	630	15	1,0**	Teflon
R7	3	2	540	10	1,0**	Teflon
R8	3	2	630	10	1,0**	Teflon
R9	6	5	540	10	4,0**	Teflon
R10	6	5	540	10	4,0**	Pyrex

* alumina ácida ativada (Perrin, *et al.*, 1980);

**alumina neutra ativada (Perrin, *et al.*, 1980)

Método 3- Através de aquecimento

Procedimento

Em balão de 25 mL munido de tubo secante foram adicionados 2-acetil-pent-4-enoato de etila (2), anilina (3) e peneira molecular de 5 Å ativada à temperatura de 250°C. A mistura foi aquecida conforme condições especificadas (tabela III.2) e acompanhada através de cromatografia em camada delgada, utilizando-se sistema eluente 4 partes de hexano para 1 parte de acetato e RMN ^1H , para avaliação prévia da conversão no produto (4). Então, este foi diluído em diclorometano, filtrado, concentrado e destilado (destilação horizontal) dos materiais de partida. Por fim, caracterizado através de RMN ^1H .

TABELA III.2-Condições reacionais para formação de β -enaminoéster (4) através de aquecimento.

REAÇÃO	(mmol)	(mmol)	TEMPO (h)	PENEIRA (g)	TEMPERATURA (°C)
R11	3	2	18	0,2	70
R12	9	5	4*	1,0	70
R13	15	10	5*	2,0	90
R14	15	10	24	2,0	120
R15	11	10	24	2,0	90
R16	20	10	24	1,0	60

* dias

3.2.3- PREPARAÇÃO de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (5) (Gould, Jacobs, 1939; Hauser, Reynolds, 1948; Price, Roberts, 1946; Reynolds, Hauser, 1955a; Reynolds, Hauser, 1955b)

Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo tubo secante, tampa de vidro e termômetro foram aquecidos, através de manta térmica, 34 mL de difeniléter a temperatura de 250 °C. Após, (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila (4) (produto bruto obtido através de R16; 14,17 mmols, 3,48 g) foi adicionado ao difeniléter, sendo mantida a mistura reacional por 3 horas à mesma temperatura. A mistura foi, então, resfriada à temperatura ambiente e adicionado hexano sob agitação até a formação de precipitado. O sólido de cor palha (5) obtido foi lavado com hexano e depois separado por filtração, o produto foi mantido em bomba de alto vácuo sob aquecimento para destilação do material de partida restante (anilina). Após, o produto obtido foi caracterizado por espectrometria de massas, infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C .

3.2.4- PREPARAÇÃO de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina (6) (Riegel *et al.*, 1946) **Procedimento**

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante foram adicionados 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (**5**) (10,41 mmols, 2,07 g) e POCl₃ (22 mL). A mistura foi aquecida durante 25 horas à temperatura de 120 °C. O excesso residual de POCl₃ foi eliminado sob destilação à pressão reduzida. A mistura resultante foi lavada com gelo, solução de hidróxido de sódio a 10% e extraída com diclorometano. Após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada por evaporação. O produto final puro foi caracterizado por espectrometria de massas, infravermelho, RMN ¹H e ¹³C.

3.2.5- PREPARAÇÃO de [(1E)-3-bromoprol-enil]benzeno (8) (Mori, 1973) **Procedimento**

Em balão de três bocas de 500 mL, foram adicionados álcool cinâmico (**7**) (200 mmols, 26,84 g) e 250 mL de hexano. A mistura foi submetida à agitação magnética, resfriamento em banho de gelo e à atmosfera de argônio. Após, foi adicionado, vagarosamente, PBr₃ (200 mmols, 54,14 g) através de funil de adição e a mistura reacional foi mantida por 5 horas até o total consumo do álcool cinâmico. Então, após tempo de reação, foi adicionada água destilada gelada e a extração foi feita com hexano (3 vezes de 100 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e seca com sulfato de sódio anidro. O produto (**8**) foi destilado à pressão reduzida e caracterizado através de RMN ¹H e ¹³C.

3.2.6- PREPARAÇÃO de 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila (9) (Antonioletti *et al.*, 1992)

Procedimento

Em balão de duas bocas munido de condensador de refluxo, tubo secante e funil de adição foram adicionados acetoacetato de etila (130 mmols; 16,92 g) e hidróxido de lítio monoidratado (100 mmols; 4,19 g) em 40 mL de THF. A mistura foi aquecida durante 1 hora à temperatura de 50 °C. A seguir, foi adicionado brometo de cinamila (100 mmols, 19,71 g) e a mistura reacional foi mantida à mesma temperatura e agitação durante 24 horas. A mistura resultante foi concentrada e logo após, extraída com acetato de etila e lavada com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O resíduo (9) foi destilado à pressão reduzida e caracterizado por RMN ¹H e ¹³C.

3.2.7- PREPARAÇÃO de (2*Z*,4*E*)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila (10)

Método- Através de aquecimento

Procedimento

Em balão de 25 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante foram adicionados 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila (20 mmols, 4,93 g), anilina (30 mmols, 2,79 g) e 2,0 g de peneira molecular de 5 Å. A mistura foi aquecida à temperatura de 60 °C durante 48 horas. O produto (10) foi diluído em diclorometano, filtrado,

concentrado, destilado sob pressão reduzida dos materiais de partida e caracterizado por RMN ^1H .

3.2.8- PREPARAÇÃO de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (11) (Gould, Jacobs, 1939; Hauser, Reynolds, 1948; Price, Roberts, 1946; Reynolds, Hauser, 1955a; Reynolds, Hauser, 1955b)

Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo tubo secante, tampa de vidro e termômetro foram aquecidos, através de manta térmica, 40 mL de difeniléter à temperatura de 250°C. Após, (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila (10) (produto bruto obtido demonstrado no item 3.2.7; 17 mmols, 5,46 g) foi adicionado ao difeniléter, sendo mantida a mistura reacional por 4 horas à mesma temperatura. A mistura foi, então, resfriada à temperatura ambiente e adicionado hexano sob agitação até a formação de precipitado. O sólido amarelo obtido foi lavado com hexano e depois de separado por filtração, recristalizado de mistura de 2 partes de hexano para 1 parte de etanol. O produto foi caracterizado por espectrometria de massas, infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C .

3.2.9- PREPARAÇÃO de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina (12)

Procedimento

Em balão de 25 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante foram adicionados 2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (**11**) (3,54 mmols, 0,97 g) e POCl₃ (7,5 mL). A mistura foi aquecida durante 25 horas à temperatura de 120 °C. O excesso residual de POCl₃ foi eliminado por destilação à pressão reduzida. A mistura resultante foi lavada com gelo, solução de hidróxido de sódio a 10% e extraída com diclorometano. Após, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada por evaporação. O produto final puro foi caracterizado por espectrometria de massas, infravermelho, RMN ¹H e ¹³C.

3.3- MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A revelação das placas foi feita por lâmpada de ultravioleta (UV) de comprimento de 254 nm e vapor de iodo.

3.3.2- CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

As análises de pureza foram realizadas para situações possíveis através de cromatografia gasosa, em equipamento HP 6890, usando coluna de metilsilicone com 30 m de comprimento e 0.32 mm de diâmetro interno. N_{2(g)} como fase móvel e detector de ionização de chama (FID).

3.3.3- - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Foi utilizado espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os produtos e intermediários foram dissolvidos em clorofórmio deuterado ou dimetilsulfóxido-d₆ deuterado com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno (0 ppm). Todos os deslocamentos químicos foram registrados em partes por milhão (ppm). Foram usadas as seguintes letras para atribuir os sinais do espectro RMN ¹H: s = singlete, sl =

singleto largo, d = dubleto, t = tripleto, dt = duplo tripleto, ddt = duplo duplo tripleto, m= multipleto, dt=duplo tripleto, q= quarteto.

3.3.4 - FAIXA DE FUSÃO

As análises de faixa de fusão (f.f.) ou ponto de fusão (p.f.) foram feitas em aparelho BÜCHI 510390.

3.3.5 - ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

As análises de fragmentação das moléculas foram realizadas em cromatógrafo gasoso/ espectrômetro de massas (GCMS), modelo QP 550 A, coluna J & W SCIENTIFIC, modelo DB-5 com 30 m de comprimento, diâmetro 25 mm e filme 0,25 µm, empacotamento (5 % - fenil)-metilpolisiloxano, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.3.6 - ESPECTRÔMETRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro BOMEM usando-se o método de pastilha de KBr ou método da cela de NaCl.

3.4- AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em colaboração com o Dr. André Gustavo Tempone. Os testes de sensibilidade do *P. chabaudi* em relação aos compostos sintetizados foram corroborados através da determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀), definida como sendo a dose do composto biologicamente ativo necessária para causar a morte em 50 % do parasito e comparados aos valores de CE₅₀ para sulfato de cloroquina.

Os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com meio absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Camundongos machos BALB/c (20 a 22 g) foram infectados com a cepa AJ de *P. chabaudi* até que a parasitemia fosse satisfatória, entre 60 a 70 %, para realização do ensaio. Para efetuar a verificação da parasitemia, esfregaços de sangue dos

animais infectados foram corados por Giemsa a 1 %. Então, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca e centrifugado a 500 rpm para separação prévia das hemáceas contendo em sua grande maioria formas trofozoítas jovens. O precipitado formado por hemáceas foi diluído em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e gentamicina (15 µg/mL) e adicionado à microplaca de cultura, composta por 96 poços, os quais continham 5.10⁶ plasmódios em cada poço, em um volume final de 150 µL.

Os compostos foram dissolvidos em DMSO e as soluções, diluídas (múltiplos de dois) com meio de cultura na microplaca de 96 poços, partindo-se da concentração de 100 µg/ mL. A placa foi incubada em estufa contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob temperatura de 37 °C e mantida em incubação inicial por 5 horas. Sulfato de cloroquina foi solubilizado em solução salina e esta, aplicada à placa, partindo-se da concentração inicial de 50 µM. Controles com DMSO foram incubados na mesma microplaca, em poços demarcados. Após este período inicial de incubação foi adicionado 1 µCi/ poço de [³H] hipoxantina e, novamente, foi incubada por 24 horas. Após, as culturas da microplaca foram lavadas em aparelho Cell Harvester e a contagem dos parasitos foi realizada através de aparelho Rack Beta 1209 Wallac. A inibição de crescimento do parasito foi determinada para cada concentração dos compostos e comparada à radioatividade incorporada pela cultura controle, ou seja, pela cultura sem composto ou fármaco. A análise dos dados foi realizada através de curva sigmóide dose-resposta pelo software Graph Pad Prism 3.0.

3.5- AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA *IN VITRO*

A toxicidade dos compostos sintetizados foi corroborada através de determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀), definida como dose do composto biologicamente ativo, que resulta em 50 % de morte em determinada população celular e comparados aos valores de CE₅₀ para sulfato de cloroquina.

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas (18-22 g) através de lavagem com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino.

A viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c nos ensaios *in vitro* foi verificada pelo método de MTT (Tada *et al.*, 1986). O MTT [cloreto de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] é cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo de mitocôndrias. Devido às desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto, formazan. Assim, através de leitura de densidade óptica (D.O.) em 570 nm é possível quantificar células viáveis do sistema utilizado.

O MTT, na forma de pó amarelo fino, foi dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/mL e depois esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm. MTT, na quantidade de 20 µL foi adicionado nos poços da microplaca, as quais possuíam 4.10^6 macrófagos peritoneais diluídos em meio RPMI e a placa foi incubada sob temperatura de 37 °C em incubador contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ por 4 horas.

Os compostos foram dissolvidos conforme descrito anteriormente e adicionada a concentração inicial de 100 µg/mL em cada poço e diluídos (múltiplos de dois) em várias concentrações. Controle com DMSO (sem composto e fármaco) foi adicionado em poços demarcados na microplaca. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. A leitura da D.O. foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro LABSYSTEMS MULTISKAN MS. A análise dos dados foi realizada através de curva sigmóide dose-resposta pelo software Graph Pad Prism 3.0.

3.6- ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR

Com intuito de elucidar as possíveis contribuições dos grupos hidroxila ou cloro e alil ou cinamil, os compostos foram submetidos ao estudo de modelagem molecular, realizado pelas doutoras Kerly F. M. Pasqualoto, do grupo de pesquisa do LAPEN

(Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Endemias Tropicais), situado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e Carla M. S. Menezes, bolsista do Programa CAPES ProDoc, junto ao Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos desta Faculdade. A importância da natureza e posição dos substituintes no anel quinolínico foi avaliada sob os aspectos estérico, eletrônico e lipofílico, utilizando-se cloroquina como molécula comparativa (**Apêndice**).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- RESULTADOS DO ESTUDO QUÍMICO

2-acetil-pent-4-enoato de etila (2)

$C_9H_{14}O_3$

PM= 170,21 g/mol

Rendimento: 79%

Aspecto: Líquido transparente

Ponto de ebulição: 121 °C (44 mmHg)

ESPECTRO 1- Espectro de RMN 1H do 2-acetil-pent-4-enoato de etila

TABELA IV.1-Dados de RMN 1H de 2-acetil-pent-4-enoato de etila

RMN 1H 300 MHz ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,25 (t; 3H; J=7,0 Hz, H-C ₆); 2,21 (s; 3H; H-C ₁); 2,56(t; 2H; J=7,0 Hz, H-C ₇); 3,49 (t; 1H; J=7,0 Hz, H-C ₃); 4,16 (q; 2H; J=7,0 Hz, H-C ₅); 5,02 (d; 1H; J=9,7 Hz, H-C ₉ cis); 5,06 (d; 1H; J=15,0 Hz, H-C ₉ trans); 5,67-5,76 (m, 1H, H-C ₈)

ESPECTRO 2- Espectro de RMN ^{13}C do 2-acetil-pent-4-enoato de etila

TABELA IV.2-Dados de RMN ^{13}C de 2-acetil-pent-4-enoato de etila

RMN ^{13}C 300 MHz (CDCl_3) δ (ppm)

14,19 (C_6); 29,05 (C_1); 32,28 (C_7); 58,86 (C_3); 61,34 (C_5); 117,63 (C_9);

134,83 (C_8); 169,27 (C_4); 202,07 (C_2)

(2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila (4)C₁₅H₁₉NO₂

PM= 245,32 g/mol

Aspecto: Líquido avermelhado

TABELA IV.3- Dados obtidos através da formação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila

METODOLOGIA	REAÇÃO	(%) de CONVERSÃO*
Ultrassom		46
Microondas	R1	27,5
	R2	40
	R3	36
	R4	23,5
	R5	46
	R6	40
	R7	49
	R8	52
	R9	55
	R10	54
Aquecimento	R11	40
	R12	-
	R13	-
	R14	-
	R15	25
	R16	78 - 85

* Conversão obtida através de RMN ¹H.**Reação R12**

A reação 12 foi acompanhada durante 4 dias para otimização do rendimento reacional. No 3º dia de reação a conversão no produto atingiu 45 % verificando –se aumento percentual dia a dia. Porém, no 4º dia, a conversão caiu para 31 %. Tais conversões foram verificadas através de RMN ¹H.

Reação R13

A reação 13 foi acompanhada durante 5 dias. No 4º dia, a conversão apresentou-se em 45 % e no 5º dia, caiu para cerca de 30 %, verificado através de espectros de RMN ^1H (dados não mostrados).

Reação R14

A reação 14 apresentou mistura de amida e enamina, nas condições reacionais utilizadas, de acordo com análise de RMN ^1H .

ESPECTRO 3- Espectro de RMN ^1H do (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila

TABELA IV.4-Dados de RMN ^1H de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila

RMN ^1H 300 MHz (CDCl_3) δ (ppm)

1,29 (t; 3H; J=7.2 Hz, H-C₆); 2,01 (s; 3H, H- C₁); 3,06 (d; 2H; J=5.8 Hz, H-C₇); 4,19 (q; 2H; J=7.2 Hz, H-C₅); 4,93-5,13 (m; 2H, H-C₉); 5,79-5,92 (m; 1H, H- C₈); 7,02 (d; 2H; J=7.5 Hz, H-C₁₁ e H- C₁₅); 7,15 (t; 1H; J=7.5 Hz, H- C₁₂ e H- C₁₄); 7,30 (t; 1H; J=7.5 Hz, H- C₁₃); 11,06 (s; 1H, H- NH)

3-alil-2-metilquinolin-4-ol (5)C₁₃H₁₃NO PM= 199,25 g/mol

Rendimento: 67-75%

Aspecto: sólido palha

Faixa de fusão: 244-245 °C

ESPECTRO 4- Espectro de RMN ¹H de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol**TABELA IV.5-Dados de RMN ¹H de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol****RMN ¹H 300 MHz (DMSO) δ (ppm)**

2,25 (s, 3H, H-C₁₁); 3,18 (d, 2H, H-C₁₂, J=6,0 Hz); 4,81 (d, 1H, H-C₁₄ *cis*, J=9,3 Hz); 4,86 (d, 1H, H-C₁₄ *trans*, J=15,2 Hz); 5,73 (ddt, 1H, H-C₁₃, J=15,2; 9,3; 6,0 Hz); 7,16 (t, 1H, H-C₆, J=7,6 Hz); 7,37 (d, 1H, H-C₈, J=8,2 Hz); 7,48 (t, 1H, H-C₇, J=7,6 Hz); 7,95 (d, 1H, H-C₅, J=8,1 Hz); 11,37 (sl, 1H, H-OH)

ESPECTRO 5- Espectro de RMN ^{13}C de 3-alil-2-metilquinolin-4-olTABELA IV.6- Dados de RMN ^{13}C de 3-alil-2-metilquinolin-4-olRMN ^{13}C 300 MHz (DMSO) δ (ppm)

17,34 (C_{11}); 28,67 (C_{12}); 114,02 (C_{14}^*); 116,06 (C_3); 117,45 (C_8^*); 122,37 (C_6); 123,33 (C_{10}); 125,06 (C_5); 130,98 (C_7); 136,40 (C_{13}); 139,13 (C_9); 146,72 (C_2); 175,13 (C_4)

*Podem estar trocados

ESPECTRO 6- Espectrometria de massas de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol**TABELA IV.7- Dados de massas de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol**

CG / MS	
razão massa/ carga (m/z): intensidade relativa (%)	
199: 24,10 %, ([C ₁₃ H ₁₃ NO] ⁺), íon molecular;	184: 100 %, ([C ₁₂ H ₁₀ NO] ⁺);
77: 16,69 %, ([C ₆ H ₅] ⁺)

