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

Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de fármacos
dirigidos de antimetabólitos de serina

Guilherme Costa Matsutani

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015125

Ficha Catalográfica

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

Matsutani, Guilherme Costa

M434an Antimaláricos potenciais : planejamento e síntese de
fármacos dirigidos de antimetabólitos de serina / Guilherme
Costa Matsutani. -- São Paulo, 2008.
138p.

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

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica
2. Quimioterápicos : Química farmacêutica 3. Malária :
Quimioterapia I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Guilherme Costa Matsutani

Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de fármacos
dirigidos de antimetabólitos de serina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 17 de setembro de 2008.

**“...Se vi um pouco mais longe
foi porque estive apoiado
sobre os ombros de
Gigantes...”**

Sir Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

- À professora titular Elizabeth Igne Ferreira, pelo exemplo de dedicação ao seu trabalho e aos seus orientados;
- À minha mãe Regina Glycia Matsutani, por uma vida de trabalho, luta, dedicação e amor a mim e à minha família;
- Ao meu pai Akira Matsutani, pelo exemplo de homem, pai, humano a ser seguido;
- À professora Nilsa Wadt, por todo incentivo e apoio desde os tempos de graduação;
- À professora Sonia Gil, pela primeira oportunidade na carreira acadêmica;
- À minha Tia Glicéria Costa, pela moradia, apoio e principalmente amizade nos momentos mais difíceis;
- Aos meus irmãos Nelson Freitas, Regis Costa de Freitas e Fábio de Freitas, que, mais do que irmãos, são verdadeiros pais;
- À parceira de laboratório Kátia Botelho, pela paciência diária;
- Ao Colega de laboratório Gustavo Trossini, pela amizade e troca de idéias;
- Aos doutores Diogo de Oliveira Silva e Iguatemi Costa, por todos os ensinamentos e parceria;
- Ao doutor Hélio Santa Rosa Costa e Silva, pelas intermináveis discussões em português e inglês;

- À Rachel e ao Sérgio Salvarani, por terem me recebido em sua casa como um filho;
- Aos meus grandes amigos Israel Clemente, Renato Salvarani e Christian Souza Santos, assim com a suas famílias, por todo incentivo, amizade e carinho;
- Às amigas Juliana Paiva e Maria Carolina Pimentel, por todo apoio e amizade;
- Aos amigos Margareth Cunha, Tatiana Rinaldi, Leonel Costa, por toda ajuda e apoio;
- À amiga Claudia Rizzi, por sempre acreditar e incentivar;
- Aos orientados Gerson Bando e Bianca Lopes, por todo apoio e companheirismo;
- A Afro Torquato e sua família por todo apoio e carinho;
- À Universidade de Mogi das Cruzes e à coordenadora do Curso de Farmácia, Professora Regina Costa, por permitir o uso do Celfarm para a execução deste trabalho;
- Ao coordenador do curso de Farmácia da Universidade Braz Cubas, professor André Luis Moura;
- Ao coordenador do Curso de Farmácia da Universidade de Mogi das Cruzes professor Tiago Rodrigues
- A todos que participaram de forma direta ou indireta deste trabalho.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Distribuição geográfica.....	2
2.2 Espécies de plasmódios.....	6
2.3 Ciclo biológico do parasito.....	7
2.3.1.Modificações nas Membranas de Eritrócitos	9
Infectados.....	
2.4.Patogenia.....	12
2.5 Quimioterapia da Malária	14
2.5.1 Histórico.....	14
2.5.2.Classificação dos quimioterápicos	16
2.5.2.1Classificação quanto à ação no ciclo	
biológico.....	17
2.5.2.2 Classificação Química.....	18
2.5.3 Quimioterapia e Resistência.....	43
2.5.4 Novas Tendências na Luta Antimalárica.....	45
2.5.4.1 Novos Alvos Bioquímicos	46
2.6 Planejamento do Antimalárico Potencial.....	52
3. Objetivos e Justificativa.....	54
3.1 Planejamento das Sínteses.....	56
3.1.1 Síntese dos bioisósteros heterocíclicos de serina.....	56
3.1.1.1 Liberação do grupo <i>O-t</i>-butil.....	57
3.1.2. Síntese dos diglicerídios.....	58
3.1.3 Obtenção dos fosfolipídeos.....	58
3.1.4 Condensação dos antagonistas pretendidos com os	
fosfolipídeos.....	

3.1.4.1 Clivagem do grupo Fmoc do fármaco dirigido.....	59
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 Material.....	60
4.1.2 Equipamentos.....	61
4.2 Métodos.....	61
4.2.1 Síntese dos bioisósteros de serina sob refluxo.....	61
4.2.1.1 <i>Síntese do derivado diidroimidazólico protegido com NH-Fmoc-O-t-butil.....</i>	61
Experimento 1.....	62
Experimento 2.....	62
A. SÍNTESE DA OXAZOLINA PROTEGIDA COM NH-Fmoc-O-t-butil.....	62
B. SÍNTESE DO DERIVADO DIIDROOXATIÓLICO PROTEGIDO COM NH-Fmoc-Ot-butil..	63
C. SÍNTESE DO DERIVADO DIIDROXAZÍNICO PROTEGIDO.COM NH-Fmoc-O-t-buti.....	63
4.2.2 Síntese dos bioisósteros de serina utilizando ultrassom	64
4.2.3 Desproteção do grupo O-t-butil dos derivados obtidos.....	66
4.2.3.1 Com ácido fórmico.....	66
4.2.3.2 Com ácido tricloroacético.....	66
4.2.3.3 Com ácido trifluoracético.....	66
4.2.4 Desproteção do grupo Fmoc dos derivados heterocíclicos de serina.....	67
4.2.4.1 Desproteção do grupo Fmoc dos derivados heterocíclicos de serina e formação de cloridrato.....	68
4.2.5 Síntese dos transportadores diglicerídicos.....	68
Experimento 1.....	68
Experimento 2.....	68
Experimento 3.....	69
4.2.6.Fosfodiestearilglicerol.....	69
4.2.7.Análise Conformacional do 2,3-dibromo-1-propanol.....	70

4.3. Análises	70
4.3.1 Análise cromatográfica	70
4.3.1.1 Por CCD	70
4.3.1.2 Por CLAE	70
4.3.2 Análises espectrométricas	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Síntese dos bioisósteros de serina com refluxo	71
5.1.1 Síntese do derivado diidroimidazólico	71
5.1.2 Síntese do derivado diidroxazólico	73
5.1.3 Síntese do derivado diidrooxatiólico	75
5.1.4 Síntese do derivado diidroxazínico	77
5.2 Síntese dos bioisósteros de serina por ultrassom	78
5.3 Desproteção do grupo O-<i>t</i>-butil dos bioisósteros de serina	86
5.4. Desproteção do grupo NH-Fmoc	93
5.5 Formação dos bioisósteros de serina	96
5.6 Síntese dos diglicerídios	114
6. CONCLUSÕES	122
7. PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO	123
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
9. Anexo	139

Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de fármacos dirigidos de antimetabólitos da serina

Pós-graduando: Guilherme Costa Matsutani

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

RESUMO

Palavras-chave: Antimaláricos. Fármacos dirigidos. Fosfolipídeos. Antimetabólitos. Serina

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, AIDS, malária e tuberculose são as três maiores doenças infectantes do mundo,, atingindo principalmente crianças. Regiões paupérrimas e de clima tropical, como a África sub-saariana, são as mais atingidas. Este quadro agrava-se com a disseminação de cepas do Plasmodium falciparum resistentes à cloroquina e multi-resistentes. Além disso, alguns fármacos utilizados na terapêutica da malária apresentam vários efeitos adversos, comprometendo o tratamento. Trata-se de um grande desafio e o seu enfrentamento requer estratégias. O desenvolvimento de novos quimioterápicos deve fundamentar-se em diferenças bioquímicas e morfológicas entre as células do hospedeiro e do parasita. A biossíntese de fosfolipídeos de membrana em parasitas do grupo Apicomplexa é de extrema importância para a maturação e a reprodução do parasita e constitui-se em bom alvo para novos antimaláricos, uma vez que é encontrada somente em parasitas. Hemácias infectadas têm sua absorção modificada em relação aos eritrócitos não-infectados, conferindo seletividade a substâncias como lipídeos. O trabalho em questão propõe a síntese de antimetabólitos da serina, visando à inibição das enzimas fosfatidilserina síntase e serina descarboxilase, fundamentais para a biossíntese de fosfolipídeos de membrana desses parasitas.. Cinco derivados heterocíclicos da serine foram sintetizados: derivados diidroimidazólico, diidroxazólico, diidroxazínico, diidropirimidínico e diidrooxatiólico. Também, o transportador fosfolipídico com o ácido esteárico foi sintetizado. Os antimetabólitos serão acoplados a esse e outros fosfolipídeos, obtendo-se fármacos dirigidos específicos direcionados seletivamente a eritrócitos infectados.

New Potential Antimalarials: Design and Synthesis of Targeted Serine Antimetabolic Drugs

Key-words: *Antimalarials. Targeted drugs. Phospholipids. Antimetabolic drugs. Serine.*

According to the World Health Organization, Aids, malaria and tuberculosis are the three greatest infectious diseases in the world. Children are the most involved in those diseases. Extremely poor regions, as sub-Saharan, Africa, are the most affected. In the worst case scenario, one of the parasites that causes malaria, Plasmodium falciparum, become resistant to chloroquine and the current therapy. Besides, some drugs used in the malaria chemotherapy are very toxic, showing many side effects, and compromising the treatment. This is a big challenge and facing it requires new strategies.. The development of chemotherapeutic has been inspired in biochemical differences between the parasite and the host. Plasmodium falciparum needs to biosynthesize phospholipids for their membrane. These phospholipids are very important to the maturation and reproduction of the parasite and occur only in it.. This makes the phospholipids biosynthesis a good target for new and specific antimalarial drug design. Infected red blood cell shows modified permeation, allowing the lipids to be freely transported, what is not usual in the non-infected red blood cells. This said, in the present work the design and synthesis of serine metabolic inhibitors, using the bioisosteric strategy, have been proposed. The inhibition of the phosphatidylserine biosynthesis, an important phospholipid, is expected. These inhibitors will be linked to phospholipids, to promote the selective permeation to the infected red-blood cell. . These inhibitors will be linked to phospholipids, to promote the selective permeation to the infected red-blood cell. In the present work five heterocyclic serine inhibitors: diidroimidazolic, diidroxazolic, diidroxazinico, diidropyriminic and diidroxatiolic. Also synthesized a phospholipid to be connected to the heterocyclic inhibitors.

1.INTRODUÇÃO

Considerada doença social, por estar relacionada com pobreza e falta de condições sanitárias adequadas, a malária é uma das moléstias que causou e ainda causa mais sofrimento ao ser humano¹.

A palavra malária é de origem italiana e significa “Mal ar”,² pois, inicialmente, se acreditava que a doença estava ligada às águas paradas e aos insetos oriundos destas águas. Esta teoria foi confirmada por Meckel no início do século XIX, quando conseguiu visualizar pela primeira vez o agente causador da parasitose. Em 1878, Laveram classificou o parasito como *Oscillaria malariae*, posteriormente classificado como *Plasmodium falciparum*.

Atualmente, esta parasitose é uma das mais disseminadas doenças endêmicas nas áreas tropicais e subtropicais^{3, 4}. Mais de 40% da população mundial em 101 países encontram-se sob áreas de risco de contaminação. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a malária está entre as três maiores doenças infecciosas do planeta, sendo comparada com a AIDS e tuberculose pelo número de infectados e pelo risco de contrair a parasitose⁵.

Este quadro agrava-se devido ao aparecimento de formas resistentes de *P. falciparum*, o agente causador da forma mais agressiva da parasitose. Mudanças climáticas e o desflorestamento também têm contribuído para o aumento do número de infectados⁶. Estas mudanças levam ao favorecimento da multiplicação do mosquito *Anopheles*, que atua como agente transmissor da doença, assim como à exposição dos humanos ao mosquito infectado.

Anualmente, registram-se no mundo 300 a 500 milhões de casos clínicos, 90% deles na África sub-Sahariana, onde a pobreza predomina. Não existem dados precisos, porém acredita-se que a mortalidade causada pela malária seja da ordem de um milhão de pessoas por ano, atingindo, principalmente, crianças⁵.

Estima-se que uma criança morra a cada 40 segundos, resultando na perda de mais de 2000 crianças por dia devido à parasitose¹. A malária possui estreita relação com pobreza e subdesenvolvimento sócioeconômico, uma vez que se expande em áreas muito pobres, levando a população a perder sua

capacidade de trabalho, aprendizagem e desenvolvimento, promovendo aumento das contaminações pela doença, como um ciclo virtuoso. Portanto, nas regiões em que a malária evoluiu muito, a sociedade prosperou pouco¹.

Diversos programas sociais vêm sendo desenvolvidos para o controle da parasitose, principalmente nas áreas mais pobres, onde a doença aumenta constantemente. Estes programas consistem em melhorias sanitárias, erradicação do mosquito através de aplicação do inseticida DDT em lagoas e pontos de água parada, utilização de “mosquiteiros” sobre camas e, o mais importante, educação da população quanto aos perigos da malária e como evitar o contágio⁵.

A despeito destes programas e mesmo com os avanços na terapêutica, a malária é uma doença sem controle total e de preocupação mundial. Há, pois, necessidade de se investir na pesquisa da parasitose nos vários segmentos, sobretudo no planejamento de novos e melhores antimaláricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição geográfica

Acredita-se que esta doença tenha sido responsável pela derrocada de exércitos e até mesmo de impérios, como por exemplo o império romano²

Estudos mostram que ela se propagou principalmente durante as grandes guerras mundiais, nas quais as condições sanitárias eram as piores possíveis e os soldados tornavam-se grande transmissores da doença².

A malária apresenta sua maior concentração nos trópicos, onde a temperatura se encontra entre 20 e 30 °C e a umidade é alta. Estas condições e a umidade favorecem a multiplicação do anofelino, transmissor da parasitose^{2, 5}.

Na África, principalmente na região sub-saariana, encontram-se os maiores focos da doença em razão de que não só o clima favorece a transmissão da doença, mas também suas condições econômicas e sociais^{5,6}.

Outras regiões, como a Ásia e o Oriente Médio, também se apresentam como áreas de risco para a contaminação pela parasitose.

A Figura 1 mostra a distribuição mundial das áreas de risco da malária.

Figura 1. Distribuição mundial das áreas de risco de infecção por malária.

Fonte: Roll Back Malária-WHO, 2007⁵. Acessado em: 01/09/2008

A maioria dos casos de contágio encontra-se nas regiões Norte e Centro-Oeste do País, especialmente na região conhecida como Amazônia Legal, que envolve os estados do Acre, Amapá, Amazônia, a porção oeste do Maranhão, Mato Grosso, Tocantins, Pará, Rondônia, Roraima. A Figura 2 mostra a distribuição da incidência de malária no Brasil:

Figura 2. Distribuição da incidência parasitária anual da malária

Fonte: Ministerio da Saúde, 2007 ⁷.

A evolução recente da malária no País é apresentada na Figura 3. Em 2000, no Brasil, eram registrados 609.504 novos casos de malária, indicando ligeiro decréscimo no número de novos casos em relação ao ano anterior 1999, em que se registraram 610.878 casos⁸. Nos anos subseqüentes o número de casos sofreu considerável diminuição, flutuando em valores menores que 500.000, quando então se registrou novo aumento. Após flutuações nos anos que se sucederam, registrou-se novo aumento, atingindo, em 2005, valores em torno de 600.000 novos casos.

Figura 3. Evolução recente dos casos de malária no Brasil

Fonte:Ministério da Saúde, 2006⁷.

Duas espécies de plasmódio predominam como agentes causadores da malária no Brasil, o *P. vivax* e o *P. falciparum*, sendo que o primeiro vem aumentando sua ocorrência, como pode ser observado na Figura 4.

FONTE: CEM/SUCAM/FUNASA

Figura 4. Infestações por malária no Brasil por *P. vivax* X *P. falciparum*.

Fonte: Sucam/Funasa 2002. Disponível na internet em www.funasa.gov.br

2.2 Espécies de plasmódios ⁸

Existem quatro tipos de plasmódios capazes de transmitir a malária aos seres humanos:

- *Plasmodium falciparum*: responsável pela febre terçã maligna, malária grave e malária cerebral. É o agente responsável pela maioria das mortes relacionadas à malária.
- *Plasmodium vivax*: responsável pela febre terçã benigna. Encontra-se em todas as regiões onde a malária é endêmica. Pode aparecer na forma mista com a malária causada pelo *P. falciparum*.
- *Plasmodium malariae*: parece ser o tipo mais antigo de plasmódio das quatro espécies causadoras da malária. É responsável pela febre quartã.

- *Plasmodium ovale*: é o mais raro dos quatro tipos de plasmódios, sendo encontrado na África tropical. Apresenta um tipo diferente de febre terçã benigna, similar à apresentada pelo *P. vivax*, porém com sintomas mais brandos e de mais fácil tratamento. Essa espécie não é encontrada no Brasil.

Deve-se ressaltar que esta classificação terçã e quartã é relativa aos períodos de 48 e 72 horas, que correspondem ao momento em que o plasmódio promove a lise dos eritrócitos. No entanto, esta classificação é meramente didática, uma vez que o número de infestações e de gerações pode promover febre contínua no paciente.

2.3 Ciclo biológico do parasito

O parasito da malária desenvolve-se no homem, hospedeiro vertebrado, no qual ocorre a fase assexuada do ciclo – esquizogonia pré-eritrocítica hepática e esquizogonia eritrocítica, e no mosquito vetor, em que se desenvolve a fase sexuada – esporogonia^{9, 10}.

No homem, o ciclo biológico se inicia com a inoculação de esporozoítos na corrente sangüínea através da picada do mosquito infectado. Os esporozoítos invadem os hepatócitos pela secreção de enzimas proteolíticas encontradas na porção anterior, denominada taça apical. Tais enzimas facilitam a invasão dos hepatócitos. Nestes, inicia-se a fase de esquizogonia tecidual, com a produção de merozoítos a partir de esquizontes teciduais evoluídos dos esporozoítos, que, após romperem a célula infectada, caem na corrente sangüínea, infectando eritrócitos. Esta fase é conhecida como pré-eritrocítica..

A fase pré-eritrocítica dura sete dias no *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, nove dias no *P. ovale* e treze a dezesseis dias, no *P. malariae*. O número de merozoítos liberados por esquizonte tecidual hepático é de cerca de 40.000, no *P. falciparum*, 10.000, no *P. vivax*, 15.000, no *P. ovale* e 2.000, no *P. malariae*⁹.

Os merozoítos liberados dos merócitos de células hepáticas após a esquizogonia tecidual invadem eritrócitos, transformando-se em trofozoítos jovens. A seguir, estes se transformam em trofozoítos maduros ou amebóides

e, por esquizogonia, se transformam em esquizontes, que darão origem a novos merozoítos, liberados no sangue. Os merozoítos podem parasitar novas hemácias ou se diferenciar em gametócitos: macro e microgametócitos⁹.

A esquizogonia sangüínea ocorre em períodos diferenciados, segundo a espécie do parasito, sendo de 48 horas, nos casos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. falciparum*, e de 72 horas, em se tratando de *P. malariae*^{9, 10}.

O ciclo esporogônio tem início com a ingestão de micro e macrogametócitos pela fêmea do mosquito anofelino durante a hematofagia.

Nesta etapa, ocorre a formação de gametas no estômago do mosquito. O microgametócito gera em média, oito microgametas. Estes, em constante agitação, ganham a luz estomacal do inseto à procura de macrogametas. Os macrogametócitos variam estruturalmente: de um a dois corpos polares se desenvolvem, formando os macrogametas^{9,10}.

Após a união com o microgametócito, há fusão dos núcleos, gerando o oocineto, que se move intensamente para se acoplar a parede do estômago do inseto; com isto, há formação do oocisto ou zigoto. Os esporozoítos são formados por meiose, a partir dos esporoblastos, e são liberados gradualmente do oocisto por perfurações nas células da parede do mesmo^{9,10}.

Estes ganham a hemolinfa, invadindo as vísceras do inseto, incluindo as glândulas salivares, alcançando logo após o duto salivar, de onde reiniciam o ciclo após nova hematofagia (Figura 5).

Figura 5. Ciclo biológico do agente causador da malária.

Fonte Miller *et al.*, 2002¹⁰.

2.3.1 Modificações nas Membranas de Eritrócitos Infectados

Durante a fase intra-eritrocítica, o plasmódio promove diversas alterações na membrana do eritrócito, modificando a estrutura e permeabilidade do eritrócito infectado¹¹⁻¹⁵.