ESPECTRO 7- Espectrometria de infravermelho de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol**TABELA IV.8- Dados de infravermelho de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol**

IV (cm⁻¹) (KBr)

3.446: δ axial O-H; 3.266: δ axial C-H (aromático); 3.097-3.070: δ axial C-H (alifático);
1.639-1.425: δ axial C=C, C=N; 1.354: δ angular O-H; 1.252: δ axial C-O; 995, 906:
 δ angular simétrica fora do plano C-H; 792, 756: δ angular fora do plano C-H (aromático)

3-alil-4-cloro-2-metilquinolina (6) $C_{13}H_{12}NCl$

PM= 217,69 g/mol

Rendimento: 95%

Aspecto: sólido marrom claro

Ponto de fusão: 140 °C

ESPECTRO 8- Espectro de RMN 1H de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina**TABELA IV.9- Dados de RMN 1H de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina****RMN 1H 300 MHz ($CDCl_3$) δ (ppm)**

3,23 (s; 3H, H-C₁₁); 3,86 (d; 2H, J=7,0 Hz, H-C₁₂); 4,98 (d; 1H, J=17,1 Hz, H-C₁₄ trans);
 5,23 (d; 1H, J=10,2 Hz, H-C₁₄ cis); 5,93 (m; 1H, H-C₁₃); 7,89 (t; 1H, J=7,4 Hz, H-C₆);
 8,02 (t; 1H, J=8,4 Hz, H-C₇); 8,39 (d; 1H, J=8,5 Hz, H-C₈);
 9,06 (d; 1H, J=8,5 Hz, H-C₅)

ESPECTRO 9- Espectro de RMN ^{13}C de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolinaTABELA IV.10- Dados de RMN ^{13}C de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina

RMN ^{13}C 300 MHz (CDCl_3) δ (ppm)

19,18 (C_{11}); 33,64 (C_{12}); 118,21 (C_3); 122,19 (C_8); 124,96 (C_6); 125,91 (C_{13}); 130,32 (C_{10}); 130,82 (C_{14}); 131,55 (C_5); 134,13 (C_7); 137,66 (C_9); 150,61 (C_2); 157,04 (C_4)

ESPECTRO 10- Espectrometria de massas de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina

TABELA IV.11- Dados de massas de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina

CG / MS	
razão massa/ carga (m/z): intensidade relativa (%)	
219: 31,47 %, ([C ₁₃ H ₁₂ NCI] ⁺ + 2),	217: 100 %, ([C ₁₃ H ₁₂ NCI] ⁺), ion molecular;
202: 34,81 %, ([C ₁₂ H ₉ NCI] ⁺);	182: 63,52 %, ([C ₁₃ H ₁₂ N] ⁺);
167: 82,48 %, ([C ₁₂ H ₉ N] ⁺);	77: 35,59 %, ([C ₆ H ₅] ⁺)

ESPECTRO 11- Espectrometria de infravermelho de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina

TABELA IV.12- Dados de infravermelho de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina

IV (cm⁻¹) (KBr)

3.066: δ axial C-H (aromático); 2.961: δ axial C-H (alifático); 1.637-1.430: δ axial C=C, C=N; 1.092: δ axial C-Cl (Cl na posição *p*); 998, 926: δ angular simétrica fora do plano C-H; 825, 775: δ angular fora do plano C-H (aromático)

[(1E)-3-bromopro1-enil]benzeno (8) C_9H_9Br

PM= 197,08 g/mol

Rendimento: 64%

Aspecto: líquido amarelo intenso

Ponto de ebulição: 100°C (0,40 mm Hg)

ESPECTRO 12- Espectro de RMN 1H de [(1E)-3-bromopro1-enil]benzeno**TABELA IV.13- Dados de RMN 1H de [(1E)-3-bromopro1-enil]benzeno****RMN 1H 300 MHz ($CDCl_3$) δ (ppm)**

4,16 (d; 2H; J=7,9 Hz, H-C₁); 6,39 (dt; 1H; J=7,7 e 15,6 Hz, H-C₂); 6,64 (d; 1H; J=15,6 Hz, H-C₃); 7,24-7,40 (m; 5H, H-anel)

ESPECTRO 13- Espectro de RMN ¹³C de [(1*E*)-3-bromoprop-1-enil]benzeno

TABELA IV.14- Dados de RMN ¹³C de [(1*E*)-3-bromoprop-1-enil]benzeno

RMN ¹³ C 300 MHz (CDCl ₃) δ (ppm)
33,46 (C ₁); 125,19 (C ₂); 126,74 (C- <i>meta</i>); 128,34 (C- <i>para</i>); 128,64 (C- <i>orto</i>); 134,52 (C ₃); 135,77 (C- <i>ipso</i>)

2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila (9)C₁₅H₁₈O₃

PM= 246,31 g/mol

Rendimento: 64%

Aspecto: líquido amarelo claro

Ponto de ebulição: 130°C (0,45 mm Hg)

ESPECTRO 14- Espectro de RMN ¹H de 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila**TABELA IV.15- Dados de RMN ¹H de 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila****RMN ¹H 300 MHz (CDCl₃) δ (ppm)**

1,27 (t; 3H; J=7,1 Hz, H-C₆); 2,26 (s; 3H; H-C₁); 2,75 (t; 2H; J=7,2 Hz, H-C₇); 3,59 (t; 1H; J=7,2 Hz, H-C₃); 4,20 (q; 1H; J=7,1 Hz, H-C₅); 6,12 (dt; 1H; J=7,2 e 15,7 Hz, H-C₈); 6,46 (d; 1H; J=15,7 Hz, H-C₉); 7,18-7,33 (m; 5H, H-anel)

ESPECTRO 15- Espectro de RMN ^{13}C de 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila

TABELA IV.16- Dados de RMN ^{13}C de 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila

RMN ^{13}C 300 MHz (CDCl_3) δ (ppm)

14,13 (C_6); 29,24 (C_1); 31,51 (C_7); 59,56 (C_3); 61,48 (C_5); 125,70 (C_8); 126,15 (C-meta); 127,39 (C-para); 128,51 (C-orto); 132,70 (C_9); 136,98 (C-ipso); 169,20 (C_4); 202,41 (C_2)

(2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila (10)

$C_{21}H_{23}NO_2$ PM= 321,42 g/mol

Rendimento bruto: 89%

Aspecto: líquido viscoso de coloração rubi

ESPECTRO 16- Espectro de RMN 1H (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato

TABELA IV.17- Dados de RMN 1H de (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato

RMN 1H 300 MHz ($CDCl_3$) δ (ppm)

1,31 (t; 3H; $J=7.0$ Hz, H-C₆); 2,06 (s; 3H, H- C₁); 3,22 (d; 2H; $J=5.7$ Hz, H-C₇); 4,20 (q; 2H; $J=7.0$ Hz, H-C₅); 6,24-6,36 (m; 2H, H-C₈, H-C₉); 7,03-7,36 (m; 10H; anéis); 11,10 (s; 1H, H- NH)

2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (11)C₁₉H₁₇ NO

PM= 275,35 g/mol

Rendimento: 43-56%

Aspecto: sólido amarelo claro

Faixa de fusão: 238 – 240 °C

ESPECTRO 17- Espectro de RMN ¹H 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol**TABELA IV.18- Dados de RMN ¹H de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol****RMN ¹H 300 MHz (DMSO) δ (ppm)**

2,33 (s, 3H, H-C₁₁); 3,35 (d, 2H, J=5,6 Hz, H-C₁₂); 6,18 (dt, 1H; J=5,7 e 16 Hz, H-C₁₃); 6,29 (d, 1H, J=16 Hz, H-C₁₄); 7,07 (t, 1H, J=7,1 Hz, H-C_p); 7,1-7,15 (m, 4H, H_o e H_m); 7,25 (d, 1H, J=7,2 Hz, H-C₆); 7,40 (d, 1H, J=8,0 Hz, H-C₈); 7,50 (t, 1H, J=7,5 Hz, H-C₇); 7,99 (d, 1H, J=7,9 Hz, H-C₅); 11,43 (s, 1H, H-OH)

ESPECTRO 18- Espectro de RMN ^{13}C 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-olTABELA IV.19- Dados de RMN ^{13}C de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-olRMN ^{13}C 300 MHz (DMSO) δ (ppm)

116,26 (C_3); 117,48 (C_8); 122,41 (C_6); 123,38 (C_{10}); 125,07 (C_5); 125,37 (C_{13}); 125,71 (C_m); 126,73 (C_p); 128,41 (C_o); 128,94 (C_{14}); 131,01 (C_7); 137,22 (C_{ipso}); 139,14 (C_9); 146,79 (C_2); 175,18 (C_4)

ESPECTRO 19- Espectro de massas de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol

TABELA IV.20- Dados de massas de 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol

CG / MS

razão massa/ carga (m/z): intensidade relativa (%)

275: 12,14 %, ($[C_{19}H_{17}NO]^+$), íon molecular; 184: 100 %, ($[C_{12}H_{10}NO]^+$);

77: 6,83 %, ($[C_6H_5]^+$)

ESPECTRO 20- Espectrometria de infravermelho de 2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol

TABELA IV.21- Dados de infravermelho de 2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol

IV (cm⁻¹) (KBr)

3.456: δaxial O-H; 3.076: δaxial C-H (aromático); 3.076-3.021: δaxial C-H (alifático);
 1.636: δaxial C=C (alifático); 1.606-1.423: δaxial C=C, C=N; 1.357: δangular O-H;
 1.253: δaxial C-O; 1.026, 965: δangular simétrica fora do plano C-H;
 756: δangular fora do plano (aromático)

4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina (12) $C_{19}H_{16}NCl$

PM= 293,78 g/mol

Rendimento: 70-75%

Aspecto: sólido marrom claro

Faixa de fusão: 106-108 °C

ESPECTRO 21- Espectro de RMN 1H de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina**TABELA IV.22- Dados de RMN 1H de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina**

RMN 1H 300 MHz ($CDCl_3$) δ (ppm)
2,84 (s, 1H, H-C ₁₁); 3,93 (d; 2H, J=3,36 Hz, H-C ₁₂); 6,26-6,39 (m, 1H, H-C ₁₃);
6,30 (d, 1H, J=15,9 Hz, H-C ₁₄); 7,19-7,29 (m, 6H, H _o , H _m , H _p , H-C ₈);
7,61 (t, 1H, J=7,5 Hz, H-C ₆); 7,74 (t, 1H, J=7,5 Hz, H-C ₇);
8,11 (d, 1H, J=8,3 Hz, H-C ₈) ; 8,23 (d, 1H, J=8,4 Hz, H-C ₈)

ESPECTRO 22- Espectro de RMN ^{13}C de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

TABELA IV.23- Dados de RMN ^{13}C de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

RMN ^{13}C 300 MHz (CDCl_3) δ (ppm)

23,61 (C_{11}); 33,63 (C_{12}); 124,38 (C_3); 124,66 (C_8); 125,62 (C_6); 125,89 (C_m); 126,14 (C_{13}); 127,25 (C_p); 127,48 (C_{10}); 127,95 (C_o); 129,75 (C_{14}); 130,20 (C_5); 131,74 (C_7); 136,85 (C_9); 145,76 (C_2); 158,68 (C_4)

ESPECTRO 23- Espectro de massas de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

TABELA IV.24- Dados de massas de 4-cloro-2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

CG / MS	
razão massa/ carga (m/z): intensidade relativa (%)	
295: 8,78 %, ([C ₁₉ H ₁₆ NCl] ⁺ +2);	293: 31,76 %, ([C ₁₉ H ₁₆ NCl] ⁺), ion molecular;
258: 100 %, ([C ₁₉ H ₁₆ N] ⁺);	243: 18,40 %, ([C ₁₈ H ₁₃ N] ⁺);
77: 2,89 %, ([C ₆ H ₅] ⁺)

ESPECTRO 24- Espectrometria de infravermelho de 4-cloro-2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

TABELA IV.25- Dados de infravermelho de 4-cloro-2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolina

IV (cm⁻¹) (KBr)

3.023-3.059: δaxial C-H (aromático); 2.956: δaxial C-H (alifático); 1.606-1.423: δaxial C=C, C=N; 1.076: δaxial C-Cl (Cl na posição *p*); 988, 929: δangular simétrica fora do plano C-H 838, 764: δangular fora do plano C-H (aromático)

4.2- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

TABELA IV.26- Concentração Efetiva em 50 % dos compostos avaliados *in vitro* contra cepa de *Plasmodium chabaudi* AJ

COMPOSTOS	CE* (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95 %
(5)	7,722	6,494-9,181
(6)	8,393	8,023-8,781
(11)	0,1120	0,05307-0,2362
(12)	0,3523	0,1286-0,9650
Sulfato de cloroquina	0,1266	0,09344-0,1716

*CE= Concentração Efetiva em 50 %.

GRÁFICO IV.1- CE_{50} dos compostos avaliados *in vitro* contra cepa de *Plasmodium chabaudi*

LEGENDA: **A:** Composto (12)
 B: Composto (11)
 C: Composto (6)
 D: Composto (5)

4.3- RESULTADOS DA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

TABELA IV.27- Concentração Efetiva em 50 % dos compostos avaliados em macrófagos peritoneais coletados de camundongos BALB/c

COMPOSTOS	CE* (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95 %
(5)	53,45	40,63-70,33
(6)	19,08	17,14-21,24
(11)	31,42	25,68-38,46
(12)	16,15	14,38-18,14
Sulfato de cloroquina	18,59	15,83-21,83

*CE= Concentração Efetiva em 50 %.

GRÁFICO IV.2- CE_{50} dos compostos avaliados em macrófagos peritoneais coletados de camundongos BALB/c

LEGENDA: **A: Composto (12)**
 B: Composto (11)
 C: Composto (6)
 D: Composto (5)

4.4- DISCUSSÃO DO ESTUDO QUÍMICO

4.4.1- PREPARAÇÃO DE (2Z)-2-[1-(FENILAMINO)ETILIDENO]PENT-4-ENOATO DE ETILA (4) ATRAVÉS DE ULTRASSOM

Para realizar a alquilação do acetoacetato de etila na posição α em relação ao grupo carbetóxi utilizamos processo de síntese descrito na literatura (Antonioletti *et al.*, 1992), através de hidróxido de lítio monoidratado em THF com adição de brometo de alila. Esta metodologia pode ser amplamente aplicável, pois opera em condições simples e brandas, utiliza volumes reduzidos de solvente e os reagentes têm baixo custo e são facilmente disponíveis. O rendimento de 2-acetil-pent-4-enoato de etila monoalquilado foi muito bom (79 %), coincidente com o valor relatado na literatura. O β -cetoéster- α -alquilado pode ser confirmado através do espectro de RMN ^1H (**espectro 1**). Os prótons do carbono 7 absorvem na forma de tripleto a 2,60 ppm. Os prótons do carbono 3 absorvem na forma de tripleto a 3,52 ppm.

Marvel e Hager (1941) relatam metodologia alternativa para obtenção deste dicarbonílico através de etóxido de sódio em etanol e brometo de alila, a qual tem sido utilizada para preparação de outros produtos (Brandt *et al.*, 1991; Ferraz *et al.*, 1995). A proporção de produto monoalquilado e α -dialquilado- β -cetoéster tem mostrado equivalência quando comparada à metodologia utilizando hidróxido de lítio monoidratado.

Braibante e colaboradores (1990) realizaram estudo comparativo entre suportes sólidos (alumina e montmorillonita) para obtenção de β -enaminoésteres e enaminocetonas através de ultrassom, verificando bons rendimentos dos produtos. Com base nestes dados, β -enaminoésteres foram preparados, primeiramente, a partir de 2-acetil-pent-4-enoato de etila e amina primária em peneira molecular (MS-5Å) mantidos em ultrassom (**item 3.2.2, método 1**). De forma geral, esta metodologia comporta vantagens, pois a síntese é facilmente reproduzida, amena e à temperatura ambiente, os reagentes envolvidos são baratos, a manipulação é simples e a conversão nos produtos é bastante satisfatória. Porém, reação realizada com amina menos nucleofílica, como a anilina, necessitou de tempo

extenso de reação e promoveu conversão de cerca de 46% dos materiais de partida. β -enaminoéster (**4**) foi identificado e caracterizado por RMN ^1H . O produto foi observado e comparado ao espectro do material de partida, verificando-se que o próton do carbono 7 do 2-acetil-pent-4-enoato de etila (**espectro 1**) é um tripleto na região de 2,56 ppm, contudo, este próton tem multiplicidade modificada no β -enaminoéster (**espectro 3**), absorvendo em campo mais baixo (3,06 ppm), na forma de dubleto. A absorção do próton desprotegido do nitrogênio é presente na região de 11 ppm, confirmando a formação do produto desejado, porém com conversão, notadamente, baixa (**tabela IV.3**).

4.4.2- PREPARAÇÃO DE (2Z)-2-[1-(FENILAMINO)ETILIDENO]PENT-4-ENOATO DE ETILA ATRAVÉS DE MICROONDAS E ULTRASSOM

Enaminocetonas podem ser preparadas em poucos minutos com bons rendimentos a partir de β -dicetonas com várias aminas e aminoésteres através de montmorillonita ou sílica sob irradiação de microondas (Rechsteiner *et al.*, 1993).

Varma e colaboradores (1997) mostraram que reações de aminas primárias e secundárias com aldeídos e cetonas são substancialmente aceleradas pelas microondas na ausência de solvente.

Diversas reações orgânicas têm sido realizadas com segurança em forno de microondas doméstico, sem qualquer tipo de adaptação (Bose *et al.*, 1993; Sadicoff *et al.*, 2000). Deveras, várias reações clássicas podem ser aceleradas quando o aquecimento for realizado em forno de microondas ao invés de aquecimento convencional, pois tal aceleração resulta de interações entre o material e as ondas, conduzindo a efeitos térmicos (podendo ser facilmente estimados pela aferência da temperatura) e efeitos específicos (não puramente térmicos) (Perreux, Loupy, 2001).