No interior do eritrócito, o plasmódio, através dos genes das famílias VAR (*Variant antigen*), RIF (*Repeat Interspeed Family*), STEVOR (*Subtelomeric Variant Open Reading Frame*) e CLAG (*Citoadhesive Linked Asexual Stage Gene*), produz proteínas que modificam a membrana do eritrócito infectado promovendo o fenômeno da citoaderência. Nesta ocorre a adesão do eritrócito infectado à parede do vaso sanguíneo¹⁶⁻¹⁹. Este processo é importante para o ciclo de vida do plasmódio, pois evita que o eritrócito infectado sofra degradação pelo baço e sistema imune. Esta adesão ainda tem uma segunda função, a de dar tempo para que ocorra a maturação e liberação dos trofozoítos.

As proteínas produzidas pelos genes da família VAR são conhecidas como *Pfemp* (*Plasmodium falciparum* erithrocyte membrane protein - Proteína de membrana eritrocítica do *Plasmodium falciparum*). As *Pfemp* são diferenciadas em *Pfemp-1*, *Pfemp-2* e *Pfemp-3*, com funções diferenciadas. A

Pfemp-2 e a *Pfemp-3* promovem a formação de estruturas conhecidas como *knobs* (Figura 6).

Figura 6. Proteínas de membrana responsáveis pela adesão e seus respectivos receptores.

Fonte: Adaptado de: Malaria parasite metabolic pathways [sites.huji.ac.il/malaria/ maps/PfEMP1.html](http://sites.huji.ac.il/malaria/maps/PfEMP1.html). [acessado em agosto de 2002]

Estas estruturas atuam como suporte para a *Pfemp-1*, proteína diretamente responsável pela citoadesão. A *Clag 9*, proteína expressa pelos genes da família *clag* e localizados na porção subtelomérica do cromossomo 9 do plasmódio, também exerce função semelhante no fenômeno de citoadesão^{12,17,18}.

Juntamente com estas estruturas de adesão a permeabilidade do eritrócito passa a ser modificada. Substâncias que normalmente não são absorvidas passam a penetrar no eritrócito¹²⁻¹⁵. Para realizar esta permeação o plasmódio desenvolve novas vias de absorção através de proteínas, criando

poros e/ou modificando a constituição lipídica da membrana eritrocitária. Entre as substâncias que passam a ser absorvidas podem-se citar as hexoses, lipídeos e aminoácidos^{12-15,19,20}. A Figura 7 mostra as diferenças de absorção de eritrócitos infectados e não-infectados.

Figura 7. Diferenças entre eritrócito normal e eritrócito infectado. Fonte: Adaptado de: Malaria parasite metabolic pathways sites.huji.ac.il/malaria/maps/PfEMP1.html

O aumento da absorção de lipídeos é de extrema importância para o parasita, já que este necessita de fosfolipídios para a produção de membranas²¹⁻²⁴. Outro fator importante é que eritrócitos normais não absorvem lipídeos, tornando este processo exclusivo para eritrócitos infectados, o que torna esta via um possível alvo para novos antimaláricos, assim como alvo para conferir seletividade a fármacos para atuar sobre o eritrócito infectado^{12-15,19-21}.

Diversos mecanismos explicam esta absorção diferenciada de lipídeos. Entre eles os principais são: transporte por HDL, modificação da constituição

da camada lipídica, através da “nova via de permeação” e criação de rede tubovesicular entre o parasita e a membrana do eritrócito infectado.

Grelier e colaboradores²⁰ demonstraram que a lipoproteína de alta densidade (HDL) passa a promover a entrada de lipídeos em eritrócito infectados.

A modificação da camada lipídica causada pelo parasita faz com que fosfolipídeos possam atravessar por algum tipo de mecanismo “flip-flop”^{12-15, 19-20}. A chamada “nova via de permeação” atua como canal aniônico capaz de melhorar a permeação de diversos solutos, inclusive de lipídeos¹⁹.

Em recente trabalho publicado por Haldar e colaboradores²⁵, demonstrou-se que o parasita forma rede tubovesicular entre a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana do eritrócito infectado. Esta rede seria responsável pela trânsito de lipídeos pela membrana do eritrócito infectado, nutrindo, desta forma, o parasita dentro do vacúolo parasitóforo.

Acredita-se que o conjunto destes mecanismos leve ao aumento de lipídeos no interior do plasmódio, já que o parasita não dispõe de aparato para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, os quais servem de precursores para a biossíntese dos fosfolipídeos essenciais para o parasita^{21, 22,24}.

Pelo exposto, estas modificações estruturais e funcionais da membrana de eritrócitos infectados são de especial interesse para o desenvolvimento de novos fármacos, pois constituem alvos seletivos para o direcionamento de agentes antimaláricos.

2.4 Patogenia

Entre as espécies de *Plasmodium*, somente o *P. falciparum* leva o paciente a quadro fatal, além de envolver cepas extremamente resistentes aos fármacos usuais²¹⁻²³. Para a caracterização da patologia malárica, devem ser destacados três elementos principais: febre, acesso malárico e anemia. O acesso malárico, que corresponde à fase de esquizogonia sangüínea, é caracterizado por febre intensa, que se prolonga por períodos de tempo

característicos (dias), dependendo da espécie do parasito, culminando com calafrio, calor e suor. O paciente, apesar da febre, sente calafrios por trinta minutos e começa, então, a sensação de calor intenso e a febre pode alcançar 41 °C, assim permanecendo por duas horas, quando começa a ceder. A periodicidade dos acessos é intimamente determinada pela espécie do parasito, sendo de 48 horas, em *P. vivax* e *P. falciparum*, e 72 horas, no *P. malariae*^{9,10}.

A anemia é provocada por dois fatores principais: destruição das hemácias após as esquizogonias e destruição de hemácias infectadas e sadias no baço, devido à formação de auto-anticorpos por antígenos aderidos à superfície das hemácias, que não são reconhecidas pelo organismo. Além da anóxia visceral provocada pela anemia, os complexos antígeno-anticorpo dificultam o fluxo sangüíneo, pela aderência dos mesmos na parede vascular. É o que se conhece por marginação eritrocitária, que pode culminar com o edema, anóxia, necrose e morte do paciente, principalmente em infecções de *P. falciparum*^{9,10}.

Nas infecções por *P. falciparum*, alguns fatores indicam prognóstico desfavorável ao paciente, entre eles: alta parasitemia, febre prolongada, icterícia, redução do volume urinário, desorientação e hemorragia.

A evolução da infecção, em geral, depende da cepa do *Plasmodium*, da existência de parasitos resistentes e se o paciente já foi infectado anteriormente ou não. Há casos em que a evolução conduz a quadro de malária grave, tais como hemorragia, edema cerebral e pulmonar, insuficiência renal aguda, entre outros^{9,10}

2.5. Quimioterapia antimalárica

2.5.1 Histórico

A droga chinesa *Ch'ang Shang*, descrita no “Livro das Ervas”, foi o primeiro indício da terapia antimalárica. Esta droga consiste na raiz pulverizada da planta *Dichroa febrifuga*, utilizada para atenuar os sintomas da malária e febres análogas. Posteriormente, verificou-se a presença do alcalóide febrifugina².

Um passo de extrema importância para a terapêutica da malária foi o isolamento da quinina no início do século 19. Costuma-se dizer que este alcalóide da *Cinchona* é a substância que mais contribuiu para amenizar o sofrimento da humanidade, sendo largamente aplicada na terapêutica da malária, inclusive na forma de chá de quina. Devido à dificuldade em sintetizar esta substância e ao seu alto custo, tal chá foi empregado durante várias décadas¹¹.

Em 1891, Ehrlich e Guttman atribuíram a atividade antimalárica ao cloreto de metiltionínio. Esta descoberta teve grande importância na terapêutica da malária, pois esta estrutura serviu de precursor para o primeiro antimalárico sintético, a pamaquina, obtido em 1924. Posteriormente, Mietzsch e Mauss sintetizaram a mepacrina, igualmente potente².

Durante a Segunda Guerra Mundial houve intenso programa de desenvolvimento de antimaláricos, resultando na síntese de 130.000 a 140.000 novas entidades químicas, algumas delas utilizadas até os dias de hoje. Podem-se citar como exemplos a primaquina e, a mais utilizada de todas, a cloroquina¹¹.

Novamente devido a uma guerra, a do Vietnã, criou-se outro programa de desenvolvimento de antimaláricos. Desta vez os responsáveis foram os americanos, que investiram intensamente na pesquisa de novas substâncias com atividade antimalárica. Foram analisadas aproximadamente 250.000 moléculas a fim de proteger os soldados na campanha do Vietnã.

Resultado positivo foi a descoberta da mefloquina, fármaco promissor na luta antimalárica.²

Na década de 1970, pesquisadores chineses isolaram a artemisinina da *Artemisia annua*. Esta molécula apresenta alta atividade antimalárica inclusive contra cepas cloroquina-resistentes de *P. falciparum*²⁶.

Mais recentemente, no final da década de 1980, foram, ainda, introduzidas halofantrina e atovaquona²⁶.

Embora exista grande número de moléculas ativas na malária, ainda se buscam fármacos que combinem eficácia e segurança na terapêutica da malária e que, também, combatam cepas resistentes do plasmódio²⁶.

As estruturas dos fármacos utilizados contra a malária encontram-se na Figura 8

Figura 8. Principais fármacos utilizados contra a malária.

2.5.2 Classificação dos Quimioterápicos

Os quimioterápicos antimaláricos podem ser classificados quanto à ação no ciclo biológico e quanto à classe química^{2, 26-29}.

2.5.2.1 Classificação quanto à ação no ciclo biológico^{2, 26-29}.

Esta classificação baseia-se na ação em diferentes estágios de desenvolvimento do plasmódio. Segundo ela, os antimaláricos podem ser:

- *Esquizonticidas sangüíneos*: fármacos que atuam sobre a fase eritrocítica do plasmódio. Nesta classe encontra-se a maior parte dos antimaláricos, uma vez que é mais fácil o tratamento no sangue. Os esquizonticidas sangüíneos podem ser divididos segundo o tempo necessário para exercerem a sua ação. Antimaláricos como cloroquina, quinina e mefloquina, halofantrina, e outros com natureza alcaloídica, e também os derivados endoperóxidos apresentam ação rápida. Já os fármacos das classes dos antifolatos, pirimetamina e trimetoprima, e antibióticos, como a tetraciclina, necessitam de maior tempo para exercer sua ação e, por isso, normalmente são administrados em associação aos primeiros.
- *Esquizonticidas teciduais*: atuam sobre as formas teciduais primárias do plasmódio existentes no hepatócito, evitando a ocorrência do estágio eritrocítico e posterior transmissão da parasitemia. Esta classe de fármacos tem como exemplo a primaquina e o proguanil. Devido à sua alta toxicidade, a primaquina tem seu uso restrito.
- *Gametocitocidas*: fármacos que atuam sobre a forma sexuada do plasmódio. Estes antimaláricos destroem os gametócitos, impedindo a transmissão para o hospedeiro invertebrado, o mosquito anofelino. São exemplos cloroquina, primaquina e quinocida.
- *Esporonticidas*: atuam sobre a forma infectante do parasita, impedindo a esporogonia no hospedeiro vertebrado. Clorguanil e pirimetamina são exemplos de esporonticidas.

Quanto ao efeito provocado, os antimaláricos podem apresentar três efeitos: *cura clínica*: alívio dos sintomas sem a eliminação total dos parasitas; *cura radical*: eliminação completa do parasita, tanto na fase eritrocítica quanto na fase hepática, e *efeito quimioprolático*: destruição dos esquizontes teciduais primários ou dos esquizontes à medida que são liberados do tecido para a corrente sanguínea.

2.5.2.2. Classificação Química^{2,11,26-29}

De acordo com a estrutura química, os antimaláricos, podem ser divididos em:

A. 4-QUINOLINOMETANÓIS

Os principais representantes dos 4-quinolinometanóis são os alcalóides da quina. Estes alcalóides já eram utilizados pelos peruanos, sob a forma de chá da planta, muito antes da chegada dos europeus na América.^{2, 10,25} A quinina (**1**), principal alcalóide encontrado na *Cinchona sp*, apresenta alta dificuldade e custo em ser sintetizada. Portanto, até os dias de hoje, em regiões de extrema pobreza ainda se toma o chá da planta, ou se realiza a extração do alcalóide.^{2,26-29}

A1. Relação estrutura-atividade

Os compostos desta classe apresentam estruturalmente um anel quinolínico substituído na posição 4 por um grupo carbinólico, além de cadeia lateral com núcleos quinuclidínico ou piperidínico.^{2,26,27}

Como mencionado anteriormente, a principal representante desta classe é a quinina (1). Esta molécula apresenta na sua cadeia lateral quatro centros quirais, sendo aqueles encontrados nas posições 8 e 9 os responsáveis pelo aumento ou diminuição da atividade antimalárica de acordo com sua configuração. A quinina apresenta configuração (-)-8*S* e 9*R* e a quinidina é o isômero (-)-8*R* e 9*S*, duas a três vezes mais ativo que a quinina. A cinchonina e a cinchonidina apresentam a configuração (+)-8*R* e 9*S* e (+)-8*S* e 9*R*, respectivamente, sendo a cinchonina mais ativa que a cinchonidina. Nas posições 2 e 8 o grupamento trifluormetílico promove aumento da meia-vida. A hidroxila na posição 9 deve ser mantida, pois a oxidação desta leva à perda de atividade. Na posição 6 do anel quinolínico (R₁), há aumento de atividade quando se mantém o grupamento metoxila^{11,29}. A Figura 9 resume a relação estrutura atividade dos composto quinolinometanóis.

Figura 9. Relação estrutura-atividade dos quinolinometanóis.

Estes estudos de relação estrutura-atividade levaram à introdução da mefloquina (**2**), fármaco utilizado na terapêutica antimalárica. No entanto, seus efeitos neurotóxicos limitam seu uso prolongado.^{11,26-28}

A2. Mecanismo de Ação

Acredita-se que o mecanismo de ação da quinina esteja relacionado com a inibição da formação de hemozoína, resultado da destoxificação do ferro presente no heme, pelo parasita^{11,26-28}.

Embora estes fármacos tenham sido largamente empregados na terapêutica, com o surgimento de novos agentes quimioterápicos mais potentes, juntamente com o fato de que a dose terapêutica é muito próxima da tóxica, a quinina e seus derivados tiveram o seu uso restringido para cepas resistentes à cloroquina, quando em associação com as tetraciclina.

B. 4-AMINOQUINOLINAS

As 4-aminoquinolinas foram introduzidas durante a Segunda Guerra Mundial. A principal representante desta classe é a cloroquina (**3**). A baixa toxicidade aliada à sua eficácia, fez da cloroquina o fármaco mais utilizado contra a malária e, provavelmente, um dos que mais aliviou o sofrimento da humanidade^{11,26-28}.

Estas características da cloroquina a tornariam o fármaco ideal para a terapêutica da malária, porém seu uso indiscriminado levou ao surgimento de cepas resistentes de plasmódio^{11,26-29}. Exemplo deste uso indiscriminado

ocorreu no Brasil durante a década de 1950, em que o sal de cloroquina passou a ser incorporado ao sal de cozinha, a fim de promover a profilaxia da parasitose².

A cloroquina **(3)** apresenta atividade como esquizonticida sangüíneo e, em casos de cepas sensíveis, promove cura radical^{2,11, 26,27}. De maneira similar à primaquina, pode provocar anemia hemolítica em pessoas com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, além de cefaléia, prurido, anorexia, náusea e vômitos. Pode, ainda, promover algumas alterações graves como leucopenia e hepatotoxicidade²⁶.

B1. Relação estrutura-atividade

Quanto às características estruturais, as 4-aminoquinolinas clássicas apresentam anel quinolínico, substituído na posição 4 por nitrogênio amínico secundário, ligado a cadeia lateral que mantém distância de 4 carbonos entre o nitrogênio secundário e o nitrogênio terciário terminal. Substituições nas posições 2 e 8 do anel quinolínico promovem a diminuição da atividade antimalárica. A diminuição da flexibilidade da cadeia lateral através da introdução de anel aromático promove o aumento da atividade e da toxicidade, como ocorre na amodiaquina **(4)**^{11,26-29}. No nitrogênio terciário, a substituição de um dos grupos etila por hidroximetila leva à molécula da hidroxicloroquina **(5)**, com potência semelhante à da cloroquina **(3)** e com atividade anti-reumática. A substituição das etilas por *t*-butila confere atividade contra cepas resistentes **(6)**²⁹.

Novos compostos vêm sendo sintetizados com a finalidade de melhorar a atividade e burlar a resistência. Nestes compostos as maiores modificações ocorreram na cadeia lateral.

Conforme descrito anteriormente a rigidez da cadeia lateral confere aumento da atividade antimalárica como ocorre com a amodiaquina. Modificações realizadas na cadeia lateral da amodiaquina contribuíram para aumentar a atividade contra cepas resistentes. A substituição da posição 5 do anel benzênico por grupos *p*-cloro-fenila, propila e isopropila contribuiu para o aumento de atividade. Os compostos (7), (8) e (9) apresentaram-se os mais ativos *in vitro*. Os compostos de cadeia lateral rígida promovem toxicidade crônica, o que limita seu emprego²⁹.

Compostos com a cadeia lateral simplificada, ainda em estudo, mostraram-se eficazes contra cepas resistentes. Representa-se aqui composto (10), dotado dessas características²⁹

A Figura 10 ilustra a relação estrutura-atividade desta classe.

Figura 10. Relação estrutura-atividade das 4-aminoquinolinas.

B2. Mecanismo de Ação

Buller e colaboradores vêm realizando estudos de modelagem molecular afim de demonstrar a interação das quinolinas com o grupo heme³⁰. Esse estudo, publicado em 2002, mostra que a cloroquina intercala entre os grupos heme da hemozoína. Esta intercalação ocorreria com até três hemes, interagindo da seguinte forma: o nitrogênio terciário terminal da cadeia lateral liga-se não covalentemente ao grupo carboxilato do primeiro heme; o nitrogênio quinolínico interage com o grupamento vinílico do segundo heme; o átomo de cloro da posição 7 do anel quinolínico interage com a metila ainda do segundo heme; o terceiro heme liga-se ao nitrogênio secundário da cadeia lateral através de seu grupo vinílico. A figura 11 mostra a intercalação da cloroquina com os grupos heme:

Figura 11: Interação entre cloroquina e hemozoína: a) plano superior; b) plano lateral; c) plano inferior.

Embora esta hipótese pareça bastante condizente, este mecanismo de ação da cloroquina ainda se encontra em estudo.

O terceiro mecanismo proposto, o da alcalinização do vacúolo digestivo, sugere que o caráter dibásico da cloroquina altere o pH, de 5,2, no interior dessa organela, impedindo, assim, que as enzimas envolvidas na digestão da hemácia exerçam sua atividade^{2,11, 26}..

C. 8-AMINOQUINOLINAS

As 8-aminoquinolinas foram introduzidas na terapêutica, em 1925, com o desenvolvimento da pamaquina **(11)**,^{11, 28} o protótipo da classe. Seu maior representante é a primaquina **(12)**^{11,26-28}. A primaquina apresenta maior atividade voltada para o *P. vivax*, atuando principalmente na fase hepática do parasita, sendo o único fármaco ativo contra os hipnozoítos, formas latentes do parasita, evitando recaídas da malária. Esta classe de fármacos ainda pode apresentar atividade como esquizotocida sangüíneo^{11,26,27,30-,33}. Um impedimento para o uso da primaquina como antimalárico corrente na terapêutica é a sua alta toxicidade. O efeito adverso mais grave causado pela primaquina é a anemia hemolítica intravascular^{11,26,27,28}.

Pessoas que são deficientes na enzima glicose-fosfato-desidrogenase (G6PD) apresentam maior suscetibilidade à hemólise causada pela primaquina. A G6PD apresenta importante papel no processo redox eritrocitário. Essa enzima converte glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicolactona, o que leva à conversão de NADPH em NADPH⁺. O NADPH é utilizado pelo eritrócito para

reduzir a forma oxidada da glutathione. A glutathione reduzida atua como um tampão, mantendo os resíduos de cisteína da hemoglobina e de outras proteínas no estado reduzido. Níveis reduzidos de G6PD resultam no excesso de NADPH, tornando os eritrócitos especialmente suscetíveis a danos por oxidantes.^{11,26,30-32,34-36}

C1. Relação estrutura-atividade

Esta classe de antimaláricos apresenta anel quinolínico substituído na posição 8 por um grupo amino ligado a cadeia alquílica lateral. Esta cadeia lateral deve conter o grupo metilbutilamino, obedecendo a distância de 4 carbonos entre os dois nitrogênios. Outra exigência importante para a atividade é a metoxila na posição 6 do anel quinolínico^{11, 27, 29}.