Através destes dados literários, metodologia alternativa foi avaliada com intuito de melhorar a conversão reacional para obtenção do intermediário (**4**). Anilina (**3**) foi submetida à reação com 2-acetil-pent-4-enoato de etila (**2**), através de suporte sólido

(Al₂O₃) sob irradiação de microondas, já que a anilina é amina aromática necessária para obtenção do anel quinolínico funcionalizado. As condições reacionais foram diversificadas com o intuito de otimizar a preparação do β-enaminoéster (**tabela III.1**). Para tal, recipientes, concentração de reagentes, tempo reacional, potência do aparelho de microondas e tipo de Al₂O₃ (ácida ou neutra) foram variados. Os recipientes foram variados entre tubos de ensaio de pyrex para abrigar os reagentes e recipientes cilíndricos de teflon. Ao utilizarmos tubo de ensaio de pyrex, variando o tempo e potência, observamos traços de amida, comprovados através de espectro de RMN ¹H (dados não mostrados). Porém, com o uso de teflon, a formação de amida ocorreu em proporção muito menor. Isto se deve pela temperatura no tubo de ensaio de pyrex ser muito elevada, pois a perda dielétrica, ou a eficiência de conversão de radiação eletromagnética em calor do vidro é de $1,7 \cdot 10^{-2}$, enquanto do teflon é de $3,0 \cdot 10^{-4}$, indicando que o teflon apresenta aquecimento reduzido em relação ao pyrex quando irradiado pelas microondas (Sadicoff *et al.*, 2000). Dentre todas as condições efetuadas, a aplicada para a reação **R9** (**tabela III.1**) foi a mais satisfatória, segundo análise realizada em RMN ¹H, apresentando conversão de 55% em (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila.

Estudos realizados com relação à influência da temperatura para obtenção de enaminas (Hauser, Reynolds, 1948) relataram que temperaturas elevadas podem fazer com que ocorra adição nucleofílica ao carbono do éster com eliminação de etanol dando amida, ao invés de ocorrer adição nucleofílica ao carbono da cetona do β-cetoéster com eliminação de água para render enamina. Desta forma, a ciclização da amida levaria à 2-hidroxi-3-alil-4-metil-quinolina e não à 4-hidroxiquinolina desejada em nosso estudo. Neste sentido, como verificamos a formação de amida em certas reações, recorreremos a metodologias alternativas para dar continuidade à preparação de enamina (**esquema IV.1**).

ESQUEMA IV.1

Outrossim, em relação às duas metodologias avaliadas pudemos observar certa regioseletividade das reações de β -cetoéster e anilina realizadas no ultrassom e a ausência de regioseletividade das realizadas no aparelho de microondas, pois nestas constatamos formação de amida, comprovada por espectros de RMN ^1H (dados não mostrados). Porém, a conversão no β -enaminoéster foi maior nas reações realizadas no aparelho de microondas que nas realizadas no ultrassom. Por conseguinte, nova metodologia foi avaliada, objetivando melhores rendimentos (**item 3.2.2, método 3**).

4.4.3- PREPARAÇÃO DE (2Z)-2-[1-(FENILAMINO)ETILIDENO]PENT-4-ENOATO DE ETILA (4) ATRAVÉS DE AQUECIMENTO

Devido à dificuldade de obtenção da enamina (4), ocasionada pela baixa conversão e baixo rendimento, metodologia alternativa foi avaliada. Para tal, 2-acetil-pent-4-enoato de etila (2) foi submetido à reação com anilina (3) em peneira molecular (5Å), sob aquecimento convencional, em temperaturas variadas. Através dos ensaios prévios, corroborou-se que a temperatura de 60 °C deveria ser preservada, evitando-se formação de amida. Esta metodologia mostrou-se a mais promissora dentre todas avaliadas em nosso estudo, pois a conversão dos reagentes foi entre 78-85%, além de ser muito simples. As condições reacionais da reação **R16** foram mantidas para obtenção do composto 4, utilizando excesso de 100% de amina aromática (3) em relação ao β -cetoéster (2), tempo reacional de 24h, 1,0g de peneira molecular e temperatura de 60°C.

A formação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila (4) foi comprovada através de espectro de RMN ^1H (**espectro 3**), onde os prótons do carbono 7 absorvem na forma de dubleto em 3,06 ppm e o próton do nitrogênio absorve como singlete na região de 11,06 ppm.

4.4.4- PREPARAÇÃO DE 3-ALIL-2-METILQUINOLIN-4-OL (5)

A enamina bruta (4) (Hauser, Reynolds, 1948; Price, Roberts, 1946) foi submetida à ciclização de Friedel-Crafts (Goulds, Jacobs, 1939; Hauser, Reynolds, 1948; Price, Roberts,

1946; Reynolds, Hauser, 1955a; Reynolds, Hauser, 1955b), utilizando difeniléter a 250 °C, formando 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina. Através do espectro de RMN ^1H pudemos constatar traços de anilina, a qual foi facilmente removida através de aquecimento em bomba de alto vácuo. Então, 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (5) foi obtida pura, em bom rendimento, sem necessidade de recristalização. A estrutura pode ser constatada através do espectro de RMN ^1H (**espectro 4**), pois os prótons do carbono 12 absorvem na forma de dubleto em 3,18 ppm, os prótons do carbono 13 absorvem na forma de duplo duplo tripleto, na região de 5,73 ppm e os prótons do carbono 14 absorvem na forma de dois dubletos, sendo um próton *cis*, em 4,81 ppm (9,3 Hz) e outro *trans*, em 4,86 ppm (15,2 Hz), confirmando o grupamento alila. O próton do oxigênio absorve como singlete na região de 11,37 ppm e, os prótons aromáticos são claramente visíveis no espectro em questão. A pureza foi corroborada através de ponto de fusão e a caracterização do composto foi ressaltada pelos espectros de RMN ^{13}C , massas e IV. Através do espectro de massas (**espectro 6**), podemos verificar o fragmento de razão massa/ carga 184, correspondendo à perda de um grupo metila. O fragmento de razão massa/ carga 77 justifica a presença do anel benzeno na molécula. O espectro de IV (**espectro 7**) mostra a deformação axial pronunciada em 3446 cm^{-1} , proveniente da função hidroxila presente na posição 4 do anel quinolínico, caracterizando a hidroxiquinolina.

4.4.5- PREPARAÇÃO DE 3-ALIL-4-CLORO-2-METILQUINOLINA (6)

Compostos haloquinolínicos têm sido extensivamente utilizados em síntese orgânica de antimaláricos como intermediários importantes para obtenção de 4-alquilaminoquinolínicos (Price *et al.*, 1947; Kaschula *et al.*, 2002; Stocks *et al.*, 2002).

O desenvolvimento metodológico para a obtenção de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina (6) foi baseado em procedimento relatado na literatura (Riegel *et al.*, 1946), com a síntese a partir de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (5), através de substituição da hidroxila pelo cloro, conferida pelo POCl_3 , o qual tem função de reagente e solvente na reação. Um dos métodos de purificação da 4-cloroquinolina foi através de filtração em coluna de sílica gel, utilizando-se acetato de etila como eluente para retirada de subprodutos e, posterior

eluência de metanol, sendo retirado o produto desejado. Nesta purificação, o composto apresentou-se como substância extremamente pastosa, com coloração negra. A possibilidade de recristalização não foi ignorada, pelo contrário, todos os testes de solubilidade foram realizados e a tentativa de recristalização foi efetuada, neste momento, porém não obtivemos sucesso devido à quantidade do composto ser pouca.

Quando preparou-se o composto (6) em maior quantidade, partindo-se de 10 mmols de (5), 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina (6) foi obtido puro, na forma de pó amorfo marrom claro. O ponto de fusão foi efetuado, confirmando a pureza do produto.

A molécula pode ser caracterizada pela análise espectrométrica de RMN ^1H (**espectro 8**) através dos prótons do carbono 12, os quais absorvem como dubleto, em campo mais baixo que os prótons da hidroxiquinolina, na região de 3,86 ppm, apresentando maior desproteção ocasionada pelo cloro. Da mesma forma, o próton aromático do carbono 5 apresenta-se mais desprotegido, absorvendo como dubleto em 9,06 ppm, diferentemente da hidroxiquinolina, com absorção deste próton em 7,95 ppm. Todos os carbonos foram identificados (**espectro 9**) e o produto foi confirmado através de espectro de massas (**espectro 10**), cujo íon molecular com razão massa/ carga 217 apresentou intensidade relativa de 100 %. A presença de um átomo de cloro foi evidenciada pelo pico do isótopo $M+2$, com razão massa/carga de 219, apresentando intensidade relativa de 31,47 %, condizente com a literatura (Silverstein *et al.*, 1994). A contribuição mais relevante do espectro de IV (**espectro 11**) foi com relação à presença de deformação axial na região de 1.092 cm^{-1} , caracterizando a ligação C-Cl, estando o cloro em posição *para* ao anel, de acordo com dados obtidos na literatura (Silverstein *et al.*, 1994).

4.4.6- PREPARAÇÃO DE ETIL (2Z,4E)-2-(1-ANILINOETILIDENO)-5-FENILPENT-4-ENOATO (10)

A preparação de (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila (9) foi efetuada visando à obtenção de etil (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato (10). O β -cetoéster empregado na preparação da enamina, o 2-acetil-4E-5-fenilpent-4-enoato de etila (9), foi preparado utilizando metodologia descrita por Antonioletti e colaboradores

(1992). Para tal, previamente, o agente alquilante foi preparado a partir de álcool cinâmico e tribrometo de fósforo (PBr_3), conforme metodologia descrita na literatura (Mori, 1973) (**esquema IV.2**).

ESQUEMA IV.2

A obtenção do brometo de cinamila (8) foi corroborada através de espectro de RMN ^1H e ^{13}C . Os prótons (**espectro 12**) do carbono 1 absorvem como dubleto, em campo mais baixo quando comparados aos do álcool cinâmico, na região de 4,16 ppm, devido à desproteção conferida pelo bromo.

A alquilação do acetoacetato de etila com brometo cinâmico (Antonioletti *et al.*, 1992) rendeu o 2-acetil-4E-5-fenilpent-4-enoato de etila (9) em 64 %, aproximadamente. O composto pode ser confirmado através de espectro de RMN ^1H (**espectro 14**), pois o próton do carbono 3 absorve como tripleto em 3,59 ppm e, os prótons do carbono 7 absorvem na forma de dubleto em 2,75 ppm. O grupo cinamil é evidente, dado que o próton do carbono 8 absorve como duplo tripleto em 6,12 ppm, apresentando valores diferentes para a constante de acoplamento, sendo esta 15,7 Hz quando acopla com o próton *trans* do carbono 9 e 7,2 Hz quando acopla com os prótons do carbono 7. O próton do carbono 9 absorve na forma de dubleto em 6,46 ppm, apresentando valor para a constante de acoplamento de 15,7 Hz devido o próton *trans* do carbono 8. Os prótons aromáticos apresentam-se como multipeto na região de 7,18 a 7,33 ppm.

A enamina (2*Z*,4*E*)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila (**10**) foi obtida a partir de adição nucleofílica do grupo amino da anilina ao carbono da cetona do 2-acetil-4*E*-5-fenilpent-4-enoato de etila (**9**) em peneira molecular (5Å) sob aquecimento convencional à temperatura de 60°C, apresentando conversão de 89%, aproximadamente. A enamina foi constatada através de espectro de RMN ¹H (**espectro 16**), pois os prótons do carbono 7 absorvem como dubleto em 3,22 ppm e o próton do nitrogênio absorve, na forma de singlete, na região de 11,10 ppm. Uma vez sintetizada a enamina, nossa pesquisa teve prosseguimento, no sentido de prepararmos 2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (**11**) e, posteriormente, 4-cloro-2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolina (**12**).

4.4.7- PREPARAÇÃO DE 2-METIL-3-[(2*E*)-3-FENILPROP-2-ENIL]QUINOLIN-4-OL (**11**)

A preparação do composto **11** foi realizada segundo dados obtidos na literatura (Gould, Jacobs, 1939; Hauser, Reynolds, 1948; Price, Roberts, 1946; Reynolds, Hauser, 1955a; Reynolds, Hauser, 1955b). Partindo-se de material bruto (**10**), a termociclicização foi realizada através de difeniléter. O produto foi recristalizado de hexano e etanol, na proporção de 2:1 e a pureza do composto foi constatada através de ponto de fusão. Através de espectro (**espectro 17**) de RMN ¹H identificou-se o próton 12, o qual absorve em 3,35 ppm. A configuração *trans* da molécula pode ser confirmada por meio da constante de acoplamento de 16 Hz entre os prótons 13 e 14 da olefina. A hidroxila pode ser corroborada através do pico em 11,43 ppm. A molécula foi ainda identificada e caracterizada através de espectros de RMN ¹³C, massas e IV. No espectro de massas (**espectro 19**) o fragmento de razão massa/ carga 184, corresponde à perda de grupo metila e grupo fenila. O espectro de IV (**espectro 20**) evidencia a presença de grupo hidroxila através da deformação axial em 3.456 cm⁻¹.

4.4.8- PREPARAÇÃO DE 4-CLORO-2-METIL-3-[(2*E*)-3-FENILPROP-2-ENIL]QUINOLINA (**12**)

O composto **12** foi preparado utilizando-se metodologia relatada na literatura (Riegel *et al.*, 1946). A substituição da hidroxila pelo cloro na posição 4 do anel quinolinico causou o mesmo efeito que o descrito para 2-metil-3-alil-4-cloroquinolina em

relação ao composto 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina. No espectro de RMN ^1H (**espectro 21**) pode-se observar a desproteção do próton do carbono 5 provocada pelo cloro, já que este absorve em 8,26 ppm, enquanto no composto **11** este mesmo próton absorve na região de 7,99 ppm. O cloro também promove desproteção na porção da cinamila, pois o próton 12 absorve na região de 3,94 ppm e no composto **11**, em 3,35 ppm. A configuração da molécula é *trans*, devido à constante de acoplamento entre os prótons 13 e 14 ser 15,9Hz.

A pureza do composto foi verificada pelo ponto de fusão e a molécula foi corroborada através do espectro de RMN ^{13}C (**espectro 22**), onde todos os carbonos estão presentes. O espectro de massas (**espectro 23**) mostra o íon molecular de intensidade relativa igual a 31,76 % com razão massa/ carga de 293 e o isótopo M+2, com razão massa/ carga de 295 e intensidade relativa de 8,78 %, correspondente a um átomo de cloro, presente na molécula. O espectro de IV (**espectro 24**) mostra a deformação axial da ligação C-Cl em 1.076 cm^{-1} , onde Cl está em *para* em relação ao anel.

4.5- DISCUSSÃO DAS AVALIAÇÕES BIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA

Compostos quinolínicos sintetizados (**TABELA IV-26**) foram avaliados *in vitro* contra cepa de *P. chabaudi*, sendo sulfato de cloroquina, o controle de sensibilidade. Cepas de roedores como AJ de *P. chabaudi* vêm sendo amplamente estudadas como um método *in vitro* rápido e sensível para avaliação e triagem de novos compostos. A toxicidade dos compostos foi avaliada através da Concentração Efetiva em 50% em macrófagos peritoneais coletados de camundongos BALB/c (**TABELA IV-27**).

O resultados demonstraram significativa atividade antiparasitária *in vitro* de todos os compostos quinolínicos sintetizados neste estudo. Através dos dados obtidos da Concentração Efetiva 50% em formas intraeritrocíticas do *P. chabaudi* AJ, verificamos que o composto **12** apresentou-se, aproximadamente, 2,78 vezes menos ativo que o fármaco controle, sulfato de cloroquina. A avaliação da citotoxicidade demonstrou que o composto **12** apresentou toxicidade contra células de mamíferos bastante similar à cloroquina, sugerindo assim menor efetividade, quando comparada ao fármaco padrão.

Nossos resultados demonstraram que o composto **11** mostrou-se o mais ativo dentre todos os compostos sintetizados, com atividade 1,13 vezes maior que a cloroquina contra as formas intraeritrocíticas do parasita. A avaliação de sua toxicidade em células de mamíferos sugere um composto bastante promissor por apresentar-se cerca de 1,69 vezes menos tóxico para os macrófagos em relação ao fármaco padrão, sulfato de cloroquina. O índice de seletividade, definido como a razão entre atividade toxicológica e atividade antiparasitária apresentada pelo composto, mostrou valor de 280. Tal resultado elucida o composto **11** como 2 vezes mais letal para o parasito que para a célula de mamífero, quando comparado ao sulfato de cloroquina.

Apesar de o composto **6** apresentar CE_{50} de aproximadamente 66,29 menor que aquela verificada para o sulfato de cloroquina contra o *P. chabaudi*, sua toxicidade manteve equiparada ao fármaco padrão, sugerindo assim que possíveis modificações em sua estrutura poderiam contribuir para um aumento de sua atividade antiparasitária.

Dentre todos os compostos avaliados, o composto **5** apresentou a menor toxicidade, além de proporcionar uma CE_{50} cerca de 2,87 vezes maior que o fármaco padrão sulfato de cloroquina, confirmando sua baixa atividade tóxica. Apesar destes dados, a avaliação da atividade antiparasitária demonstrou que o composto **5** apresentou cerca de 61 vezes menos ativo que o sulfato de cloroquina, sugerindo que a modificação da estrutura resultou na diminuição da atividade contra o parasita.

Os resultados biológicos obtidos sugerem contribuições diferentes promovidas pelos substituintes dos derivados quinolínicos, dado pelo grupo hidroxila em relação ao cloro e grupo cinamila em relação ao alila. Os derivados hidroxilados na posição 4 do anel quinolínico foram mais efetivos que os derivados clorados na posição 4, tendo mesmo substituinte na posição 3. Assim, efetividade pronunciada e baixa toxicidade foram verificadas para o composto **11**, substituído por grupo cinamila na posição 3 do anel e grupo hidroxila, na posição 4. Já, o derivado clorado **12** foi, aproximadamente, 3 vezes menos efetivo que o composto **11**.

4.6- DISCUSSÃO DO ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR

Breve discussão encontra-se descrita neste item baseada no estudo de modelagem molecular arrolado no **Apêndice**.

O estudo de modelagem molecular corroborou a avaliação da importância da natureza e posição dos substituintes no anel quinolínico para a atividade antimalárica, pois mostraram atrelamento de aspectos estérico, eletrônico e lipofílico.

Os confômeros de menor energia mínima de **5** e **11** apresentaram interação eletrostática entre o hidrogênio da hidroxila e os carbonos da dupla ligação, conduzindo à maior estabilidade conformacional, ressaltando a orientação da cadeia lateral como aspecto estérico relevante. Nos confômeros **6** e **12**, as cadeias laterais afastaram-se devido ao tamanho e à característica rica em elétrons do átomo de cloro.

Através dos mapas de potencial eletrostático (MEPs), tornou-se evidente a densidade eletrônica extensa nas regiões do anel quinolínico de **5** e **11**, comparada às regiões de **6** e **12**, possivelmente dada pelo efeito doador de elétrons da hidroxila. Maior densidade eletrônica foi observada sobre a cadeia lateral contendo grupo cinamila. Portanto, além da presença do anel quinolínico, o grupo cinamila poderia ser sítio adicional de interação do composto com o receptor, possivelmente, com o grupo heme.