Diversas modificações foram realizadas em sua estrutura visando à diminuição da toxicidade e melhoria de sua atividade. O bloqueio das posições 2, 4, 5 e 7 retarda a formação de radicais livres, melhorando a atividade, aumentando a meia-vida e, principalmente, diminuindo a toxicidade^{11, 27-29}. O composto tafenoquina **(13)** representa esta modificação, sendo utilizado na profilaxia da malária¹. Este derivado é ativo no estágio pré-eritrocítico, incluindo cepas cloroquina-resistentes e também mostra atividade contra hipnozoítos e gametócitos²⁸. O composto WR 225448 **(14)** vem apresentando boa atividade no estágio exoeritrocítico do parasita, em dose eficaz muito menor que a da

primaquina. Já o derivado WR 238605 (**15**) é ativo no estágio pré-eritrocítico, incluindo cepas cloroquina-resistentes. Este composto também mostra atividade contra hipnozoítos e gametócitos^{11,26, 27,28, 30,31,32,33,34}.

Alterações na cadeia lateral mantiveram a atividade dos derivados de primaquina, porém não diminuíram sua toxicidade. Também envolvendo a cadeia lateral está a metabolização da primaquina. Após absorvida, aproximadamente 70% da primaquina são rapidamente convertidos em carboxiprimaquina (**16**)³², a qual é eliminada. O emprego de pró-fármacos peptídicos no nitrogênio terminal da cadeia lateral não impediu a rápida metabolização da primaquina. Heterociclos vêm sendo adicionados ao nitrogênio terminal com o intuito de impedir a caboxilação da primaquina. Como exemplos temo-se a bulaquina (**17**), à qual se adicionou uma lactona, assim como derivados imidazolidínicos (**18**)^{28, 33}. A bulaquina vem sendo utilizada na Índia, em associação com a cloroquina e comercializada sob o nome Aablaquin®.

A relação estrutura-atividade das 8-aminoquinolinas é resumida na Figura 12.

Figura 12. Relação estrutura atividade das 8-aminoquinolinas.

C2. Mecanismo de Ação

Acredita-se que o mecanismo de ação da primaquina esteja relacionado com a formação de radicais livres, os quais promovem a lise celular. Por esta hipótese, a primaquina apresenta sua atividade devido à formação de espécies reativas que atuam como radicais livres causando estresse oxidativo^{11,26,31-35,36}. O estresse oxidativo causado pela primaquina está, provavelmente, relacionado com o surgimento de metabólitos fenólicos, como a 5-hidroxiprimaquina (**19**), 5,6-diidroxiprimaquina (**20**) e 4,5-diidroxiprimaquina (**21**)³³⁻³⁶. Estes derivados podem, através de redox-ciclização, gerar espécies reativas de oxigênio. Estas espécies se ligam a biomoléculas, o que, possivelmente, é responsável pela atividade antimalárica e pelos efeitos adversos correspondentes^{32,36}.

D. FENANTRENOMETANÓIS

A classe dos fenantrenometanóis (**22** a **25**) foi descoberta também durante a Segunda Guerra Mundial. Dois fármacos iniciaram esta classe: WR 33,063 (**22**) e WR 122,455 (**23**), sendo que ambos apresentavam boa atividade para cepas resistentes à cloroquina. O terceiro a ser sintetizado e principal representante desta classe foi a halofantrina. Este fármaco apresenta-se como esquizotípicida sangüíneo, especialmente nos estágios mais maduros do plasmódio^{11, 26,27} ..

A estrutura da halofantrina (**22**) é composta por um sistema 9-fenantreno substituído com cadeia lateral contendo o grupo dibutilaminopropanol, o qual parece ser o substituinte ideal para a melhor atividade biológica¹¹.

No início da década de 1980, pesquisadores da Academia de Ciências Médicas da China introduziram na terapêutica a combinação da lumefantrina (**25**), um análogo dos fenantrenometanóis, com o artemeter. Esta associação foi aproveitada pela empresa Novartis, a qual introduziu no mercado a associação sob a marca Coartem®.

D1. Mecanismo de ação

Quanto ao mecanismo de ação desta classe de compostos, este se assemelha ao das 4-aminoquinolinas, inibindo a formação da hemozoína¹¹.

E. ANTIFOLATOS

E1. Sulfonas e sulfonamidas

Com a descoberta da atividade antimalárica da sulfanilamida, diversos derivados foram testados com a finalidade de encontrar novos antimaláricos destas classes.

Entre estes, dois destacaram-se: a sulfadoxina e o sulfametoxipiridazina. Estudos baseados nestes compostos levaram à utilização da dapsona como antimalárico. Também, podem-se citar como exemplos desta classe sulfametoxazol e sulfizoxazol^{11, 26, 27}.

Estes compostos apresentam atividade antimalárica devido à sua capacidade de inibir a diidropteroato sintase parasitária, enzima envolvida em uma das etapas de biossíntese de ácido fólico, essencial para o parasita. Estes compostos concorrem com o ácido *p*-aminobenzóico – PABA -- pelo sítio ativo da enzima. Esta classe de compostos apresenta melhor desempenho no

combate da malária, quando combinada com outros antifolatos que atuam em outra enzima da biossíntese de ácido fólico, ou seja, inibindo a diidrofolato redutase^{11,26-28, 67, 68}.

Atualmente, estes compostos são recomendados apenas em regiões onde há resistência do *P. falciparum* à cloroquina²⁷.

A Figura 13 mostra as estruturas das sulfonas e sulfonamidas.

Figura 13. Estruturas das sulfonamidas e sulfonas utilizadas contra malária⁶⁷.

E2. Biguanidas e Triazinas

O principal representante desta classe é o proguanil. Este composto, introduzido na década de 1940, apresenta atividade esporonticida e também esquizonticida tecidual, podendo ser utilizado como agente profilático².

Após 20 anos da descoberta da atividade antimalárica do proguanil (**26**), descobriu-se que a forma ativa deste composto é a sua forma cíclica, a cicloguanil (**27**)².

Estudos de relação estrutura-atividade mostram que a adição de átomos de cloro no anel aromático melhora a atividade antimalárica, como é o caso da clorproguanil (**28**)^{11,27}.

O mecanismo de ação destes compostos consiste na inibição da enzima diidrofolato redutase, bloqueando a biossíntese de pirimidinas.

E3. 2,4-diaminopirimidinas

A pirimetamina (**29**) e a trimetoprima (**30**) são os dois principais fármacos da classe das 2,4-diaminopirimidinas. A pirimetamina foi desenvolvida em 1950,^{53,67} como antagonista do ácido fólico para emprego como agente antitumoral ².

Esta classe apresenta alta similaridade estrutural com cicloguanil e igual mecanismo de ação. Sua potência é maior que a do proguanil, provavelmente por não necessitar biotransformação²⁹.

E4. Acridinas

As acridinas foram introduzidas na terapêutica nos anos 1930, com o desenvolvimento de mepacrina (**31**). Este fármaco foi largamente utilizado na Segunda Guerra Mundial, porém, atualmente, é considerado obsoleto na terapêutica da malária. Esta molécula apresenta atividade esquizotóxica sanguínea rápida, além de ser gametocítica^{11,26,27}.

A associação da floxacrina (**32**) e da pironaridina (**33**) vem sendo utilizada como esquizotóxico sanguíneo.

E5. Naftoquinonas

A atovaquona (**34**) é o protótipo das 1,4-naftoquinonas. Esta molécula é comercializada sob a marca MALARONE®, pela empresa GLAXO-SMITHKLINE, em associação com o proguanil³¹.

Quando administrada na forma de monoterapia, a atovaquona apresenta alto índice de resistência -- um em três pacientes apresentam formas resistentes do parasita. Em compensação, quando administrada combinada com o proguanil, a cura passa a ser total³¹.

Acredita-se que este alto índice de resistência esteja relacionado com a alta lipofilicidade da molécula, a qual expõe o parasita a baixas concentrações do fármaco por longo tempo.

A atovaquona (**34**) atua sobre a cadeia de transporte de elétrons, inibindo, assim, a coenzima Q e, com isto, a biossíntese de timidina é bloqueada.^{27,31}

F. ANTIBIÓTICOS E OUTROS ANTIBACTERIANOS

Alguns antibióticos podem ser utilizados na terapêutica da malária. Embora estes compostos não sejam os mais eficazes antimaláricos, seu uso vem sendo reconsiderado, devido ao surgimento das cepas resistentes.

Entre os antibióticos mais utilizados na terapêutica da malária podem-se citar a tetraciclina, a doxiciclina, a clindamicina e a azitromicina. Estes antibióticos são utilizados em associação com outros antimaláricos, como a artemisinina e derivados quinolínicos^{26, 27}.

Estudos mais recentes têm mostrado que fluorquinolonas como o ciprofloxacino e o norfloxacino podem apresentar atividade antimalárica, porém são necessários estudos mais detalhados^{26,31}.

Ridley e colaboradores vêm desenvolvendo uma nova classe de compostos com atividade antimalárica superior à da cloroquina. Este novo grupo seria dos fenil β -metoxiacrilatos (**35**)³⁷. Estes apresentam mecanismo de ação similar ao da atovaquona, inibindo a cadeia transportadora de elétrons.

G. ARTEMISININA E DERIVADOS CONTENDO “PONTE ENDOPERÓXIDO”

Os chineses vêm, há muito tempo, utilizando o chá da planta *Artemisia annua*, também conhecida como qinghao, para o tratamento de febre. Desta planta extraiu-se uma das substâncias mais ativas para a terapêutica da malária, a artemisinina (36), também conhecida como qinghaosu^{2,11,26-29}.

O uso da *Artemisia* no tratamento de febres foi descrito no *Zhou Hou Bei fi Fang*, o *handbook* para emergências, escrito por *Ce Heng* e publicado 341 A.C. Um estudo mais detalhado sobre a planta foi apresentado em 1596, no “*Ben Cao Gang Mu* – o Compêndio de Matéria Medica”, o qual é publicado até os dias atuais^{2,28}..

O isolamento da artemisinina deu-se em 1972 por pesquisadores chineses. Desde então se considera como um dos maiores avanços na quimioterapia antimalárica, isto por que a artemisinina e seus derivados apresentam alta atividade antimalárica com baixa toxicidade, sendo ativa para cepas de plasmódios resistentes e nos casos de malária grave, em que o parasita se aloja no cérebro^{2,11,26-28}.

Os laboratórios Novartis atualmente comercializam o Coartem[®], que consiste na associação do artemeter com a halofantrina, obtendo bons resultados, inclusive com crianças. Também produzido pela Novartis há o Riamet[®], associação do artemeter com lumefantrina³⁸.

Embora a artemisinina pareça ser o fármaco ideal, ela apresenta alguns problemas relacionados à sua solubilidade, biodisponibilidade e tempo de meia-vida plasmática. Estas características, juntamente com a necessidade de buscar melhorias na atividade deste composto, têm levado pesquisadores a sintetizar diversos análogos da artemisinina, permitindo, assim, realizar estudos de relação estrutura-atividade³⁹⁻⁴⁸..

A artemisinina apresenta poucos eventos adversos, os principais deles relacionados ao sistema nervoso. Esta toxicidade ao SNC pode ser confundida muitas vezes com os próprios efeitos da patologia⁴⁹. Estes podem ser descritos como tremores convulsões e até desmaios. Em macacos, a artemisinina apresentou degeneração neuronal, porém não em humanos. Teratogenia foi descrita em animais de laboratório, portanto evita-se a administração a mulheres grávidas^{26,49}.

G1. Relação estrutura-atividade da artemisinina e derivados

Como citado anteriormente, sintetizaram-se diversas estruturas análogas à artemisinina, com a finalidade de melhorar sua atividade biológica, estabilidade química e solubilidade, principalmente em água.

As principais modificações realizadas na estrutura da artemisinina ocorreram nas posições 3, 9 e 10. Entre estas modificações, as mais importantes ocorrem na posição 10. Nesta posição podem-se obter melhorias relacionadas com a atividade antimalárica, estabilidade e solubilidade^{39-42, 45-47}.

A redução do grupo carbonílico a álcool leva à formação da diidroartemisinina (**37**), a qual pode ser convertida em éter, originando os derivados artemeter (**38**) e arteter (**39**), os quais se apresentam mais ativos que a artemisinina e são muito utilizados na terapêutica^{39,40-42,70}.

A remoção total do grupo carbonílico desta mesma posição pode levar ao aumento atividade em relação à artemisinina. As modificações realizadas na posição 3 consistem principalmente na introdução de grupos etílicos, propílicos grupos fenilmetílicos, feniletilílicos e fenilpropílicos, os quais promovem aumento na atividade biológica. O composto **(40)** em que ocorre a retirada do grupo carbonílico e a introdução de grupo propílico leva ao aumento de atividade em sete vezes^{39-42,45-47}.

Já posição 9 aceita introdução de cadeias alquílicas de até 6 carbonos, e anéis aromático, porém o comprimento ideal da cadeia é de até 6 carbonos. O composto **(41)** apresenta atividade 70 vezes maior que a artemisinina^{39-42,45-47}.

O análogo semi-sintético **(42)**, em que há introdução do grupo furano, apresenta-se hidroliticamente estável, com maior biodisponibilidade e atividade que a artemisinina. A replicação molecular da artemisinina através desta mesma posição confere aumento da estabilidade e da atividade **(43)**. Derivados 10-fenoxi apresentaram-se mais ativos e estáveis **(44)**^{28,39-42,45-47}.

Outra estratégia de modificação molecular com a finalidade de promover melhorias no tempo de meia-vida e hidrossolubilidade é o emprego da latenciação da artemisinina. Pró-fármacos do antimalárico foram sintetizados e atualmente são aplicados na terapêutica. Como exemplos têm-se o artesunato sódico **(45)**, em que se introduz o grupo succinil na posição 10, com a prévia redução à diidroartemisinina. Estes pró-fármacos apresentam-se mais hidrossolúveis, com maior biodisponibilidade e melhor formulação. Artesunato sódico e o ácido artesúnico **(46)** também são utilizados na terapêutica.^{27, 42}

A estrutura da artemisinina passou por diversas simplificações moleculares com a finalidade de verificar seu grupo farmacofórico e promover melhorias em sua atividade. O “striptease” estrutural realizado com a artemisinina demonstrou que a ponte endoperóxido é essencial para a atividade antimalárica e que sua retirada leva à perda da atividade. A retirada de apenas um oxigênio causa a perda da atividade como representado no composto **(47)**^{27,43}. Entre os compostos simplificados da artemisinina destaca-se o artefleno **(48)**,²⁷ o qual se encontra em fase clínica de testes. Ainda utilizando a simplificação molecular foram sintetizados compostos tetraoxanos

(49), (50), (51)^{28,48}, os quais apresentam duas pontes endoperóxido e são igualmente ou mais ativos que artemisinina *in vitro*.

A Figura 14 resume a relação estrutura-atividade artemisinina e seus derivados^{11,27,28, 39-42, 45-48}.

Figura 14. Relação estrutura-atividade da artemisinina e derivados.

Avery e colaboradores ainda estudam maiores modificações moleculares na artemisinina e seus derivados, inclusive novos empregos para o fármaco, como, por exemplo, o uso como leishmanicida.⁴⁰

G2. Mecanismo de ação

Desde sua descoberta o mecanismo de ação da desta classe de fármacos vem intrigando os pesquisadores. A presença da ponte endoperóxido, a qual, até então, não era comum em antimaláricos, juntamente com estudos de relação estrutura-atividade, sugerem o envolvimento deste grupo com sua ação e, mais precisamente, a formação de radicais livres, os quais promoverão estresse oxidativo no parasita^{43,48-50}. Esta formação de radicais livres deve-se ao ataque do ferro proveniente da digestão das hemácias pelo parasita. Uma vez que o fármaco tenha alcançado o vacúolo alimentar do parasita, este estará em contato com a ferriprotoporfirina IX, a qual é um intermediário na biossíntese de hemozoína. Acredita-se que o ferro possa atacar a posição 3 da artemisinina. Durante este “ataque”, ocorre a abertura do anel de 7 membros entre as posições 3 e 4 e a concomitante clivagem homolítica da ponte endoperóxido, com a posterior formação de radicais livres. Estes radicais livres poderão alquilar o próprio grupo heme, proteínas importantes ao parasito como a proteína rica em histidina, ou até mesmo causar danos à membrana do vacúolo alimentar do parasito, levando-o à morte^{49,50}. A Figura 15 mostra a hipótese elaborada por Robert e colaboradores para o provável mecanismo de ação da artemisinina. Nesta figura o átomo de ferro foi substituído por manganês⁴⁸.

Figura 15. Mecanismo de ação da artemisinina. Por:porfirina; TPP: Tetrafenilporfirina.

Fonte: Robert; Benoit-vical, Dechy-Cabaret, 2001⁵⁰.

Cheng e colaboradores⁵¹ sugerem, ainda, que a artemisinina e a hematina formem um aduto que apresente atividade tóxica ao parasito, também alquilando proteínas e degradando membranas^{41,42,50,51}. Neste mecanismo, não há a ruptura do anel de sete membros, apenas a ligação do grupo heme à artemisinina. Como consequência desta hipótese, Luo e Jiang demonstraram a interação entre a artemisinina e derivados com o heme^{28, 40,41,49,50,51}.

Este estudo reforça a importância da ponte endoperóxido para a ação da artemisinina, pois esta interage diretamente com o ferro presente no heme. A Figura 16 mostra o *docking* entre a artemisinina e derivados e o heme.

Figura 16. Interação entre o ferro do grupo heme e a ponte endoperóxido da artemisinina. Fonte: Cheng *et al.*, 2002 ⁵¹.

2.5.3 Quimioterapia e Resistência

A despeito da existência de agentes antimaláricos úteis e daqueles potencialmente ativos, a prevalência de infecções resistentes e multi-resistentes a fármacos diminuiu a eficácia de alternativas quimioproláticas e quimioterápicas^{26, 28, 53-61}. Ainda que reversiones da resistência à cloroquina venham sendo ensaiados,⁶¹⁻⁶⁵ a situação é grave, sobretudo no caso de infecções por *P. falciparum*, nas quais tem-se registrado alta incidência de óbito. Mesmo associações de quimioterápicos, concebidas com o intuito de se diminuir a resistência, têm suscitado o aparecimento de cepas de plasmódios resistentes. Ademais, a mefloquina, alternativa saudada como esperança, sobretudo à malária resistente à cloroquina^{66,67}, vem suscitando o aparecimento de resistência desde seu lançamento^{3,64,66}, sobretudo com o uso não racional. Também, a artemisinina comercializada em alguns países^{3, 30, 64}, como a China, apresenta problemas de biodisponibilidade, provocando recrudescência, especialmente na forma de comprimidos. Pró-fármacos derivados deste antimalárico, entre eles o arteter³⁸, vêm sendo experimentados nos casos de resistência.

Como mencionado anteriormente, o *P. falciparum* apresenta característica interessante e de extrema importância para o seu combate. A MDR (Multi-Drug Resistance) ou multi-resistência a fármacos foi visualizada primeiramente em células neoplásicas e consiste na capacidade que uma célula apresenta em resistir à ação de diversos antineoplásicos de classes químicas e mecanismos de ação distintos³¹.

Muitos são os mecanismos de resistência do plasmódio e tão importante quanto conhecer o mecanismo de ação dos fármacos empregados é conhecer os mecanismos de resistência aos mesmos.

As sulfas, antibacterianos utilizados na quimioterapia da malária, atuam inibindo a enzima diidropteroato sintase (DHPS) e, conseqüentemente, a biossíntese de ácido fólico. Fármacos como as biguanidas e a pirimetamina também impedem a síntese de ácido fólico, porém atuam em outra enzima da cascata metabólica, a diidrofolato redutase (DHFR). Nos dois casos, o plasmódio promove mutações nos sítios ativos de ambas as enzimas, modificando aminoácidos dos receptores. A Tabela I mostra os aminoácidos e suas seqüências nas enzimas normais e nas mutantes^{11,27,31,59}.

Tabela I. Seqüências de aminoácidos das enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase normal e mutante

Enzima	Posição	AA normal	AA cepa resistente
DHFR	108	Ser	Asn
	51	Asn	Ile
	59	Cis	Arg
	164	Ile	Leu
	16	Ala	Val
DHPS	437	Ala	Gli
	540	Lis	Glu
	581	Ala	Gli
	436	Ser	Phe/Ala
	613	Ala	Ser/Tir

Fonte: Olliaro, 2001³¹.

Como mencionado anteriormente, a atovaquona apresenta alto índice de resistência. Quanto ao seu mecanismo de resistência, o plasmódio promove alterações no sítio ativo da co-enzima Q responsável pela transferência de elétrons, impedindo a ligação da atovaquona com a referida co-enzima^{26,27,31}.