Os mapas dos orbitais moleculares de HOMO e LUMO de **5**, **6**, **11** e **12** confirmaram a presença do anel quinolínico como requisito para atividade antimalárica, visto que a distribuição de superfícies orbitales mostrou-se igual à observada na cloroquina. Contribuição secundária do grupo cinamila foi verificada, confirmando as observações nos MEPs e valores de energia de orbitais moleculares HOMO e LUMO.

Através dos MLPs e avaliação Clog P frente à CE_{50} , o aspecto lipofílico despertou característica curiosa. O composto **11** pareceu assumir valor de lipofilicidade ótimo, próximo ao de cloroquina, contribuindo favoravelmente para atividade antimalárica.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1- CONCLUSÕES

- A otimização para preparação de (2Z)-2-[1-(fenilamino)etilideno]pent-4-enoato de etila requereu longo tempo de pesquisa, com intuito de corroborar a melhor metodologia. Condições reacionais diversas foram avaliadas, incluindo temperatura, suporte sólido e tempo de conversão. Dentre todas, a metodologia através de aquecimento convencional foi mais eficaz devido à maior conversão no produto desejado e menor possibilidade de formação de amida. Para tal, a temperatura ideal de 60 °C e duração reacional de 24 horas foram condições padronizadas.
- A substância 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (**5**) foi obtida com bons rendimentos, entre 67 a 75%, constituindo o primeiro objetivo alcançado no trabalho. Esta foi submetida à avaliação biológica apresentando CE_{50} de 7,722 µg/mL e toxicidade baixa de 53,45 µg/mL.
- A cloração de 3-alil-2-metilquinolin-4-ol (**5**) rendeu 95% de 3-alil-4-cloro-2-metilquinolina (**6**). Este composto apresentou baixo índice de seletividade (2,27) e mostrou-se, aproximadamente, 2 vezes menos efetivo em relação ao seu derivado hidroxilado (**5**).
- A enamina intermediária (2Z,4E)-2-(1-anilinoetilideno)-5-fenilpent-4-enoato de etila foi preparada através de aquecimento convencional, mantendo-se a temperatura de 60 °C a fim de evitar a adição nucleofílica da amina aromática no carbono carbonílico da função éster. A partir desta, 2-metil-3-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]quinolin-4-ol (**11**) foi obtida em 43 a 56 % de rendimento. As avaliações *in vitro* corroboraram no composto mais eficaz, sendo 1,13 vezes mais efetivo que cloroquina, de baixa toxicidade e maior índice de seletividade (280), contra 146,84 para cloroquina.

- 4-cloro-2-metil-3-[(2*E*)-3-fenilprop-2-enil]quinolina (**12**) apresentou rendimento entre 70 a 75%. Mostrou-se, aproximadamente, 3 vezes menos ativo nos ensaios *in vitro* contra *P. chabaudi* que o derivado (**11**) e que cloroquina e, ainda, mais tóxico que cloroquina para macrófagos peritoneais.
- O estudo de modelagem molecular culminou para o entendimento da contribuição dos substituintes em relação à atividade antiplasmodica *in vitro*. Mediante resultados obtidos da avaliação de aspectos estéricos e eletrônicos constatou-se maior estabilidade conformacional nos confômeros de menor energia mínima de **5** e **11**, promovida pela orientação da cadeia lateral e densidade eletrônica extensa nas regiões do anel quinolínico, possivelmente ocasionada pela hidroxila, grupo doador de elétrons. Ainda, através dos mapas de orbitais moleculares de HOMO e LUMO, a presença do anel quinolínico foi requisito confirmado para atividade antimalárica de **5**, **6**, **11** e **12**, apresentando distribuições de superfícies orbitales iguais à da cloroquina. O grupo cinamila conferiu contribuição secundária, podendo ser sítio de interação adicional com o receptor, acreditado ser grupo heme. Por fim, o aspecto lipofílico corroborou em valor de lipofilicidade ótimo, quantificado para o composto **11**, próximo ao de cloroquina.
- A modelagem molecular foi estudo fundamental realizado, explicando a contribuição dos substituintes para a atividade antimalárica e direcionando os estudos futuros. A presença do anel quinolínico foi considerada requisito para atividade antimalárica, favorecida pelo grupo hidroxila, possuindo efeito doador de elétrons e associada ao grupo cinamila, também rico em elétrons e que apresenta valor de lipofilicidade ótimo para atividade.
- O composto **11**, considerado promissor, foi submetido à avaliação prévia contra leishmaniose, apresentando atividade antiparasitária. Os testes serão refeitos, pelo Dr. André Gustavo Tempone, para confirmação dos resultados e, por isso, não foram divulgados neste estudo.

5.2- PERSPECTIVAS

- Estudo de modelagem molecular será realizado com intuito de verificar possível interação com grupo heme e de confirmar a hipótese proposta, fundamentando o planejamento de outros derivados quinolínicos.
- Avaliação biológica *in vitro* do composto **11** contra cepa resistente à cloroquina é fundamental para continuidade dos estudos, pois acredita-se que os parasitos resistentes assumem características estruturais distintas dos sensíveis e modificam as condições fisiológicas do vacúolo digestivo intra-eritrocítico, dificultando a ação dos fármacos existentes.
- Avaliação do composto **11** *in vivo* contra *Plasmodium sp* também faz-se necessária, com intuito de verificar a atividade e se a substância pode ou não ser biotransformada a metabólito inativo ou tóxico. Desta forma, novas pesquisas poderão ser realizadas, corrigindo-se efeitos indesejáveis e, ainda planejando-se novas moléculas potencialmente ativas contra o *Plasmodium sp*, causador da malária.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, S. An expedient and high yielding synthesis of mefloquine via fluoride ion-catalyzed Wittig rearrangement I. *Tetrahedron*, Oxford, v.45, n.5, p.1409-1414, 1989.
- ADEROUNMU, A.F. *In vitro* assessment of the antimalarial activity of chloroquine and its major metabolites. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.78, n.6, p.581-585, 1984.
- ALECRIM, M.G.C. Resistance to *in vivo* and *in vitro* chemotherapies in the Brazilian Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.81, suppl. 2, p.153-157, 1986.
- ALLISON, J.L., O'BRIEN, R.L., HANHN, F.E. DNA: reaction with chloroquine. *Science*, London, v.149, 3688, p.1111-1113, 1965.
- ALVES, M.J.C.P., RANGEL, O., SOUZA, S.S.A.L. Malaria in region of Campinas, São Paulo, 1980 to 1994. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.*, Uberaba, v.33, n.1, p.53-60, 2000.
- ANTONIOLETTI, R., BONADIES, F., ORELLI, L.R., SCETTRI, A. Selective C-alkylation of 1,3-dicarbonyl compounds. *Gazzeta Chim. Ital.*, v.122, p.237-238, 1992.
- ARONSON, P.S. Kinetic properties of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger. *Annu. Rev. Physiol.*, Palo Alto, v.47, p.545-560, 1985.
- ATAMNA, A.A., GINSBURG, H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Sannon, v.61, n.2, p.231-241, 1993.

- AYAD, F., TILLEY, L., DEADY, L.W. Synthesis antimalarial activity and inhibition of haem detoxification of novel bisquinolines. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, Amsterdam, v.11, n.16, p.2075-2077, 2001.
- BANGCHANG, K.N., KARBWANG, J., BACK, D.J. Mefloquine mertabolism by human liver microsomes. Effect of other antimalarial drugs. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.43, n.9, p.1957-1961, 1992.
- BANNISTER, L.H., HOPKINS, J.M., FOWLER, R.E., KRISHNA, S., MITCHELL, G.H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, p. 427-433, 2000.
- BANYAL, H.S., FITCH, C.D. FPIX binding studies and the mode of action of chloroquine against malaria. *Life Sci.*, New York, v.31, n.11, p.1141-1144, 1982.
- BARALDI, P. SIMONI, D., MANFREDINI, S. An improved preparation of enamminones from 1,3-diketones and ammonium acetate or amine acetates. *Synth. Commun.*, New York, p.902-903, 1983.
- BARLIN, G.B., JIRAVINYU, C., BUTCHER, G.A., KOTECKA, B. RIECKMANN, K. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of some Mannich bases derived from 4-(7'-trifluoromethyl-1'-5'-naphthyridin-4'-ylamino) phenol, 2-(7'-trifluoromethyl-quinolin-4'-ylamino) phenol, and 4'-chloro-5-(7''-trifluoromethylquinolin-4''-ylamino) biphenyl-2-ols. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.86, n.4, p.323-331, 1992.

BARNET, W. SOHN, W.H. β -lactones as kinetic products in the iodolactonization reaction.

J. Chem. Soc. Chem. Commun., Cambridge, p.472, 1972.

BARREIRO, E.S., MANSSOUR, C.A.F. *Química Medicinal*. Porto Alegre: ARTEMED,

2001. 243p.

BARROSO, W.J. Malária: a crise global. *Infarma*, São Paulo, v.12, n.5/6, p.73-76, 2000.

BARTOLI, G., BOSCO, M., MARCATONI, E., PETRINI, M., SAMBRI, L.,

TORREGIANI, E. Conjugate addition of amines to alpha, beta-enones promoted by

CeCl₃ center dot 7H(2)O-NaI system supported in silica gel. *J. Org. Chem.*,

Washington, v.66, n.26, p.9052-9055, 2001.

BENDRAT, K., BERGER, B.J., CERAMI, A. Haem polymerization in malaria. *Nature*,

London, v.378, n.6553, p.138-139, 1995.

BEUGELMANS, R., BOIS-CHOUSSY, M., GAYARL, P., RIGOTHIER, M.C. Synthèse

par SRN¹ et evaluation de l' activité amoebicide de nouveaux derives quinoléiniques.

Chem. Rev., Washimngton, v.81, n.4, p.415-430, 1981.

BEUGELMANS R.; BOIS-CHOUSSY M.; GAYRAL, P.; RIGOTHIER, M.C. Synthèse

para SRN¹ et evaluation de l' activité amoebicide de nouveaux derives quinoléiniques.

Eur. J. Med. Chem. Paris, v.23, n.5, p.539-546, 1988.

- BIOT, C., DELHAES, L., MACIEJEWSKI, L.A., MONTUAIRE, M., CAMUS, D., DIVE, D., BROCARD, J.S. Synthetic ferrocenic mefloquine and quinine analogues as potential antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, Paris, v.35, n.7-8, p.707-714, 2000.
- BLACKMAN, M.J. Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr. Drug Targets*, Netherlands, v.1, p.59-83, 2000.
- BLACKMAN, M.J., FUJIOKA, H., STAFFORD, W.H.L.. A subtilisin-like protein in secretory organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.273, n.36, p.23398-23409, 1998.
- BOGER, D. L., ISHIZAKI, T., WYSOCKI, J. R. J., MUNK, S. A., KITOS, P. A., SUNTORNWAT, O. Total synthesis and evaluation of (+/-)-*n*-(tert-butyloxycarbonyl)-CBI, (+/-)-CBI-CDPII, and (+/-)-CBI-CDPI2-CC-1065 functional agents incorporating the equivalent 1,2,9,9A-tetrahydroclprop(1,2-C)benz(1,2-E)indol-4-one (CBI) left-hand subunit. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.111, n.16, p.6461-6463, 1989.
- BOSE, A.K., BANIK, B.K., BARAKAT, K.J., MANHAS, M.S. Microwave-induced organic-reaction enhancement (more) chemistry. 5. Simplified rapid hydrogenation under microwave irradiation-selective transformations of beta-lactams. *Synlett*, Stuttgart, n.8, p.575-576, 1993.
- BOSIA, A., GHIGO, D., TURRINI, F., NISSANI, E., PESCARMONA, G.P., GINSBURG, H. Kinetic characterization of Na^+/H^+ antiport of *Plasmodium falciparum* membrane. *J. Cell. Physiol.*, New York, v.154, n.3, p.527-534, 1993.

- BOULARD, Y., LANDAU, I., MILTGEN, F., ELLIS, D.S., PETERS, W. The chemotherapy of rodent malaria, XXXIV. Causal prophylaxis part III: ultrastructural changes induced in exoerythrocytic schizonts of *Plasmodium yoelii yoelii* by primaquine. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.77, n.6, p.555-568, 1983.
- BOULOS, M., DI SANTI, S.M., BARATA, L.C.B. Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.81, suppl.2, p.255-257, 1986.
- BRAGA, E.M., FONTES, C.J.F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 10ed. São Paulo. Atheneu, 2000. cap.17, p.128-146.
- BRAIBANTE, M. E. F., BRAIBANTE, H. T. S., SALVATORE, S. J. S. Síntese de enamino compostos utilizando suportes sólidos. *Quim. Nova*, São Paulo, v.13, n.1, p.67-68, 1990.
- BRANDT, C.A., COMASSETO, J.V., FERRAZ, H.M.C. Ciclofuncionalizações envolvendo reagentes de enxofre, selênio e telúrio. *Quim. Nova*, São Paulo, v.14, n.3, p.165-174, 1991.
- BRAY, P.G., HAWLEY, S.R., MUNGTHIN, M., WARD, S.A. Physicochemical properties correlated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.*, v.50, n.6, p.1559-1566, 1996.
- BRUCE-CHWATT, L.J. The social history of malaria in Europe. *Soc. Hist. Med. Bull.*, London, v.22, p.17-18, 1978.

- BRUECKNER, R.P., LASSETER, K.C., LIN, E.T., SCHUSTER, B.G. First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. *Am. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.58, n.5, p.645-649, 1998.
- BULLER, R., PETERSON, M.L., ALMARSSON, O., LEISEROWITZ, L. Quinoline binding site on malaria pigment crystal: a rational pathway for antimalaria drug design. *Crystal Growth Design*, Washington, v.2, n.6, p.553-562, 2002.
- BUTCHER, G.A. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.27, p.975-987, 1997.
- CABANTCHIK, Z.I. Altered membrane transport of malaria-infected erythrocytes: a possible pharmacologic target. *Blood*, Washington, v.74, n.5, p.1464-1471, 1989.
- CASTEEL, D.A. Antimalarials agents. In: WOLFF, M.E. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. v.5, cap.59, p.3-91.
- CHAVES, S.S., RODRIGUES, L.C. An initial examination of the epidemiology of malaria in the state of Roraima, in the brazilian Amazon basin. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v.42, n.5, p.42, 2000.
- CHEN, L. Recent studies on antimalarial efficacy of piperazine and hydroxypiperazine. *Clin. Med. J.*, v.104, p.161-163, 1991.
- CHEN, Q., SCHLICHThERIE, M., WAHIGREN, M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.13, p.439-450, 2000.

- CHITNIS, C.E., BLACKMAN, M.J. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol. Today*, v. 16, p.411-415, 2000.
- CHOU, A.C, FITCH, C.D. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.195, n.1, p.422-427, 1993.
- CHURCHILL, F.C., PATCHEN, L.C., CAMPBELL, C.C., SCHWARTZ, I.K., NGUYEN-DINH, P., DICKINSON, C.M. Amodiaquine as a produg: importance of metabolite (s) in the antimalarial effect of amodiaquine in humans. *Life Sci.*, New York, v.36, n.1, p.53-62, 1985.
- CLARK, I.A., VIRELIZIER, J.L., CARSWELL, E.A., WOOD, P.R. Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect. Immunol.*, Oxford, v.32, n.3, p.1058-1066, 1981.
- CLARK, I.A., SCHOFIELD, L. Pathogenesis of malaria. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.10, p.451-454, 2000.
- CLARKE, J.B., MAGGS, J.L., KITTERINGHAM, N.R., PARK, B.K. Detection of IgG antibodies in patients with adverse drug reactions to amodiaquine. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, Switzerland, v.95, n.4, p.1335-1342, 1990.
- COGSWELL, F.B., KROTOSKI, W.A., HOLLINGDALE, M.R., GWADZ, R.W. Identification of hypnozoites and tissue schizonts of *Plasmodium vivax* and *p. cynomolgi* by the imunoperoxidase method. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.32, n.16, p.1454-1455, 1983.
- COHEN, S.N., YIELDING, K. Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.240, n.7, p.3123-3131, 1965a.

- COHEN, S.N., YIELDING, K. Inhibition of RNA and DNA polymerase reactions by chloroquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, n.2, v.54, p.521-527, 1965b.
- COOKE, B.M. Molecular approaches to malaria: seeking the whole picture. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.10, p.407-408, 2000.
- COOKE, B.M., WAHLGREN, M., COPPEL R.L. Falciparum malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol. Today*, v. 16, p. 416-420, 2000.
- COATNEY, G.R. Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.12, n.2, p.121-128, 1963.
- COLLINS, W.E., JEFFERY, G.M. Primaquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.55, n.3, p.243-249, 1996.
- COOPER, R.D, MILHOUS, W.K., RIECKMAN, K.H. The efficacy of WR238605 against the blood stages of a chloroquine resistant strain of *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.*, London, v.88, n.6, p.691-692, 1994.
- CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J.P., CASALS, D., RITTMAN-GRAUER, L., BRIEDLER, J.L., MELAMED, M.R., BERTINO, J.R. Multi-drug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, Washington, v.86, n.2, p.695-698, 1989.

- COWMAN, A.F., BALDI, D.L., HEALER, J., MILLS, K.E., O'DONNELL, R.A., REED, M.B., TRIGLIA, T., WICKHAM, M.E., CRABB, B.S. Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Letters*, v. 476, p. 84-88, 2000.
- D'ALESSANDRO, U., BUTTIENS, H. History and importance of antimalarial drug resistance. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v.6, n.11, p.845-848, 2001.
- DANNHARDT, G.; BAUER, A.; NOWE, U. Non-steroidal anti-inflammatory agents. Part 23- Synthesis and pharmacological activity of enamminones which inhibit both bovine cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J. Prakt. Chem.*, Leipzig, v.340, n.3, p.256-263, 1998.
- DAVIS, T.M. Antimalarial drugs and glucose metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.44, n.1, p.1-7, 1997.
- DAY, N.P.J., HIEN, T.T., SCHOLLAARDT, T., LOC. P.P., CHUONG, L.V., CHAU, T.T., MAI, N.T., PHU, N.H., SINH, D.X., WHITE, N.J., HO, M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.180, n.4, p.1288-1297, 1999.
- DE, D., KROGSTAD, F.M., BYERS, L.D., KROGSTAD, D.J. Structure-activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *J. Med. Chem.*, Washington, v.41, n.25, p.4918-4926, 1998.