O mais importante mecanismo de resistência a ser estudado é aquele relativo às quinolinas, especialmente à cloroquina, uma vez que este é o principal fármaco empregado na terapêutica da malária.

O mecanismo de resistência à cloroquina começa com a super-expressão do gene *Pfmdr-1* (*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance-1). Este gene expressa uma glicoproteína conhecida como glicoproteína P (GPP). Esta glicoproteína pode atuar como canal de transporte ou então como transportador da cloroquina dentro do vacúolo alimentar do plasmódio, promovendo, desta maneira, o efluxo do fármaco. Menezes e colaboradores estudaram a aplicação de fármacos reversores de resistência também conhecidos como quimiossensibilizantes⁶²⁻⁶⁵. Estes podem agir de duas maneiras distintas: promovendo bloqueio físico da GPP e impedindo o efluxo do fármaco, ou inibindo a hidrólise de ATP, necessária para o efluxo.

2.5.4 Novas Tendências na Luta Antimalárica

Diante das dificuldades encontradas na terapêutica da malária, até aqui apresentadas, inúmeros esforços vêm sendo aplicados no desenvolvimento de novas “armas” contra a malária.

Novos alvos vêm sendo pesquisados para o desenvolvimento de antimaláricos, com a cooperação das mais diversas áreas, como a genômica, bioquímica, química e bioinformática²⁶⁻²⁸.

A vacina antimalárica vem sendo criada através do esforço multilateral do MustDO (*Multi-Stage DNA-based Malaria Vaccine Operation*). Esta vacina pretende atacar as formas pré-eritrocíticas e eritrocíticas da malária, utilizando como alvos cinco genes que codificam antígenos nas formas pré-eritrocíticas do parasita, desta forma ativando o sistema imune contra o parasita^{27,66}.

Ainda relacionado com a bioquímica do parasita, Moura e colaboradores⁵⁶ vêm pesquisando a biossíntese de isoprenóides e isoprenilação de proteínas. Tanto os isoprenóides quanto as proteínas isopreniladas são de grande importância para o parasita. Estes estudos mostram que a mevastatina pode inibir estas etapas do metabolismo do parasito, eliminando-o⁶⁹.

O estudo de quinases, como as CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*), que controlam a divisão celular, apoptoses, transcrição e diferenciação em células normais e tumorais, vêm sendo alvos promissores para inibidores de crescimento do plasmódio³¹.

Mesmo com estes novos alvos e técnicas, a malária ainda é uma doença sem controle e que exige novas armas o mais rápido possível.

2.5.4.1 Novos Alvos Bioquímicos

A. FOSFOLIPÍDIOS E A MALÁRIA

A1. Importância dos fosfolipídios

Os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas de parasitas da classe Apicomplexa como o *Plasmodium sp*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*²¹⁻²⁵.

A membrana desta classe de parasitas não apresenta apenas importância estrutural, mas também exerce funções vitais para o desenvolvimento e reprodução. Atribui-se à membrana parasitária o processo de invasão de células hospedeiras, aquisição de nutrientes e proteção contra o sistema imune do hospedeiro²¹⁻²⁵.

O primeiro contato entre o eritrócito e o plasmódio ocorre através de suas membranas durante o processo de invasão. Neste processo o parasita invadirá e assegurará condições para sua sobrevivência no interior do eritrócito. Uma vez que tenha penetrado o eritrócito, o parasita garante sua proteção através da formação do vacúolo parasitóforo, o qual proverá as

condições necessárias para o seu desenvolvimento. A membrana do vacúolo parasitóforo é constituída por fosfolipídios, os quais são produzidos e modulados pelo parasita²¹⁻²⁵.

Durante o processo de maturação intra-eritrocítico o plasmódio concentra-se na biossíntese de membranas, haja vista que estas são necessárias para as mudanças que com ele ocorrem. O parasita passa, então, a produzir grandes quantidades de fosfolipídios, os quais serão os maiores constituintes da membrana parasitária²¹⁻²⁵.

Os fosfolipídios também são peças fundamentais dos GPI (glicosilfosfatidilinositol). Estas estruturas, também conhecidas como “âncoras”, recobrem a membrana parasitária e exercem diferentes funções como defesa ao sistema imune do hospedeiro, permeabilidade seletiva, processos de invasão e sinalização⁷¹.

Eda e Sherman⁷² demonstraram que a fosfatidilserina está intimamente relacionada ao fenômeno de citoadesão, interagindo com receptores endoteliais CD36, os quais são responsáveis por tal efeito em vasos cerebrais, causando a malária grave.

Estudos mostram que uma vez inibida a biossíntese de fosfolipídios o plasmódio tem seu desenvolvimento interrompido. Une-se a este o fato de que eritrócitos não-infectados não apresentam esta biossíntese, tornando-a exclusiva do parasita. À vista do exposto, a biossíntese de fosfolipídios no parasito constitui-se em um bom alvo para novos agentes antimaláricos^{22, 70, 71}.

Vial e colaboradores⁷³⁻⁷⁶ demonstraram que compostos derivados de amônio quaternário podem inibir a biossíntese de fosfolipídios, principalmente inibindo a biossíntese de fosfatidilcolina, eliminando, conseqüentemente, o parasita em concentrações muito baixas em relação à cloroquina. A Figura 18 exemplifica três antagonistas de colina.

Figura 17. Compostos antagonistas da colina^{73,74,77}.

A2. Biossíntese de Fosfolipídios

Como mostrado anteriormente, o plasmódio, em seu estágio intra-eritrocítico, investe intensamente na síntese de fosfolipídios. Os principais fosfolipídios produzidos e, conseqüentemente, os maiores constituintes de membranas parasitárias são fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina^{21-24,77,78}.

O plasmódio apresenta o complexo enzimático altamente especializado necessário para a obtenção dos fosfolipídios. A síntese desses compostos em plasmódios é mais bem representada na Figura 18.

Figura 18. Biossíntese de fosfolipídios. AF, Ácido fosfatídico; CDF-DAG, citidina-difosfato-diacilglicerol; FI, fosfatidilinositol; FIS, fosfatidilinositol-sintase; FIF, fosfatidilinositolfosfato; FIF₂, fosfatidilinositoldifosfato; CDF-ETN, citidina-difosfato-etanolamina; F-ETN, fosfato-etanolamina; CDF-COL, citidina-difosfato-colina; F-COL, fosfatidilcolina; ETN, etanolamina; FGFS, fosfatidilglicerol-fosfato-sintase; FGF, fosfatidilglicerolfosfato; FG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina.

Adaptado de: Vial *et al.*, 2002^{21, 24}

Deve-se ressaltar neste sistema a via de obtenção da fosfatidilserina. Vial e colaboradores²⁴ demonstraram que tanto a fosfatidilserina quanto a serina proveniente do hospedeiro são os principais precursores de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Soma-se a este o fato de que o intermediário CDF-DAG é precursor para a síntese de fosfatidilinositol.^{22-24, 74,75,76,77,78}

Esta via torna-se ainda mais importante pelo fato de que as enzimas fosfatidilserina sintase e serina descarboxilase não são encontradas em todas

as células eucarióticas, mas quase que exclusivamente em parasitas. ^{22-24, 74,75,76,77,78}

O processo de obtenção de fosfatidilserina inicia-se com a conversão do ácido fosfatídico (FA) em citidina-difosfato-diacilglicerol (CDF-DAG) através da enzima citidina-difosfato-diacilglicerol sintase (CDS). Uma vez obtido, o CDF-DAG passa, então, a atuar na fosfatidilserina sintase, acoplado a serina e formando fosfatidilserina. A serina ainda serve como precursor de etanolamina através da enzima serina descarboxilase, que atua eliminando o grupo carboxila, levando à formação de etanolamina, precursor da fosfatidiletanolamina ^{21-24, 73,74}.

Como mostrado à Figura 18, a fosfatidilserina é convertida em fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo a principal precursora destes fosfolípidos. Esta conversão decorre da descarboxilação da fosfatidilserina em fosfatidiletanolamina e posterior metilação em fosfatidilcolina.

Nishijima e colaboradores⁷⁹ também demonstraram que a serina é o precursor primordial para a biossíntese de esfingomielina, um lípido também importante para a formação de membranas no estágio intra-eritrocítico do parasito.

A.3 Serina e a Biossíntese de ácido fólico

A cascata metabólica para a biossíntese de ácido fólico já é empregada como alvo para antimaláricos, sendo inibida principalmente por compostos conhecidos como antifolatos. Usualmente, os compostos que inibem a síntese de folato atuam sobre as enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase. Conforme mencionado anteriormente, os principais representantes desta classe são o proguanil, a pirimetamina e a sulfadoxina.

Salcedo e colaboradores ⁸⁰ vêm estudando novas enzimas envolvidas na biossíntese de folato. Dois novos complexos enzimáticos foram identificados: o complexo de clivagem de glicina e a serina hidroximetil-transferase. Ambas as enzimas são responsáveis pela transferência de um

átomo de carbono para a biossíntese de pirimidinas como a timidina-5-fosfato (5-TMP), e a conseqüente produção de DNA.

A Figura 19 mostra a ação da enzima serina-hidroximetiltransferase.

Figura 19. Atuação da enzima serina-hidroximetiltransferase ⁷⁷.

THF: tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; MTHF: metileno-tetraidrofolato; TMP: timidilato monofosfato; diidrouridilato monofosfato

A serina-hidroximetiltransferase é responsável pela transferência de um grupo metílico ao tetraidrofolato formando, assim, o metileno-tetraidrofolato. Concomitantemente, ocorre a conversão de serina em glicina. Esta passagem é necessária para a regeneração do tetraidrofolato em diidrofolato, juntamente com a ação da enzima timidilato sintase.

Com o seqüenciamento genético do *P. falciparum*, foi possível expressar a serina-hidroximetiltransferase. Embora esta enzima já esteja expressa, sua estrutura tridimensional ainda não pode ser obtida através da técnica de cristalografia de raios-X.

Inspirados na homologia enzimática, França e colaboradores ⁸¹ desenvolveram um modelo tridimensional para a enzima serina-

hidroximetiltransferase do *P. falciparum*, possibilitando posteriores estudos de *docking*.

2.6 Planejamento de antimalárico potencial

Infelizmente, o ritmo de desenvolvimento de novos fármacos não acompanhou o agravamento da situação, que se deu com o aumento da incidência de resistência.^{31,53} Poucos compostos potenciais encontram-se em ensaios na fase clínica. A persistência dessa situação na próxima década poderá conduzir a situação muito mais grave, com a disseminação de malária completamente não-tratável.