- DEADY, L.W., KAYE, A.J., FINLAY, G.J., BAGULEY, B.C., DENNY, W.A. Synthesis and antitumor properties of *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]carboxamide derivatives of fused tetracyclic quinolines and quinoxalines; A new class of putative topoisomerase inhibitors. *J. Med. Chem.*, Washington, v.40, n.13, p.2040-2046, 1997.
- DE DUVE, C., DE BARSY, T., POOLE, TROUET, A., TULKENS, P., VAN HOOF, F. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v.23, n.18, p.2495-2531, 1974.
- DEFREES, S.A., SAWICK, D.P., CUNNINGHAM, B., HEINSTEIN, P.F., MORRÉ, D.J., CASSADY, J.M. Structure-activity relationships of pyrimidines as dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.37, n.20, p.3807-3816, 1988.
- DEITSCH, K.W., WELLEMS, T.E. Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Shannon, v.76, n.1-2, p.1-10, 1996.
- DELAURE, S., GIRAULT, S., MAES, L., DEBREU-FONTAINE, M.A., LABAËD, M., GRELLIER, P., SERGHERAERT, C. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of new 4-anilinoquinolines. *J. Med. Chem.*, Washington, v.44, n.17, p.2827-2833, 2001.
- DIAS, R.S., FREITAS, A.C.C., BARREIRO, D.K., GOINS, D., NANAYAKKARA, J.D., Mc-CHESNEY, J.D. *Boll. Chim. Farmac.*, Milan, v.130, p.14, 2000.

- DONDONI, A.; PERRONE, D. 2- thiazolyl alpha-amino ketones- a new class of reactive intermediates for the stereocontrolled synthesis of unusual amino acids. *Synthesis*, Stuttgart, n.11, p.1162-1176, 1993.
- DORN, A., STOFFEL, R., MATILE, H., BUBENDORF, A., RIDLEY, R.G. Malarial haemozoin/ β -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature*, Paris, v.374, n.6519, p.269-271, 1995.
- DORN, A., VIPPAGUNTA, S.R., MATILE, H., BUBENDROF, A., VENERSTROM, J.L., RIDLEY, R.G. A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerization and an assessment of its initiation *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.55, n.6, p.737-747, 1998.
- DORN, A., VIPPAGUNTA, S.R., MATILE, H., JAQUET, C., VENERSTROM, J.L., RIDLEY, R.G. An assessment of drug-hematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalarials. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.55, n.6, p.727-736, 1998.
- DUBREMETZ J.F., GARCIA-RÉGUET, N., CONSEIL, V., FOURMAUX, M.N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.*, v. 28, p. 1007-1013, 1998.

DUTTA, G.P., PURI, S.K., BHADURI, A.P., SETH, M. Radical curative activity of a new 8-aminoquinoline derivative CDRI 80/53 against *P. cynomolgi* B in monkeys. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, Northbrook, v.41, n.6, p.635-637, 1989.

DUTRA, A.P. *Malária*. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto-malaria-pro.htm>. Acesso em: 03 abr. 2001.

ELDERFIELD, R.C., GENSLER, W.J., BEMBRY, T.H., KREMER, C.B., HEAD, J.D., BRODY, F., FROHARDT, R. Synthesis of 2-phenyl-4-chloroquiolines. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.68, n.7, p.1272-1276, 1946.

ELDERFIELD, R.C. The chemistry of quinoline. *Heter. Compounds*, John Wiley & Sons, v.4, p.2-145, 1952.

EGAN, T.J., ROSS, D.C., ADAMS, P.A. Quinoline antimalarial drugs inhibit spontaneous formation of β -haematin (malaria pigment). *FEBS Lett.*, Amsterdam, v.352, n.1, p.54-57, 1994.

EGAN, T.J., MAVUSO, W.W., ROSS, D.C., MARQUES, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.*, New York, v.68, n.2, p.137-145, 1997.

- EGAN, T.J., HUNTER, R., KASCHULA, C.H., MARQUES, H.M., MISPLON, A., WALDEN, J.C. Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of β -hematin formation and antiparasmodial activity. *J. Med. Chem.*, Washington, v.43, n.2, p.283-291, 2000.
- EKWEOZOR, C., ADERONMU, A.F., SODEINDE, O. Comparison of the relative *in vitro* activity of chloroquine and amodiaquine against chloroquine-sensitive strains of *P. falciparum*. *Annals Trop. Med. Parasitol.*, v.81, n.2, p.95-99, 1987.
- EL-SHOURA, S.M. *Falciparum* malaria in naturally infected human patients: VIII. Fine structure of intraerythrocytic asexual forms before and during chloroquine treatment. *Appl. Parasitol.*, Raipur, v.35, p.207-218, 1994.
- FAIRFIELD, A.S., MESHNICK, S.R., EATON, J.W. Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science*, v.221, n.4612, p.764-766, 1983.
- FAIRFIELD, A.S., ABOSCH, A., RANZ, A., EATON, J.W., MESHNICK, S.R. Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Shannon, v.30, n.1, p.77-82, 1988.
- FAMIN, O., GINSBURG, H. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.63, n.3, p.393-398, 2002.

- FERRAZ, H.M.C, PAYRET-ARRUA, M.E., OLIVEIRA, E. O., BRANDT, C. A. A new and efficient approach to cyclic β -amino-ketones by iodine-promote cyclization, *J. Org. Chem.*, Washington, v. 60, n.22, p. 7357-7359, 1995.
- FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P. *Farmacologia*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.116, p.1113-1119.
- FERREIRA, M.S., ALVARADO, C.A. Malária. In: VERONESI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8ed. Rio de Janeiro. Guanabara, 1991. cap.90, p.763-785.
- FITCH, C.D. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: a difference in the handling of ^{14}C -amodiaquine and ^{14}C -chloroquine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.3, n.5, p.545-548, 1973.
- FITCH, C.D., KANJANANGGULPAN, P. The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.262, n.32, p.15552-15555, 1987.
- FOLEY, M., TILLEY, L. Quinoline antimalarials mechanisms of action and resistance. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.27, n.2, p.231-240, 1997.
- FOLEY, M., TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.*, New York, v.79, n.1, p.55-87, 1998.
- FRANCIS, S.E., SULLIVAN, D.J.Jr., GOLDBERG, D.E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v.51, p.97-123, 1997.
- FREVERT, U., GALINSKI, M.R., HUGEL, F.U., ALLON, N., SCHREIER, H., SMULEVITCH, S., SHAKIBAEI, M., CLAVIJO, P. Malaria circumsporozoite protein

- inhibits protein synthesis in mammalian cells. *Embo J.*, Oxford, v.17, n.14, p.3816-3926, 1998.
- FUNASA. Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Disponível em: <http://funasa.gov.br/epi/malaria/malaria0.htm>. Acesso em: 17 set. 2002a.
- FUNASA. Malária. Situação atual da doença. Disponível em: http://funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/malaria/situacao_doenca.htm. Acesso em: 17 set. 2002b.
- FUNASA. Avaliação do plano de controle da malária. Disponível em: <http://funasa.gov.br/not/not316.htm>. Acesso em: 17 set. 2002c.
- FURST, D.E. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus*, London, v.5, S11-15, suppl.1, 1996.
- GAMAIN, B., LANGSLEY, G., FOURMAUX, M.N., TOUZEL, J.P., CAMUS, D., DIVE, D., SLOMIANNY, C. Molecular characterization of the glutathione peroxidase gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Shannon, v.78, n.1-2, p.237-248, 1996.
- GEARY, T.G., DIVO, A.A., JENSEN, J.B. Activity of quinoline containing antimalarials against chloroquine-sensitive and resistant strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.81, n.3, p.499-503, 1987.

- GEARY, T.G., BONANI, L.C., JENSEN, J.B., GINSBURG, H. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *P. falciparum* in culture. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.80, n.3, p.285-291, 1986.
- GHAJ, M., DUTTA, S., HALL, T., FREILICH, D., OCKENHOUSE, C.F. Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Molec. Biochem. Parasitol.*, v. 123, p. 35-40, 2002.
- GOGTAY, N.J., DESAI, S., KADAM, V.S., KAMTEKAR, K.D., DALVI, S.S.S., KSHIRSAGAR, N.A. A randomized, parallel-group study in Mumbai (Bombay), comparing chloroquine with chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of adults with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Basingstoke, v.94, n.4, p.309-312, 2000.
- GOLDBERG, D.E, SLATER, A.F.G. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol. Today*, Oxford, v.8, n.8, p.280-283, 1992.
- GONZALEZ-NORIEGA, A., GRUBB, J.H., TALKAD, V., SLY, W.S. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J. Cell. Biol.*, New York, v.85, n.3, p.839-852, 1980.
- GOULD, R.G., JACOBS, W.A. The synthesis of certain substituted quinolines and 5,6-benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.61, n.10, p.2890-2895, 1939.

- GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. *J. Antimicrob. Chemother.*, Oxford, v.36, p.857-872, 1995.
- GUAN, W.D., ZHOU, Y., HUANG, W.J. Effects of piperazine and hydroxypiperazine on a chloroquine-resistant strain of *plasmodium falciparum*. *Parasitol. Parasitic D.*, v.1, p.88-90, 1988.
- HACKETT, F., *ET AL.* PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.103, p.183-195, 1999.
- HALE, B.R., OWUSU-AGYEI, S., FRYAUFF, D.J., KORAM, K.A., ADJUIK, M., ODURO, A.R., PRESCOTT, W.R., BAIRD, J.K., NKURUMAH, F., RITCHIE, T.L., FRANKE, E.D., BINKA, F.N., HORTON, J., HOFFMAN, S.L. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of tafenoquine for weekly prophylaxis against *Plasmodium falciparum*. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.36, n.5, p.541-549, 2003.
- HARRISON, A.C., LITTERINGHAM, N.R., CLARKE, J.B., PARK, B.K. The mechanism of bioactivation and antigen formation of amodiaquine in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, Paris, v.43, n.7, p.1421-1430, 1992.
- HATZELMANN, A., FRUCHTMANN, R., MOHRS, K.H., RADDATZ, S., MULLERPEDDINGHAUS, R. Mode of action of the new selective leukotriene synthesis inhibitor bay X-1005 (R)-2-[4-(quinolin-2-yl-methoxy)phenyl]2-cyclopentyl

acetic-acid) and structurally related-compounds. *Biochem. Pharmacol.*, Paris, v.45, n.1, p.101-111, 1993.

HATZELMANN, A., GOOSSENS, J., FRUCHTMANN, R., MOHRS, K.H., RADDATZ, S., MULLERPEDDINGHAUS, R. Inversely-correlated inhibition of human 5-lipoxygenase activity by bay X-1005 and other quinoline derivatives in intact-cells and a cell-free system-implications for the function of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochem. Pharmacol.*, Paris, v.47, n.12, p.2259-2268, 1994.

HAUSER, C.R., REYNOLDS, G.A. Reactions of β -keto esters with aromatic amines. Syntheses of 2-and-4-hydroxyquinoline derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.70, n.7, p.2402-2404, 1948.

HAWLEY, S.R., BRAY, P.G., O'NEILL, P.M., NAISBITT, D.J., PARK, B.K., WARD, S.A. Manipulation of the *N*-alkyl substuent in amodiaquine to overcome the verapamil-sensitive chloroquine resistance component. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.40, n.10, p.2345-2349, 1996a.

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

- HAWLEY, S.R., BRAY, P.G., PARK, B.K., WARD, S.A. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial over chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.80, n.1, p.15-25, 1996c.
- HAWLEY, S.R., BRAY, P.G., MUNGTHIN, M., ATKINSON, J.D., O'NEILL, P.M., WARD, S.A. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, Washington, v.42, n.3, p.682-686, 1998.
- HIRST, S.I., STAPLEY, L.A. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.1, p.1-3, 2000.
- HOLFHEINZ, W., MERKLI, B. Quinine and quinine analogues. In: PETERS, W., RICHARDS, W.H.G. *Antimalarial Drugs II*. Berlin: Springer Verlag, 1984. p.61-81.
- HURWITZ, E.S., JOHNSON, D., CAMPBELL, C.C. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine in a refugee camp in Thailand. *Lancet*, London, v.1, n.8229, p.1068-1070, 1981.
- IDOWU, O.R., PEGGINS, J.O., BREWER, T.G., KELLY, C. Metabolism of a candidate 8-aminoquinoline antimalarial agent, WR238605, by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, Bethesda, v.23, n.1, p.1-17, 1995.
- ISMAIL, F.M., DASCOMBE, M.J., CARR, P., NORTH, S.E. An exploration of the structure-activity relationships of 4-aminoquinolines: novel antimalarials with activity in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.*, Washington, v.48, n.8, p.841-850, 1996.

- KAIN, K.C. Chemotherapy and prevention of drug-resistant malaria. *Wilderness Environ. Med.*, v.6, p.307-324, 1995.
- KARUNAWEERA, N.D., GRAU, G.E., GAMAGE, P., CARTER, R., MENDIS, K.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.89, n.8, p.3200-3203, 1992.
- KASCHULA, C.H., EGAN, T.J., HUNTER, R., BASILICO, N., PARAPINI, S., TARAMELLI, D., PASINI, E., MONTI, D. Structure-activity relationships in 4-aminoquinoline antiplasmodials. The role of the group at the 7-position. *J. Med. Chem.*, Washington, v.45, n.16, p.3531-3539, 2002.
- KEAN, B.H. Chloroquine-resistant malaria from Africa. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.241, n.4, p.395, 1979.
- KOH, H., GO, M.L., NGIAM, T.L., MAK, J.W. Conformational and structural features determining *in vitro* antimalarial activity of some indolo[3,2-c]quinolines, anilinoquinolines and tetrahydroindolo[3,2-d]benzazepines. *Eur. J. Med. Chem.*, Paris, v.29, n.2, p.107-113, 1994.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 1204p.
- KROGSTAD, D.J., SCHLESINGER, P.H., GLUZMAN, I.Y. Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biol.*, New York, v.101, n.6, p.2301-2309, 1985.

- KURTZHALS, J.A., ADABAYERI, V., GOKA, B.Q., AKANMORI, B.D., OLIVER-COMMEY, J.O., NKURUMAH, F.K., BEHR, C., HVIID, L. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*, v.351, p.1768-1772, 1998.
- KYLE, D., WEBSTER, K. Gametocytocidal and sporontocidal activity against *Plasmodium falciparum*. *Am. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.57, p.3-83, 1997.
- LABBE, A.C., PILLAI, D.R., HONGVATHONG, B., VANISAVETH, V., POMPHIDA, S., INKATHONE, S., BURGESS, D.C.H., KAIN, K.C. The performance and utility of rapid diagnostic assay for *Plasmodium falciparum* malaria in a field in the Lao People's Democratic Republic. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Basingstoke, v.95, n.7, p.671-677, 2001.
- LANGRETH, S.G., PETERSON, E. Pathogenity, stability, and immunogenicity of a knobless clone of *Plasmodium falciparum* in Colombian owl monkeys. *Infect. Immunol.*, Oxford, v.47, n.3, p.760-766, 1985.
- LATTANZI, A., SAGULO, F., SCETTRI, A. Diastereoselective synthesis of enantiopure 5-[2-(alkoxyalkyl)1-hydroperoxypropyl]-3-alkoxycarbonyl-2-alkylfurans. *Tetrahedron Asymmetry*, Oxford, v.10, n.10, p.2023-2025, 1999.
- LE BRAS, J. Mechanisms and dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Ses. Fil.*, Vineuil, v.92, n.4, p.236-241, 1999.

- LIND, D.E., LEVI, J.A., VINCENT, P.C. Amodiaquine induced agranulocytosis; Toxic effects of amodiaquine in bone marrow culture *in vitro*. *Br. Med. J.*, v.1, n.5851, p.458-460, 1973.
- LINES, J., ARMSTRONG, J.R.M. For a few parasites more: inoculum size, vector control and strain-specific immunity to malaria. *Parasitol. Today*, Oxford, v.8, n.11, p.381-383, 1992.
- LOEB, R.F., CLARKE, W.M., COATENEY, G.R., COGESHALL, L.T., DIEUAIDE, F.R., DOCHEZ, A.R., HAKANSSON, E.G., MARSHALL, E.K., MARVEL, S.C., McCOY, O.R., SAPERO, J.J., SERBELL, W.H., SHANNON, J.A., CARDEN, G.A. Activity of a new antimalarial agent, chloroquine (SN 7618). *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.130, p.1069-1070, 1946.
- LOIOLA, C.C.P., SILVA, C.J.M., TAUIL, P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev. Panam. Salud Publica*, v.11, n.4, p.235-243, 2002.
- LUSE, S.A., MILLER, L.H. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am. J. Trop. Hyg.*, Northbrook, v.20, n.5, p.655-660, 1971.
- LUZZI, G.A., PETO, T.E. Adverse effects of antimalarials. *Drug Saf.*, Auckland, v.8, n.4, p.295-311, 1993.
- MAGGS, J.L., LITTERINGHAM, N.R., PARK, B.K. Drug protein conjugate-XIV. Mechanism of formation of protein arylating intermediates from amodiaquine a

- myelotoxin and hepatotoxin in man. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.37, n.4, p.303-311, 1988.
- MARSH, K. The pathogenesis of severe malaria in African children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Basingstoke, v.90, p.395-402.
- MARVEL, C.S., HAGER, F.D. Ethyl *n*-butylacetoacetate. *Org. Synth. Coll.*, New York, v.1, p.248-250, 1941.
- McCHESNEY, E.W., FITCH, C.D. 4-Aminoquinolines. In: PETERS, W., RICHARDS, W.H.G. *Antimalarial Drugs II: Current Antimalarial and New Drug Developments*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1984, p.30-60.
- McCHESNEY, E.W., CONWAY, W.D., BANKS, W.F.JR., ROGERS, J.E., SHEKOSKY, J.M. Studies of the metabolism of some compounds of the 4-amino-7chloroquinoline series. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.151, n.3, p.482-493, 1966.
- MENDIS.K., SINA. B.J., MARCHESINI, P., CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Hyg.*, v.64, suppl.1-2, p.97-105, 2001.
- MENEZES, C.M.S., SANT'ANNA, C.M.R., RODRIGUES, C.R., BARREIRO, E.J. Molecular modeling of novel 1 *H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives designed as isosters of the antimalarial mefloquine. *J. Mol. Struct.*, Amsterdam, v.579, p.31-39, 2002.

- MESHNICK, S.R., MARR, J.J. Intracellular parasites. New developments in chemotherapy. *Subcell. Biochem.*, New York, v.18, p.401-441, 1992.
- MICHAEL, J. P.; KONING, C. B.; HOSKEN, G. D.; STANBURY, T. V. Reformatsky reactions with *N*-arylpyrrolidine-2-thiomes: synthesis of tricyclic analogues of quinolone antibacterial agents. *Tetrahedron*, Oxford, v.57, n.47, p.9635-9648, 2001.
- MILLER, L.H., BARUCH, D.I., MARSH, K. DOUMBO, O.K. The pathogenic bases of malaria. *Nature*, v. 415, p. 673-679, 2002.
- MOODY, A., Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.15, n.1, p.66, 2002.
- MORI, K. Absolute configurations of (-)-14-methylhexadec-8-cis-em-1-ol and methyl (-)-14-methylhexadec-9-cis-enoate, the sex pheromone of female dermestid beetle. *Tetrahedron*, Oxford, v.30, n.21, p.3817-3820, 1974.
- MOTA, M.M., RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 1123-1128, 2001.
- MYRVANG, B., GODAL, T. WHO's malaria program Roll Back Malaria. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.*, Lagaasen, v.120; n.14, p.1661-1664, 2000.

- NA-BANGCHANG, K., LIMPAIBUL, L., THANAVIBUL, A., TAN-ARIYA, P., KARBWANG, J. The pharmacokinetics of chloroquine in healthy Thai subjects and patients with *Plasmodium vivax* malaria. *Br. J. clin. Pharmacol.*, v.38, p.278-281, 1994.
- NAKAGOME, T.; AGUI, H.; MITANI, T.; NAKASHITA, M. Abtimicrobial 1-alkyl-6-7-methylenedioxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3carboxylic acids. Ger. Offen. 2,033,971, 1971. 43p Apud: Chem. Abstr. Colombus, v.75, abstr. N.140823u, 1971.
- NAIK, R.S., BRANCH, O.H., WOODS, A.S., VIJAYKUMAR, M., PERKINS, D.J., NAHLEN, B.L., LAL, A.A., COTTER, R.J., COSTELLO, C.E., OCKENHOUSE, C.F., DAVIDSON, E.A., GOWDA, D.C. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.*, New York, v.192, n.11, p.1563-1576, 2000.
- NAVARRO, M., PÉREZ, H., SÁNCHEZ-DELGADO, R.A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases 3. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of the new gold-chloroquine complex $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$. *J. Med. Chem.*, Washington, v.40, n.12, p.1937-1939, 1997.
- NEFTTEL, K.A., WOODTLY, W., SCHMID, M., FRICK, P.G., FEHR, J. Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. *Br. Med. J.*, v.292, n.6522, p.721-723, 1986.
- NEWBOLD, C., CRAIG, A., KYES S., ROWE, A., FERNANDES-REYES, D., FAGAN, T. Cythoadrence, pathogenesis and infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.29, n.6, p.929-937, 1999.
- NGUGYEN-CONG, V., RODE, B.M. Quantum pharmacological analysis of structure-activity relationships for mefloquine antimalarial drugs using optimal transformations. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, Columbus, v.36, p.114-117, 1996.

- NORONHA, E., ALECRIM, M.G., ROMERO, G.A.S., MACÊDO, V. RIII mefloquine resistance in children with falciparum malaria in Manaus, AM, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.33, n.2, p.201-205, 2000.
- OBALDIA, N., ROSSAN, R.N., COOPER, R.D., KYLE, D.E., NUZUM, E.º, RIECKMANN, K.L., SHANKS, G.D. WR 238605, chloroquine, and their combinations as blood schizonticides against a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium vivax* in *Aotus* monkeys. *Am Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.56, n.5, p.508-510, 1997.
- OHNMACHT, C.J., PATEL, A.R., LUTZ, R.E. Antimalarials. 7. Bis-(trifluoromethyl)- α -(2-piperidyl)-4-quinolinemethanols. *J. Med. Chem.*, Washington, v.14, n.10, p.926-928, 1971.
- OLLIARO, P.L., GOLDBERG, D.E. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. *Parasitol. Today*, Oxford, v.11, n.8, p.294-297, 1995.
- OLLIARO, P.L., YUTHAVONG, Y. An overview of chemotherapy targets for antimalarial drug discovery. *Pharmacol. Ther.*, New York, v.81, n.2, p.91-110, 1999.
- OMER, F.M., KURTZHALS, J.A., RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol. Today*, Oxford, v.16, n.1, p.18-23, 2000.

- O'NEILL, P.M, HARRISON, A.C., STORR, R.C., HAWLEY, S.R., WARD, S.A., PARK, B.K. The effect of fluorine substitution on the metabolism and antimalarial activity of amodiaquine. *J. Med. Chem.*, Washington, v.37, n.9, p.1362-1370, 1994.
- O'NEILL, P.M., TINGLE, M.D., MAHMUD, R. STORR, R.C., WARD, S.A., PARK, B.K. The effect of fluorine substitution on the haemotoxicity of primaquine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Oxford, v.5, n.20, p.2309-2314, 1995.
- O'NEILL, P.M., HAWLEY, S.R., STORR, R.C., WARD, S.A., PARK, B.K. The effect of fluorine substitution on the antimalarial activity of tebuquine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Oxford, v.6, n.4, p.391-392, 1996.
- O'NEILL, P.M., WILLOCK, D.J., HAWLEY, S.R., BRAY, P.G., STORR, R.C., WARD, S.A., PARK, B.K. Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of tebuquine analogues. *J. Med. Chem.*, Washington, v.40, n.4, p.437-448, 1997.
- O'NEILL, P.M., STORR, R.C., PARK, B.K. Synthesis of the 8-aminoquinoline antimalarial 5-fluoroprimaquine. *Tetrahedron*, Oxford, v.54, n.18, p.4615-4622, 1998.
- ONORI, E. The problem of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Africa south of the Sahara. *Bull.W.H.O.*, Geneva, v.62, suppl. S, p.55-62, 1984.

- PALMER, K.J., HOLLIDAY, S.M., BROGDEN, R.N. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, Auckland, v.45, n.3, p.430-475, 1993.
- PANDEY, V.C., PURI, S.K., SAHNI, S.K., SRIVASTAVA, P., DUTTA, G.P. Effect of anti-relapse antimalarial compound CDRI 80/53 and primaquine on hepatic mixed function oxidase system of rhesus monkeys. *Pharm. Res.*, New York, v.22, n.6, p.701-707, 1990.
- PATCHETT, A.L.; CLARK, R.L.; ROGERS, E.F. Anticoccidial 7-alkylamino-4hydroxyquinoline-3-carboxylates. U. S. 3,542,781, 1970. 7p. Apud: Chem. Abstr. Colombus, v.74, abstr. N.141569g, 1971.
- PERREUX, L., LOUPY, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction médium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, v.57, n.45, p.9199-9223, 2001.
- PERRIN, D.D., ARMAREGO, W.L.F., PERRIN, D.R. Purification of laboratory chemicals. 2ed. Oxford: Pergamon Press, 1980. 568p.
- PREISER, P., KAVIRATNE, M., KHAN, S. BANNISTER, L., JARRA, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1461-1477, 2000.

- PRICE, C.C., ROBERTS, R.M. the synthesis of 4-hydroxyquinolines. I. Through ethoxymethylmalonic ester. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.68, n.7, p.1204-1208, 1946.
- PRICE, C.C., LEONARD, N.J., STACY, G.W. The synthesis of 4-hydroxyquinolines. X. Quinoline derivatives with sulfur-containing substituents. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.69, n.4, p.855-858, 1947.
- PURI, S.K., DUTTA, G.P. Quinolines esters as potential antomalarial drugs effect on relapses of *Plasmodium cynomolgi* infections in monkeys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.84, n.6, p.755-756, 1990.
- PURI, S.K., DUTTA, G.P. Blood schizonticidal activity of WR 238605 (tafenoquine) against *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium fragile* infections in *rhesus* monkeys. *Acta Trop.*, Shannon, v.86, n.1, p.35-40, 2003.
- RAMASAMY, R. Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1406, n.1, p.10-27, 1998.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.
- RATHOD, P.K., McERLEAN, T., LEE, P.C. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v.94, n.17, p.9389-9393, 1997.

- RAYNER, J.C., VARGAS-SERRATO, E., HUBER, C., GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (Pv-RBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J. Exp. Med.*, New York, v.194, n.11, p.1571-1582, 2001.
- RAYNES, K., GALATIS, D., COWMAN, A.F., TILLEY, L., DEADY, L.W. Synthesis and activity of some antimalarial bisquinolines. *J. Med. Chem.*, Washington, v.38, n.1, p.204-206, 1995.
- RAYNES, K., FOLEY, M., TILLEY, L., DEADY, L.W. Novel bisquinoline antimalarials. Synthesis, antimalarial activity, and inhibition of haem polymerization. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.52, n.4, p.551-559, 1996.
- RAYNES, K.J., STOCKS, P.A., O'NEILL, P.M., PARK, B.K., WARD, S.A. New 4-aminoquinoline Mannich base antimalarials 1. Effect of an alkyl substituent in the 5'-position of the 4'-hydroxyanilino side chain. *J. Med. Chem.*, Washington, v.42, n.15, p.2747-2751, 1999.
- REACHER, M., CAMPBELL, C.C., FREEMAN, J., DOBERSTYN, E.B. Drug therapy for *Plasmodium falciparum* malaria resistant to pyrimethamine-sulfadoxine. *Lancet*, London, v.2, n.8255, p.1066-1069, 1981.
- RECHSTEINER, B., T-BOULLET, F., HAMELIN, Synthesis in dry coupled with microwave irradiation: application to the preparation of enaminketones. *J. Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.34, n.32, p.5071-5074, 1993.
- REYNOLDS, G.A., HAUSER, C.H. Ethyl beta-anilinoacrylate. *Org. Synth. Coll.*, New York, n.3, p.374-375, 1955a.

- REYNOLDS, G.A., HAUSER, C.H. 2-methyl-4-hydroxyquinoline. *Org. Synth. Coll.*, New York, n.3, p.593-594, 1955b.
- RIDLEY, R.G., WHITE, J.H., McALEESE, S.M., GOMAN, M., ALANO, P., de VRIES, E., KILBEY, B.J. DNA polymerase δ : gene sequences from *Plasmodium falciparum* indicate that this enzyme is more highly conserved than DNA polymerase α . *Nucl. Acids Res.*, v.19, n.4, p.6731-6736, 1991.
- RIDLEY, R.G, DORN, A., MUTILE, H., KANSY, M. Haem polymerasation in malaria. *Nature*, Paris, v.378, n.6553, p.138-139, 1995.
- RIDLEY, R.G, HOLFHEINZ, W., MATILE, H., JAQUET, C., DORN, A., MASCIADRI, R., JOLIDON, S., RICHTER, W.F., GUENZI, A., GIROMETTA, M.A., URWYLER, H., HUBER, W., THAITHONG, S., PETERS, W. 4-Aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.40, n.8, p.1846-1854, 1996.
- RIDLEY, R.G, MATILE, H., JAQUET, C., DORN, A., HOLFHEINZ, W., LEUPIN, W., MASCIADRI, R., THEIL, F.P., RICHTER, W.F., GIROMETTA, M.A., GUENZI, A., URWYLER, H., GOCKE, E., POTTHAST, J.M., CSATO, M., THOMAS, A., PETERS, W. Antimalarial activity of the bisquinoline *trans*- N^1 , N^2 -bis(7-chloroquinolin-4-yl)cyclohexane-1,2-diamine: comparison of two stereoisomers and

detailed evaluation of the *S,S* enantiomer, Ro 47-7737. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.41, n.3, p.677-686, 1997.

RIEGEL, B., LAPPIN, G.R., ADELSON, B.H., JACKSON, R.I., ALBISETTI, C.J., DODSON, R.M., BAKER, R.H. The synthesis of some 4-quinolinols and 4-chloroquinolines by the ethoxymethylenemalonic ester method. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.68, n.7, p.1264-1266, 1946.

RIETVELD, A. *Frequently-asked questions about malaria*. Disponível em: <http://www.outbreak.org/cgi-unreg/dynaserve.exe/Malaria/faq.html>. Acesso em: 02 mar. 2002.

RIFFKIN, C., CHUNG, R., WALL, D., ZALCBERG, J.R., COWMAN, A.F., FOLEY, M., TILLEY, L. Modulation of the function of human MDR1 P-glycoprotein by the antimalarial drug mefloquine. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.52, n.10, p.1545-1552, 1996.

ROSSI, A.; WILHELM, M. Bacteriolytic quinoline derivatives. Ger., Offen. 1,814,187, 1969. 48p. Apud: Chem. Abstr. Colombus, v.71, abstr. N.91339x, 1979.

ROTH, E.F.Jr., BROTMAN, D.S., VANDERBERG, J.P., SCHULMAN, S. Malarial pigment-dependent error in the estimation of hemoglobin content in *Plasmodium falciparum*-infected red cells: implications for metabolic and biochemical studies of the erythrocytic phases of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.35, n.5, p.906-911, 1986.

- ROWE, J.A., MOULDS, J.M., NEWBOLD, C.I., MILLER, L.H. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, Paris, v.388, n.6639, p.292-295, 1997.
- RYCKEBUSCH, A., DEPREZ-POULAIN, R., MAES, L., DEBREU-FONTAINE, M.A., MOURAY, E., GRELLIER, P., SERGHERAERT, C. Synthesis and in vitro and in vivo antimalarial activity of *N*¹-(7-chloro-4-quinoly)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *J. Med. Chem.*, Washington, v.46, n.4, p.542-557, 2003.
- RYLEY, J.F.; PETERS, W. The antimalarial activity of some quinolone esters. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* Basingstoke, v.64, n.2, p.209-222, 1970.
- SADICOFF, B.L., AMORIM, M.C.V., MATTOS, M.C.S. Uma demonstração simples e visual do efeito do aquecimento com microondas em reações de poliadição. *Quim. Nova*, São Paulo, v.23, n.4, p.557-559, 2000.
- SANCHEZ, C.P., WUNSCH, S., LANZER, M. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.2652-2658, 1997.
- SCHACTER, B.A. Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action. *Semin. Hematol.*, Philadelphia, v.25, n.4, p.349-369, 1988.
- SCHLAGENHAUF, P., STEFFEN, R., LOBEL, H., JOHNSON, R., LETZ, R., TSCHOPP, A., VRANJES, N., BERGQVIST, Y., ERICASSON, O., HELLGREN, U., ROMBO, L., MANNINO, S., HANDSCHIN, J., STURCHLER, D. Mefloquine tolerability during chemoprophylaxis; focus on adverse event assessments, stereochemistry and compliance. *Trop. Med. Int. Health*, New York, v.1, n.1, p.485-494, 1996.

- SCHOFIELD, L., HACKETT, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.*, New York, v.177, n.1, p.145-153, 1993.
- SCOTT, H.V., TAN, W.L., BARLIN, G.B. Antimalarial activity of Mannich bases derived from 4-(7'-bromo-1',5'-naphthyridin-4'-ylamino)phenol and 4-(7'-trifluoromethylquinolin-4'-ylamino)phenol against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.81, n.2, p.85-93, 1987.
- SOTT, H.V., TAN, W.L., BARLIN, G.B. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of some Mannich bases derived from 4-[7'bromo (and chloro)-1',5'-naphthyridin-4'-ylamino] phenol and 4-(7'-trifluoromethylquinolin-4'-ylamino) phenol. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.82, n.2, p.127-134, 1988.
- SEGURADO, A.A.C., DI SANTI, S.M., SHIROMA, M. In vivo and in vitro *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.39, n.2, p.85-90, 1997.
- SHANKS, G.D., KAIN, K.C., KEYSTONE, J.S. Malaria chemoprophylaxis in the age of drug resistance. II. Drugs that may be available in the future. *Clin. Infect. Dis.*, v.33, n.3, p.381-385, 2001a.
- SHANKS, G.D., OLOO, A.J., ALEMAN, G.M., OHRT, C., KLOTZ, F.W., BRAITMAN, D. A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.33, n.12, p.1968-1974, 2001b.
- SHERMAN, I.W. Mechanisms of molecular trafficking in malaria. *Parasitol.*, New York, v.96, p. S57-81, 1988.

SHERMAN, I.W. Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. *Parasitol.*, New York, v.91, p.609-645, 1985.

SHERMAN, I.W., CRANDALL, I., SMITH, H. Membrane proteins involved in the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the endothelium. *Biol. Cell*, Paris, v.74, n.2, p.161-178, 1992.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, O.C., MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 380p.

SLATER, A.F.G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.*, New York, v.57, n.2-3, p.203-235, 1993.

SLATER, A.F.G., CERAMI, A. Inhibition by chloroquine of novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*, Paris, v.355, n.6356, p.167-169, 1992.

SMITH, M.B. Organic synthesis. New York: Mc Graw-Hill, 2002. 1371p.

SNYDER, H.R., FREISER, H.E., KOVACIC, P., HEYNINGEN, E.M. Synthesis of 4-hydroxyquinolines. VIII. Some halogen containing 4-aminoquinoline derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.69, n.2, p.371-374, 1947.

- SOLIS, M.M.P. Síntese de furanoquinolinas: precursors potenciais de novos antimaláricos. São Paulo, 2002, 198p. [Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- SOUZA, DE J.B., RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 291-300, 2002.
- SRIVASTAVA, P., PURI, S.K., DUTTA, G.P., PANDEY, V.C. Effect of the antimalarial agents primaquine and (N'-3-acetyl-4-5-dihydro-2-furanyl)-N¹-(6-methoxy-8quinoliny)l,4-pentane-diamine on oxidative stress and antioxidant defences in mice. *Biochem. Pharmacol.*, New York, v.86, n.10, p.1859-1860, 1993.
- SRIVASTAVA, I.K., ROTTENBERG, H., VAIDYA, A.B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.272, n.7, p.3961-3966, 1997.
- STANLEY, J. Malaria. *Med. Clin. North Am.*, Philadelphia, v.15, n.1, p.113-155, 1997.
- STEWART, M.J., VANDERBERG, J.P. Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J. Protozool.*, v.38, n.4, p.411-421, 1991.
- STOCKS, P.A., RAYNES, K.J., BRAY, P.G., KEVIN PARK, B., O'NEILL, P.M., WARD, S.A. Novel short chain chloroquine analogues retain activity against

- chloroquine resistant K1 *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.*, Washington, v.45, n.23, p.4975-4983, 2002.
- SUGIOKA, Y., SUZUKI, M. The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX chloroquine complex induced lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1074, n.1, p.19-24, 1991.
- SULLIVAN, D.J., GLUZMAN, I.Y., GOLDBERG, D.E. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*, v.271, n.5246, p.219-222, 1996.
- SWEENEY, T.R. Drugs with quinine-like action. In: PETERS, W., RICHARDS, W.H.G. *Antimalarial Drugs II: Current antimalarials and new drug developments*. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.267-313.
- TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. Na improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.93, n.2, p.157-165, 1986.
- TARBELL, D.S. The synthesis of 4,6- and 4,8-dichloroquinoline. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.68, p.1277-1279, 1946.
- TATEE, T., NARITA, K., KURASHIGE, S., ITO, S., MIYAZAKI, H.; YAMANAKA, H.; MIZUGAKI, M., SAKAMOTO, T., FUKUDA, H. Isoxazole derivates as centrally acting muscle-relaxants. 2. Synthesis and structure-activity relationship of 3-amino-*n*-

- (3-phenyl-5-isoxazolyl) propanamides. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.34, n.4, p.1643-1655, 1986.
- TAYLOR, T.E., BORGSTEIN, A., MOLYNEUX, M.E. Acid-base status in pediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Q. J. Med.*, v.86, n.2, p.99-109, 1993.
- TRIGG, P.I., KONDRACHINE, A. Commentary: malaria control in the 1990 s. *Bull. W.H.O.*, Geneva, v.76, n.1, p.11-6, 1998.
- UENO, K., MARTELL, A.E. Infrared study of metal chelates of bisacetylacetone-ethylenediimine and related compounds. *J.Phys. Chem.*, New York, v.59, n.10, p.999-1004, 1955.
- VALDUGA, C. J., BRAIBANTE, H. S., BRAIBANTE, E. F. Reactivity of *p*-phenyl substituted beta-enamino compounds using K10/ ultrasond. I. Synthesis of pyrazoles and pyrazolinones. *J. Heterocyclic Chem.*, Odessa, v.35, n.1, p.189-192, 1998.
- VALECHA, N., ADAK, T., BAGGA, A.K., ASTHANA, O.P., SRIVASTAVA, J.S., JOSHI, H., SHARMA, V.P. Comparative antirelapse efficacy of CDRI compound 80/53 (bulaquine) vs primaquine in double blind clinical trial. *Curr. Sci.*, Bangalore, v.80, n.4, p.561-563, 2001.
- VAN HESBROEK, M.B., PALMER, A., ONYORAH, E., SCHNIEDER, G., JAFFAR, S., DOLAN, G., MEMMING, H., FRENKEL, J., ENWERE, G., BENNETT, S.,

- KWIATHOWSKI, D., GREENWOOD, B. The effect of monoclonal antibody to tumour necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.174, n.5, p.1091-1097, 1996.
- VANDER JAGT, D.L., HUNSAKER, L.A., CAMPOS, N.M. Characterisation of haemoglobin degrading, low molecular weight protease from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 18, n.3, p.389-400, 1986.
- VARMA, R.S., DAHIYA, R., KUMAR, S. Clay catalyzed of imines and enamines under solvent-free conditions using microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.38, n.12, p.2039-2042, 1997.
- VEITÍIA, M.Y. Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da mefloquina. São Paulo, 2002, 247p. [Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- VENNERSTROM, J.L., ELLIS, W.Y., AGER, A.L., ANDERSEN, S.L., GERENA, L., MILHOUS, W.K. Bisquinolines.1. *N, N*-bis(7-chloroquinolin-4-yl)alkanediamines with potential against chloroquine-resistant malaria. *J. Med. Chem.*, Washington, v.35, n.11, p.2129-2134, 1992.
- VENNERSTROM, J.L., NUZUM, E.O., MILLER, R.E., DORN, A., GERENA, L., DANDE, P.A., ELLIS, W.Y., RIDLEY, R.G., MILHOUS, W.K. 8-aminoquinolines active against blood stage *Plasmodium falciparum* *in vitro* inhibit hematin

- polimerization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.43, n.3, p.598-602, 1999.
- VIPPAGUNTA, S.R., DORN, A., MATILE, H., BHATTACHARJEE, A.K., KARLE, J.M., ELLIS, W.Y., RIDLEY, R.G., VENNERSTROM, J.L. Structural specificity of chloroquine-hematin binding related to inhibition of hematin polymerization and parasite growth. *J. Med Chem.*, Washington, v.42, n.22, p.4630-4639, 1999.
- WALLACE, D.J. The use of chloroquine and hydroxichloroquine for non-infectious conditions other than rheumatoid arthritis or lupus: a critical review. *Lupus*, London, S59-64, 1996.
- WARHUST, D.C, HOCKLEY, D.J. Mode of action of chloroquine on *Plasmodium berghei* and *P. cynomolgi*. *Nature*, Paris, v.214, p.935-936, 1967.
- WARHURST, D.C. Drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection*, v.27, suppl.2, S55-8, 1999.
- WERBEL, L., COOK, P.D., ELSLAGER, E.F., HUNG, J.H., JOHNSON, J.L., KESTEN, S.J., McNAMARA, D.J., ORTWINE, D.F., WORTH, D.F. Synthesis, antimalarial activity, and quantitative structure-activity relationships of tebuquine and a series of related 5-[(7-chloro-4-quinolinyl)amino]-3-[(alkylamino)methyl] [1,1'-biphenyl]-2-ols and *N* ω -oxides. *J. Med. Chem.*, Washington, v.29, n.6, p.924-939, 1986.

- WERMUTH, C.G. Molecular variations based on isosteric replacements. *In*: WERMUTH, C.G., ed. *The practice of medicinal chemistry*. San Diego: Academic Press, 1996. p.203-238.
- WERNSDORFER, W.H., TRIGG, P.I. *Primaquine: pharmacokinetics, metabolism, toxicity, and activity*. New York: John Wiley & Sons, 1987. 164p.
- WETSTEYN, J.C., DE VRIES, P.J., OOSTERHUIS, B., VAN BOXTEL, C.J. The pharmacokinetics of three multiple dose regimens of chloroquine: implications for malaria chemoprophylaxis. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v.39, p.696-699, 1995.
- WHITE, N.J. Clinical pharmacokinetics of antimalarial drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.10, n.3, p.187-215, 1985.
- WINOGRAD, E., SHERMAN, I.W. Characterization of a modified red cell membrane protein expressed on erythrocytes infected with the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: possible role as a cytoadherent mediating protein. *J. Cell Biol.*, New York, v.108, n.1, p.23-30, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria: a global crisis. Disponível em: <http://mosquito.who.int/docs/fs1>. Acesso em: 03 set. 2002a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria prevention and control. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/malaria.html>. Acesso em: 20 mai.2002b.

YAYON, A., TIMBERG, R., FRIEDMAN, S., GINSBURG, H. Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Protozool.*, v.31, n.3, p.367-372, 1984.

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

APÊNDICE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS

ESTUDO DE MODELAGEM MOLECULAR NA
ELUCIDAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA DE
NOVOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS

KERLY FERNANDA MESQUITA PASQUALOTO

CARLA MARIA DE SOUZA MENEZES

Outubro 2003

Introdução

Derivados quinolínicos **5,6,11,12** (Figura 1) foram planejados como candidatos a novos agentes antimaláricos (“Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados quinolínicos potencialmente antimaláricos”, projeto de pesquisa da aluna Ana Cláudia Melo Pompeu da Silva, do Curso de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, desta Unidade). Após síntese, realizou-se ensaio biológico *in vitro* empregando cepa de *P. chabaudi* (Tabela I). Todos os derivados mostraram-se ativos, com especial destaque ao **11**, o qual apresentou atividade próxima à observada para o agente antimalárico cloroquina (CQ). Atividade antiparasitária leishmanicida também foi detectada, destacando-se, novamente o derivado **11**. Ensaios preliminares de citotoxicidade mostraram ausência de efeito sobre macrófagos de células endoteliais (Pompeu da Silva *et al.* – resultados a serem publicados).

Figura 1 - Estruturas químicas dos derivados quinolínicos em estudo e da cloroquina.

Tabela I – Atividade biológica *in vitro* contra cepa de *P. chabaudi* e respectivos intervalos de confiança de 95% dos derivados **5**, **6**, **11**, **12** e cloroquina. **CQ**

Composto	EC ₅₀ (mM)	Intervalo de confiança (95%)
5	7,722	6,494 – 9,181
6	8,393	8,023 – 8,781
11	0,112	0,053 – 0,236
12	0,352	0,129 – 0,965
CQ	0,127	0,093 – 0,172

Com o objetivo de avaliar, sob os aspectos estérico, eletrônico e lipofílico, a importância da natureza e posição dos substituintes no anel quinolínico de **5**, **6**, **11** e **12** à atividade biológica, promoveu-se estudo de modelagem molecular. Estudo comparativo foi realizado para a cloroquina.

Material e Métodos

Microcomputador com processador ADM ATHLON XP de 2GHz com 40 GB de HDG dotado de sistema operacional Linux (Red Hat versão 7.2) foi empregado para execução do programa SYBYL versão 6.9 (Tripos Inc.). Na otimização inicial da geometria dos derivados quinolínicos (**5**, **6**, **11** e **12**) e da cloroquina (**CQ**) empregou-se campo de força MMFF94¹, método *Steepest Descent* (módulo Minimize). Em seguida, procedeu-se minimização e cálculo de cargas com método semi-empírico AM1², módulo MOPAC. A escolha do método AM1 deu-se em razão dos resultados satisfatórios que este tem apresentado no planejamento e avaliação por modelagem molecular de derivados quinolínicos e bioisósteros com potencial atividade antimalárica^{3,4}.

As estruturas otimizadas foram submetidas à análise conformacional empregando-se o módulo *Random Search*. Neste adotaram-se as seguintes opções: número de 100 ciclos para a localização de todas as possíveis conformações de energia mínima; 60 kcal/mol como energia máxima permitida; 0,1 Å como diferença máxima de RMS (*Root Mean*

Square) entre duas conformações; 0,005 como o gradiente de convergência e 6 como o número mínimo de frequência de cada confômero. A escolha dos confômeros foi realizada considerando-se aquele de energia mínima global. Os confômeros selecionados foram submetidos a cálculos de carga parcial, valor de energia de orbital molecular de HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e de LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e superfícies de orbitais moleculares de HOMO e de LUMO, considerando-se contornos de - 0,03 a + 0,03 eV e - 0,045 a + 0,045 eV, respectivamente, no método AM1, módulo MOPAC. O módulo MOLCAD foi utilizado para gerar as superfícies moleculares dos confômeros de energia mínima selecionados. Os mapas de potencial eletrostático (MEPs) e de potencial lipofílico (MLPs) foram construídos empregando-se superfície Connolly, com esfera prova de 1,4 Å de raio. Faixas de - 15 a + 15 kcal/mol foram utilizadas para visualização dos MEPs. Nos MPLs foram estabelecidas as faixas de 0,089 a 0,189 kcal/mol para **5,6,11,12** e de 0,062 a 0,124 kcal/mol para **CQ**. As demais opções seguiram conforme padronizado no programa. Os valores de coeficiente de partição (CLog P) foram calculados empregando-se o método de Ghose-Pritchett-Crippen⁵, considerando somente as formas neutras dos derivados quinolínicos e da cloroquina.

Resultados e Discussão

As análises conformacionais dos derivados quinolínicos apresentaram confômeros de energia mínima com gradiente inferior a 5 kcal/mol. Tal propriedade permite classificá-los como isoenergéticos⁶. Os confômeros resultantes podem ser visualizados às Figuras 2 a 5. Para os derivados contendo o grupo cinamil, **11** e **12**, são apresentados apenas os confômeros correspondentes às maiores e menores energias mínimas (Figuras 4 e 5).

Figura 2- Conformêros obtidos na análise conformacional randômica e respectivas energias de 5.

Figura 3 – Conformêros obtidos na análise conformacional randômica e respectivas energias de 6.

Figura 4 – Confôrmeros de menor e de maior energia obtidos na análise conformacional randômica de **11**.

Figura 5 – Confôrmeros de menor e de maior energia obtidos na análise conformacional randômica de **12**.

Pode-se observar nestes conformêros a variação, em especial, de orientação da cadeia alil ou cinamil, bem como dos átomos oxigênio e hidrogênio da hidroxila. Estas orientações são expressas numericamente através dos valores de ângulos diedros e distâncias interatômicas apresentadas em conjunto aos valores de energia e frequência dos diferentes conformêros às Tabelas II a V.

Tabela II - Valores de energia, frequência, ângulo diedros e distâncias interatômicas dos conformêros resultantes da análise conformacional de 5

Conformêro	Energia (kcal/mol)	Frequência	θ_1 (°) ^a	θ_2 (°) ^b	d_1 (Å) ^c	d_2 (Å) ^d	d_3 (Å) ^e
01	44,61	06	81,2	234,3	3,38	3,76	2,63
02	45,87	06	271,3	233,0	3,54	3,62	2,85
03	46,25	08	27,1	117,5	3,45	3,64	4,42
04	46,33	13	91,3	360,0	3,51	3,63	4,15

^a Diedro correspondente aos átomos C₄, C₃, C₁₀ e C₁₁.

^b Diedro correspondente aos átomos C₃, C₁₀, C₁₁ e C₁₂.

^c Distância interatômica entre O e C₁₁.

^d Distância interatômica entre C₉ e C₁₁.

^e Distância interatômica entre H da OH e C₁₁.

Tabela III - Valores de energia, frequência, ângulos diedros e distâncias interatômicas dos conformêros resultantes da análise conformacional de 6

Conformêro	Energia (kcal/mol)	Frequência	θ_1 (°) ^a	θ_2 (°) ^b	d_1 (Å) ^c	d_2 (Å) ^d
01	40,51	7	273,2	239,2	3,62	3,64
02	40,75	6	86,0	239,1	3,61	3,66
03	41,26	7	87,0	2,5	3,65	3,67

^a Diedro correspondente aos átomos C₄, C₃, C₁₀ e C₁₁.

^b Diedro correspondente aos átomos C₃, C₁₀, C₁₁ e C₁₂.

^c Distância interatômica entre Cl e C₁₁.

^d Distância interatômica entre C₉ e C₁₁.

Tabela IV - Valores de energia, frequência, ângulos diedros e distâncias interatômicas dos conformêros resultantes da análise conformacional de 11

Conformêro	Energia (kcal/mol)	Frequência	θ_1 (°) ^a	θ_2 (°) ^b	d_1 (Å) ^c	d_2 (Å) ^d	d_3 (Å) ^e
01	59,97	05	80,6	233,1	3,38	3,77	2,64
02	60,17	11	279,6	127,5	3,37	3,77	2,63
03	60,59	07	278,5	353,8	3,44	3,78	2,70
04	60,65	13	277,4	355,7	3,46	3,77	2,71
05	60,78	10	86,9	120,4	3,40	3,67	4,37
06	60,88	17	87,7	125,4	3,54	3,63	2,87
07	61,06	06	86,2	244,3	3,38	3,67	4,00
08	61,22	13	272,6	114,5	3,41	3,66	4,38
09	61,99	10	92,4	355,2	3,54	3,62	4,51
10	62,01	07	277,8	4,9	3,54	3,62	4,50

^a Diedro correspondente aos átomos C₄, C₃, C₁₀ e C₁₁;^b Diedro correspondente aos átomos C₃, C₁₀, C₁₁ e C₁₂;^c Distância interatômica entre O e C₁₁;^d Distância interatômica entre C₉ e C₁₁;^e Distância interatômica entre H da OH e C₁₁.

Tabela V - Valores de energia, frequência, ângulos diedros e distâncias interatômicas dos conformêros resultantes da análise conformacional de 12

Conformêro	Energia (kcal/mol)	Frequência	θ_1 (°) ^a	θ_2 (°) ^b	D_1 (Å) ^c	D_2 (Å) ^d
01	53,30	18	272,6	239,0	3,62	3,63
02	53,40	14	274,4	120,5	3,60	3,66
03	53,43	14	273,0	239,1	3,62	3,63
04	53,48	14	274,7	119,9	3,60	3,67
05	54,01	06	86,8	2,5	3,65	3,67
06	54,11	14	86,8	2,3	3,65	3,67

^a Diedro correspondente aos átomos C₄, C₃, C₁₀ e C₁₁;^b Diedro correspondente aos átomos C₃, C₁₀, C₁₁ e C₁₂;^c Distância interatômica entre Cl e C₁₁;^d Distância interatômica entre C₉ e C₁₁.

O critério de escolha da conformação de energia mínima seguiu àquele de mínimo global apontado pela análise conformacional, com exceção do derivado **11**. Para este, selecionou-se o confômero de segunda menor energia (Confômero 2, Tabela IV), que apresentava o grupo cinamil em orientação semelhante à do derivado **12**, escolha corroborada por análise de espectrometria de RMN ^1H .

Os confômeros selecionados apresentam a cadeia lateral contendo o grupo alil ou cinamil, em diferentes orientações. Estas diferenças podem ser compreendidas em função, especialmente, do efeito eletrônico e/ou estérico dos substituintes presentes na posição 4 do anel quinolínico, hidroxila e cloro. Nos confômeros de **5** e **11** pode-se observar a orientação dos carbonos da dupla ligação (C_{11} e C_{12}) como forma de estabilizar o hidrogênio da hidroxila, que encontra-se orientado em relação a esta ligação. Nos confômeros de **6** e **12**, a natureza rica em elétrons e o tamanho do átomo de cloro tendem a afastar os grupos alil e cinamil, respectivamente, também ricos em elétrons. Tais observações podem ser quantificadas por análise dos ângulos diedros θ_2 (C_3 , C_{10} , C_{11} e C_{12}) menores para **5** ($234,3^\circ$) e **11** ($127,5^\circ$) quando comparados aos correspondentes de **6** ($239,2^\circ$) e **12** ($239,0^\circ$). Associam-se a esta análise, as menores distâncias interatômicas entre o oxigênio da hidroxila e o primeiro carbono da dupla ligação, C_{11} , de **5** ($3,38 \text{ \AA}$) e **11** ($3,37 \text{ \AA}$), quando comparadas à distância de $3,62 \text{ \AA}$ entre o átomo de cloro e C_{11} em **6** e **12**. Ressalta-se ainda, as menores distâncias entre o hidrogênio da hidroxila e C_{11} , observadas para os confômeros de menor energia de **5** e **11** (Tabelas II e IV). As distâncias interatômicas entre o carbono da metila C_9 e C_{11} não se mostraram significativas.

Em auxílio a esta discussão, os confômeros selecionados para **5**, **6**, **11** e **12** são apresentados à Figura 6 nas representações de tubo e de CPK (Corey-Pauling-Koltun, modelo baseado nos raios de van der Waals). As sobreposições atômicas destes

confôrmeros, apresentadas às Figuras 7 e 8, permitem visualização complementar das diferentes orientações da cadeia lateral entre os pares **5 - 6** e **11 - 12**, respectivamente.

Figura 6 – Confômeros de energia mínima selecionados para **5**, **6**, **11** e **12** nos modelos tubo (A) e CPK (B), mantidos sobre a mesma orientação.

Figura 7 – Sobreposição dos conformeros de energia mínima selecionados de **5** e **6**, considerando-se os átomos de nitrogênio e carbono do anel quinolínico (A); conformeros individuais (B). Átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio da 2-metilquinolina em cinza; OH e grupo alil de **5** em vermelho; Cl e grupo alil de **6** em verde.

Figura 9 – Sobreposição dos conformeros de energia mínima selecionados de **11** e **12**, considerando-se os átomos de nitrogênio e carbono do anel quinolínico (A); conformeros individuais (B). Átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio da 2-metilquinolina em cinza; OH e grupo alil de **11** em vermelho; Cl e grupo alil de **12** em verde.

A análise da distribuição de cargas parciais mostra maior valor absoluto para o oxigênio da hidroxila em **5** e **11**, em relação ao cloro em **6** e **12**. De maior carga elétrica são os átomos componentes do anel quinolínico e carbonos da dupla ligação dos derivados hidroxilados em relação ao observado para os derivados com cloro (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição de cargas (au) dos derivados **5** e **11** (vermelho) e **6** e **12** (verde), calculadas por método AM1, módulo MOPAC.

Os mapas de potencial eletrostático (MEPs), apresentados sobre a forma de distribuição eletrônica contínua (item A) e discreta (item B) às Figuras 10 (visão anterior) e 11 (visão posterior), indicam semelhantes características. Regiões de maior densidade eletrônica (cor azul a violeta) são observadas sobre o anel quinolínico e cadeia lateral de cada derivado. As regiões do anel quinolínico de **5** e **11** mostram maior extensão de densidade eletrônica em relação às regiões correspondentes de **6** e **12**, melhor visualizadas na representação discreta. Estas diferenças podem ser associadas à carga parcial negativa observada para a hidroxila em relação ao cloro (Figura 9) bem como ao

maior efeito doador de elétrons da hidroxila ($\sigma_p = -0,37$) em comparação ao efeito do cloro ($\sigma_p = 0,23$)⁷. Tais propriedades implicariam em maior potencial eletrostático do anel quinolínico com substituinte hidroxila na posição 4. O efeito eletro-doador da hidroxila também estaria representado pela maior densidade eletrônica sobre a região correspondente ao oxigênio (azul intenso) quando comparada à do cloro (azul menos intenso). De igual modo, a maior extensão da densidade eletrônica sobre a cadeia lateral contendo o grupo cinamil, indicaria a presença de provável sítio adicional à interação do derivado quinolínico com o receptor, acreditado ser o grupo heme⁸.

Nota-se ainda nos MEPS, a interação do hidrogênio da hidroxila, região de baixa densidade eletrônica (representada pela cor vermelha intensa), com a dupla ligação do grupo alil (**5**) ou cinamil (**11**), comprovando a orientação observada nos confôrmeros de menor energia apontados na análise conformacional. Ao mesmo tempo, a densidade eletrônica do átomo de cloro (azul menos intenso) e a maior densidade na cadeia lateral (cor violeta) dos derivados **6** e **12**, explicariam as orientações opostas ao cloro dos grupos alil e cinamil nos confôrmeros de menor energia.

Considera-se também importante salientar que região de alta densidade eletrônica é observada sobre o anel quinolínico da cloroquina. À Figura 12 estão apresentados os mapas de potencial eletrostático da cloroquina às visões anterior e posterior, nas distribuições contínua (A) e discreta (B).

Figura 10 - Mapas de potencial eletrostático (MEPs) dos derivados **5,6,11** e **12** utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de -15 (violeta) a + 15 (vermelho) kcal/mol, com destaque ao anel quinolínico (visão anterior). As respectivas orientações dos derivados quinolínicos estão representadas

no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

Figura 11- Mapas de potencial eletrostático (MEPs) dos derivados **5,6,11** e **12** utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de -15 (violeta) a + 15 (vermelho) kcal/mol, com destaque ao anel quinolínico (visão posterior). As respectivas orientações dos derivados quinolínicos estão

representadas no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

Figura 12- Mapas de potencial eletrostático (MEPs) de **CQ**, utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de -15 (violeta) a + 15 (vermelho) kcal/mol, com destaque ao anel quinolínico (visão anterior e posterior). As respectivas orientações dos derivados quinolínicos estão representadas no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

A energia de orbitais moleculares de HOMO (Tabela VI) apresentou maior valor para os derivados **5** e **11** (- 8,81 eV), sendo este mais próximo ao de **CQ** (- 8,36 eV). Cabe ressaltar que, embora **5** e **11** possuam o mesmo valor de energia de HOMO, o nível orbitalar em **11** é mais elevado e menos distante do que em **CQ**. Menores valores foram observados para os derivados com cloro, **12** (- 8,97 eV) e **6** (- 9,11). Como em **11**, o nível orbitalar em **12** é mais próximo ao de **CQ**, salientando a

importância do grupo cinamil à atividade antiplasmodica. Estes resultados ainda fortalecem a contribuição eletro-doadora da hidroxila na posição 4 do anel quinolínico, como discutido anteriormente.

Contribuição semelhante da hidroxila pode ser verificada nos valores de energia de LUMO (Tabela VI), em que os derivados **5** (- 0,15 eV) e **11** (- 0,23 eV) estão mais próximos ao valor da cloroquina (- 0,07 eV). Nota-se ainda, a menor contribuição eletro-doadora do grupo alil em relação ao cinamil, uma vez que, independente do substituinte na posição 4, os derivados **5** e **6** têm maior valor de energia de LUMO do que os correspondentes com o grupo cinamil, **11** e **12**.

Salienta-se, por fim, a observação de relação inversamente proporcional entre os valores de intervalo das energias dos orbitais moleculares de HOMO e LUMO de cada derivado e da cloroquina (Tabela VI) e os valores de EC₅₀ associados aos respectivos intervalos de confiança: quanto menor o intervalo das energias (valor absoluto), maior a atividade antiplasmodica. Tal relação sugeriria a importância dos grupos cinamil e hidroxila como substituintes do anel quinolínico, nas posições 3 e 4, respectivamente.

Atribui-se ao intervalo de energia dos orbitais moleculares a capacidade de auxiliar na predição da formação de complexo entre derivados quinolínicos e o provável sítio de ação, o grupo heme. Interações como a *π-stacking* estariam envolvidas neste mecanismo⁹.

Tabela VI – Valores de energia de orbitais moleculares de HOMO e LUMO, com os respectivos níveis orbitais, e o intervalo entre os orbitais

Composto	HOMO (eV)	Nível orbitalar	LUMO (eV)	Nível orbitalar	Intervalo HOMO- LUMO (eV)
5	- 8,81	38	- 0,15	40	- 8,66
6	- 9,11	38	- 0,28	40	- 8,83
11	- 8,81	52	- 0,23	54	- 8,57
12	- 8,97	52	- 0,31	54	- 8,66
CQ	- 8,36	60	- 0,07	62	- 8,29

Os mapas de distribuição dos orbitais moleculares de HOMO mostram maior concentração no anel quinolínico nos derivados **5**, **6** e **11** (Figura 13A). Distribuição semelhante é encontrada em **5** e **6**, porém com sinais opostos, o que pode ser visualizado pela alternância das superfícies orbitais negativa (cor azul) e positiva (cor vermelha). Esta semelhança de distribuição poderia estar associada aos valores próximos de atividade biológica observados para **5** (7,722 mM) e **6** (8,393 mM). O derivado **11** apresenta distribuição de superfícies orbitais concentrada no anel quinolínico, hidroxila e metila, com extensão à cadeia lateral contendo o grupo cinamil. A distribuição peculiar de HOMO em **11** poderia estar relacionada à maior atividade antiplasmodica (0,112 mM), uma vez que a superfície de HOMO é parâmetro representativo da capacidade doadora de elétrons em mecanismos que envolvam interações π -stacking. Contribuem a esta hipótese, a maior distribuição das superfícies orbitais sobre o anel quinolínico e o valor de EC₅₀ (0,127 mM) de **CQ**. Ao contrário, a predominância de orbitais moleculares na cadeia lateral de **12**, associada à menor atividade antimalárica (0,352 mM), em relação aos mais ativos **11** e **CQ**, evidenciam a importância primordial do anel quinolínico para a ocorrência do efeito biológico.

Concentração de orbitais moleculares de LUMO é observada sobre o anel quinolínico de todos os derivados e a cloroquina (Figura 13B). Entretanto, somente **11** apresenta distribuição de superfícies orbitales negativa (cor azul) e vermelha (cor vermelha) idêntica à de **5**.

Associando-se esta análise aos resultados de energia de orbital molecular de HOMO e LUMO (Tabela VI) e, em especial, ao intervalo destas energias, presume-se que o grupo cinamil presente, em relação ao alil, maior contribuição ao efeito biológico desejado.

Figura 13A – Distribuição de superfícies orbitales de HOMO para os derivaods 5,6,11,12 e CQ na faixa de - 0,03 (azul) a + 0,03 (vermelho) eV, calculadas por método AM1, módulo MOPAC.

Figura 13B – Distribuição de superfícies orbitales de LUMO para os derivaods 5,6,11,12 e X na faixa de - 0,045 (azul) a + 0,045 (vermelho) eV, calculadas por método AM1, módulo MOPAC.

A análise dos mapas de potencial lipofílico (MLPs) apresentados sobre a forma de distribuição eletrônica contínua (item A) e discreta (item B) nas Figuras 14 (visão anterior) e 15 (visão posterior), mostra serem os derivados com a hidroxila como substituinte na posição 4 do anel quinolínico, **5** e **11**, menos lipofílicos (mapas com predominância da cor azul) do que os com cloro nesta posição, **6** e **12** (mapas com predominância da cor marrom). Tal observação relaciona-se ao caráter lipofílico destes substituintes, que pode ser representado pelos respectivos valores de π , constante de hidrofobicidade de Hansch, de - 0,67 (OH) e 0,71(Cl)⁷ e visualizados pelas cores azul e marrom intenso sobre as regiões correspondentes nos MLPs. Associa-se a esta diferença, a maior lipofilicidade promovida pelo grupo cinamil, visualizada no anel quinolínico pela menor intensidade de cor azul nos derivados hidroxilados, como também pelo aumento da extensão da cor marrom nos derivados clorados (em destaque no item B das Figuras 14 e 15). Esta última observação deve-se à maior natureza apolar do grupo cinamil em relação ao alil.

As diferenças de caráter lipofílico apresentadas nos MLPs encontram paralelismo aos valores calculados de coeficiente de partição (CLog P). Menores coeficientes foram observados para os derivados **5** (3,39) e **11** (4,84), em relação a **6** (4,32) e **12** (5,75). Estes valores também expressam a contribuição positiva do grupo cinamil à lipofilicidade dos compostos.

O MLP da cloroquina (Figura 16), mostra no anel quinolínico regiões de menor caráter lipofílico, próxima ao nitrogênio (cor azul), e de maior lipofilicidade, próxima ao cloro (cor marrom intenso). Embora ilustrada em faixa de potencial mais restrita, esta dualidade reproduz o caráter menos lipofílico dos derivados **5** e **11**, e mais lipofílico dos clorados **6** e **12**. Também intermediário é o respectivo CLog P de **CQ** (4,26), valor próximo ao experimental (4,63)¹⁰.

A análise conjunta dos MLPs e CLog P dos derivados quinolínicos, **5,6,11** e **12**, e da cloroquina, **CQ**, em relação aos valores de EC_{50} e respectivos intervalos de confiança (Tabela I), indica a lipofilicidade como propriedade importante para a atividade antiplasmódica, uma vez que os derivados mais lipofílicos, contendo o grupo cinamil na cadeia lateral, foram os mais ativos da série. Entretanto, tal análise também sugere a ocorrência de um valor ótimo de lipofilicidade, próximo ao da cloroquina, observado para o derivado **11**. Tem-se ainda por esta análise, a substituição da hidroxila (**11**) por cloro (**12**), conduziu a aumento de caráter lipofílico que se mostrou prejudicial à atividade biológica.

Figura 14 Mapas de potencial lipofílico (MLPs) dos derivados **5**, **6**, **11** e **12** utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de 0,089 (azul) a 0,180 (marrom) kcal/mol, com destaque ao anel quinolínico (visão anterior). As respectivas orientações dos derivados quinolínicos estão representadas no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

Figura 15 - Mapas de potencial lipofílico (MLPs) dos derivados **5,6,11** e **12** utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de 0,089 (azul) a 0,180 (marrom) kcal/mol, com destaque ao anel quinolícnico (visão posterior). As respectivas orientações dos derivados quinolífnicos estão representadas no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

Figura 16 - Mapas de potencial lipofílico (MLPs) de **CQ** utilizando superfície Connolly, apresentados em distribuição contínua (A) e discreta (B), na faixa de 0,062 (azul) a 0,124 (marrom) kcal/mol, com destaque ao anel quinolínico (visão anterior e posterior). As respectivas orientações dos derivados quinolínicos estão representadas no modelo tubo (C): átomos de carbono na cor cinza, átomo de nitrogênio em azul, cloro em verde e átomos de hidrogênio em azul ciano.

Conclusões

Ao realizar o estudo de modelagem molecular verificou-se que a natureza e posição dos substituintes no anel quinolínico são determinantes à atividade biológica. Os substituintes na posição 3, grupo alil ou cinamil, e na posição 4, hidroxila ou cloro, demonstraram promover combinações importantes a respeito dos aspectos estérico, eletrônico e lipofílico.

Interação eletrostática entre o hidrogênio da hidroxila e os carbonos da dupla ligação presente no grupo alil em **5**, ou cinamil em **11**, conduziu aos confôrmeros de menor

energia mínima, indicando ser a orientação da cadeia lateral aspecto estérico importante. Associa-se a isto, a repulsão exercida pelo átomo de cloro sobre a orientação destes grupos. Verifica-se assim, a contribuição dos aspectos estérico e eletrônico à maior estabilidade conformacional.

Efeito eletrônico doador de elétrons da hidroxila fez-se notar na distribuição das cargas parciais de menor valor para os derivados **5** e **11**. O aspecto eletro-doador proporcionou também, a maior extensão da densidade eletrônica sobre a região do anel quinolínico nos MEPs destes derivados. Semelhante densidade eletrônica é vista no anel quinolínico de **CQ**, cloroquina, o antimalárico ensaiado como protótipo.

O efeito eletrônico dos grupos substituintes nas posições 3 e 4 do anel quinolínico é também observado nos valores de energia dos orbitais moleculares de HOMO e LUMO. A relação inversamente proporcional verificada entre os intervalos de energia dos orbitais moleculares de HOMO e LUMO e atividade biológica ressalta a importância do grupo cinamil e da hidroxila.

Os mapas dos orbitais moleculares de HOMO e de LUMO de **5**, **6**, **11** e **12** associam-se aos respectivos valores de atividade biológica, indicando que a predominância de distribuição de superfícies orbitais sobre o anel quinolínico, igualmente observada em **CQ**, é fator relevante à atividade biológica. Contribuição secundária é conferida ao grupo cinamil, corroborando o visto nos MEPs e valores de energia de orbitais moleculares HOMO e LUMO e respectivos intervalos. Em relação à interação com o provável receptor, o grupo cinamil poderia constituir sítio adicional, por exemplo, na interação com os grupos vinil e propionílico presentes na estrutura do heme.

O aspecto lipofílico mostra-se presente. Através dos MLPs, observou-se as maiores contribuições dos grupos cloro e cinamil à lipofilicidade dos compostos. Entretanto, limite a esta contribuição parece ser importante, uma vez que o derivado **12**, de maior valor CLog P, mostrou-se cerca de três vezes menos ativo do que **11**. A avaliação CLog P

versus EC₅₀ (incluindo os respectivos intervalos de confiança) parece sugerir valor de lipofilicidade ótima, próximo ao de CQ, para a maior atividade biológica.

A análise final destes resultados faz crer na importância primordial do anel quinolinico, substituído por grupo cinamil (posição 3), seguido da hidroxila (posição 4), para a atividade antiplasmódica destes novos derivados. Estudos futuros de modelagem molecular envolvendo a interação com o grupo heme serão de determinante auxílio à afirmação desta hipótese e direcionamento de novos planejamentos.

Referências bibliográficas

- 1- Halgren TA. MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.*, **20**: 730-748, 1999.
- 2- Dear MJS, Zoebisch EG, Heally EF, Stewart JJP. AM1: a new general purpose quantum mechanical model. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**: 3902-3909, 1985.
- 3 - Bhattacharjee AK, Karle JM. Molecular electronic properties of a series of 4-quinolinecarbinolamines define antimalarial activity profile. *J. Med. Chem.*, **39**: 4622-4629, 1996.
- 4 – Menezes CMS, Sant’Anna CMR, Rodrigues CR, Barreiro EJ. Molecular modeling of novel 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives designed as isosters of the antimalarial mefloquine. *J Mol Struct (Theochem)*, **579**: 31-39, 2002
- 5 – Ghose AK, Pritchett A, Crippen GM. Atomic physicochemical parameters of three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: Modeling hydrophobic interactions. *J Comput. Chem.*, **9**: 80-90, 1988.
- 6 - 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. pp. 23-26.
- 7 - Kubinyi H. QSAR: Hansch analysis and related approaches In: Manhold R, Kroogsgaard-Larsen P, Timmerman H (Eds.) *Methods and principles in medicinal chemistry*. vol. 1. Weinheim: VCH, 1993, pp. 23.
- 8 - Pandey AV, Babbarwal VK, Okoyeh JN, Joshi RM, Puri SK, Singh RL, Chauhan VS. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**: 736-743, 2003.
- 9 - Buller R, Peterson ML, Almarson Ö, Leiserowitz L. Quinoline binding site on malaria pigment crystal: a rational pathway for antimalaria drug design. *Crystal Growth Des.*, **6**: 553-562, 2002.
- 10 – Craig PN. Drug compendium In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB (Eds.) *Comprehensive medicinal chemistry*. vol. 6. Oxford: Pergamon Press, 1990, pp. 373.