Associações de quimioterápicos antimaláricos, como derivados pirimidínicos e sulfonamidas ou sulfona, como a dapsona e outros, podem ser empregados como alternativa ao tratamento de malária resistente à cloroquina^{2,54,68}, desde que haja sensibilidade às mesmas. Como citado previamente, tem-se observado forma de resistência à associação pirimetamina e sulfadoxina^{52,68,82}. Também, a Organização Mundial da Saúde⁸³ alerta para os efeitos adversos dessas associações, o que implica busca de derivados de menor toxicidade. Em trabalhos anteriores, Ferreira, Cruz e Korolkovas⁸⁴, Cruz, Ferreira e Korolkovas⁸⁵ sintetizaram formas latentes poliméricas de associações de derivados pirimidínicos, pirimetamina e trimetroprima, com sulfonamidas antimaláricas e dapsona, empregando amido e celulose oxidados, como transportadores, com o objetivo de obter pró-fármacos de ação prolongada e menor toxicidade. Alguns dos derivados obtidos mostraram-se ativos em malária experimental por *P. berghei*.^{84,85}

Diante deste quadro, urge o desenvolvimento de novos antimaláricos que possuam maior eficácia, seletividade, menor toxicidade e que, preferencialmente, estejam relacionados com novos alvos, uma vez que a maioria dos fármacos que atuam nos alvos conhecidos já apresenta resistência.

Conforme descrito anteriormente, o metabolismo dos fosfolipídios em malária é de grande interesse, pois apresenta alvos bioquímicos específicos ao parasita, até o momento pouco explorados.

Welgenick⁷³, Vial e colaboradores⁷⁴⁻⁷⁶ sintetizaram e avaliaram com êxito compostos antagonistas da colina. Estes compostos inibiam a biossíntese de fosfatidilcolina, sendo eficazes, inclusive, contra cepas de plasmódio multi-resistentes.

Salcedo e colaboradores⁸⁰ já demonstraram que a serina exerce importante papel na biossíntese de ácido fólico. Nesta cascata metabólica, a serina sofre a perda de um grupamento hidroximetila através da ação da enzima serina-hidroximetiltransferase, como demonstrado anteriormente.

Através do bioisosterismo^{86,87}, estratégia em que a substituição de átomos ou grupo de átomos que mantenham características similares -- distribuição eletrônica, espacial, entre outras -- às da molécula protótipo, podem-se obter antagonistas metabólicos de substratos enzimáticos. Desta maneira fornecer-se-ia um substrato "defeituoso" para enzima, inibindo-a.

Outra estratégia também aplicada na obtenção de antagonistas é a incorporação de grupos volumosos a moléculas. Anéis aromáticos ou heterociclos, por exemplo, podem deslocar mais facilmente o substrato da enzima, impedindo, assim, sua ação.

Por outro lado, alternativa para a introdução de novos fármacos pode ser a latenciação.

A latenciação⁸⁸⁻⁹⁴ consiste na transformação de fármaco em forma de transporte inativo, que, por meio de reações químicas e/ou enzimáticas, libera o fármaco para exercer sua ação. Constitui-se em processo de modificação molecular, que visa, sobretudo, a alterações da farmacocinética de fármacos, aumentando-lhes a biodisponibilidade ou prolongando-lhes a ação. Permite, ademais, a resolução de problemas de formulação, que, não raro, se constituem em obstáculo à aplicação terapêutica. Por meio desse processo é possível, também, obter formas latentes de ação seletiva e de toxicidade diminuída. A consecução desses objetivos depende de diversos fatores,

ressaltando-se como um dos principais a escolha de transportadores adequados a cada um deles.

Os fármacos dirigidos^{95,96} são formas latentes constituídas de transportadores seletivos, que podem interagir com receptores específicos, ou, então, transportadores que possam direcionar e internalizar o fármaco, liberando-o, desta maneira, em seu local de ação, ou pelo menos, próximo a ele. Com este planejamento podem-se diminuir efeitos adversos causados pela ação inespecífica de fármacos em outros alvos.

Há evidências de que o eritrócito infectado tem sua permeabilidade alterada em relação ao eritrócito não-infectado^{12-15,19,20,97}. A absorção e metabolismo de lipídios, que, geralmente são inativos em eritrócitos não-infectados, é exacerbada em eritrócitos infectados. Esta característica torna, no caso, pró-fármacos “triglicerídicos” potenciais fármacos dirigidos. Estes pró-fármacos “triglicerídicos”, também conhecidos como lipóides, apresentam um diglicerídio ligado a um fármaco, podendo apresentar espaçante ou não. Esse tipo de abordagem foi aplicado com sucesso a alguns fármacos e tem como base o metabolismo normal de triglicerídios^{98,99}. Derivados de ácido acetilsalicílico,^{100,101} indometacina,¹⁰¹ clorambucil¹⁰² e GABA,¹⁰³ entre outros, foram sintetizados, apresentando diminuição sensível dos respectivos efeitos adversos.

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Face à necessidade de quimioterápicos realmente úteis contra malária, especialmente malária resistente, e menos tóxicos, em se tratando de malária sensível, é imperativa a busca de novas alternativas que enriqueçam o arsenal terapêutico contra a parasitose.

Utilizando-se como base a biossíntese de fosfolipídios de parasitas²²⁻²⁴ e empregando-se o bioisosterismo^{86,87} e a adição de grupos volumosos, pretende-se obter antagonistas da serina, impedindo, assim, a ação das enzimas fosfatidilserina sintase e serina descarboxilase. Desta maneira, pretende-se inibir a síntese de fosfatidilserina e etanolamina,

respectivamente. Tendo em vista que a fosfatidilserina é a principal precursora de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, espera-se inibir a biossíntese destes outros fosfolipídios.

Acredita-se, também, que os isósteros da serina também possam inibir a biossíntese de ácido fólico do parasita, por ação na enzima serina-hidroximetiltransferase.

Os antagonistas da serina devem apresentar grupos volumosos, anéis heterocíclicos, no lugar da carboxila. Os heterociclos escolhidos são derivados diidroimidazólicos, diidroxazólicos, diidroxatiólicos, tetraidropirimidínicos, diidrooxazínicos e diidrooxatiínicos.

A Figura 20 mostra a serina e os antagonistas metabólicos da serina planejados.

Figura 20. Serina e Antagonistas de serina planejados.

Para direcionar estes compostos ao eritrócito infectado, pretende-se condensá-los com fosfolipídios. Com isto pode-se aproveitar a absorção diferenciada da célula infectada formando um fármaco dirigido. Pretende-se,

ainda, realizar variações no comprimento das cadeias alquílicas do diglicerídeo, utilizando ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos palmítico e esteárico.

A Figura 21 mostra os fosfoglicerídios propostos.

Figura 21. Antagonistas de serina condensados a fosfolipídios.

3.1 Planejamento das sínteses

3.1.1 Síntese dos bioisósteros heterocíclicos de serina

Os heterociclos podem ser obtidos por meio de duas técnicas: apenas com refluxo ou com ultrassom.

Na primeira técnica submete-se o aminoácido protegido ao refluxo em tolueno juntamente com os compostos para ciclização como, por exemplo, a etilenodiamina, o aminoetanol e a propanolamina^{104,105}.

A segunda técnica utiliza o equipamento de ultrassom por 30 minutos.

O esquema 1 mostra as reações de obtenção dos derivados heterocíclicos de serina.

Esquema 1. Reações de síntese dos derivados heterocíclicos propostos.

3.1.1.1 Liberação do grupo *O*-*t*-butil

Uma vez substituída a carboxila pelo anel heterocíclico, realiza-se a clivagem do grupo *O*-*t*-butil. Esta clivagem pode ser realizada sem promover a quebra do heterocíclico e nem a clivagem do grupo Fmoc^{104,105}. A clivagem é efetuada por meio do ácido trifluoracético. O esquema 2 mostra a liberação do grupo *t*-butílico.

Esquema 2. Clivagem do grupo tritílico.

3.1.2 Síntese dos diglicerídios

Os diglicerídios podem ser obtidos a partir do refluxo do 2,3-dibromo-1-propanol com o ácido desejado, utilizando-se trietilamina, ou DBU como aceptores de prótons. O esquema 3 mostra a obtenção do diglicerídios^{106,107}.

Esquema 3. Obtenção dos diglicerídios.

3.1.3 Obtenção dos fosfolipídios

Uma vez obtidos os éteres lipídicos, reage-se com o ácido fosfórico para produzir o fosfolipídio,^{108,109} como mostra o esquema 4.

Esquema 4. Síntese dos fosfolipídios.

3.1.4 Condensação dos antagonistas propostos com os fosfolipídios

Utilizando-se a mesma técnica para a obtenção do fosfolipídio, emprega-se o refluxo para realizar a condensação dos antagonistas pretendidos, conforme mostra o esquema 5^{108,109}.

Esquema 5. Condensação dos fosfolipídios com antagonistas propostos.

3.1.4.1 Clivagem do grupo Fmoc do fármaco dirigido

A desproteção do grupo 9-florenilmetilcarbamato ocorre em meio alcalino e dimetilformamida^{103,104}. O esquema 6 mostra a clivagem do grupo protetor.

Esquema 6. Clivagem do grupo Fmoc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes e solventes

- Acetonitrila (Vetec)
- Ácido clorídrico (Vetec)
- Ácido esteárico (Vetec)
- Ácido fórmico (VETEC)
- Ácido sulfúrico (F. Maia)
- Ácido tricloroacético (MERCK)
- Ácido trifluoroacético (MERCK)
- Água deuterada (Aldrich)
- Brometo de potássio (Aldrich)
- Clorofórmio (Merck)
- Clorofórmio deuterado (Aldrich)
- 1,8-diazobiciclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) Sigma
- 2,3-dibromo-propanol (Sigma)
- Diclorometano (Merck)
- Dietilamina (Cinética)
- Éter etílico (Merck)
- Etilenodiamina (Merck)
- Etanolamina (Merck)
- Hidróxido de sódio (Vetec)
- Mercaptoetanol (Aldrich)
- Mercaptopropanol (Aldrich)
- Metanol (Merck)
- Placa em sílica-gel G60 F₂₅₄ para cromatografia em camada delgada (Merck)
- Propanolamina (Merck)
- Propilenodiamina (Aldrich)
- Serina NH-Fmoc-O-*t*-butil(Aldrich)
- Sílica-gel 60 (100-200 #) grade 634 (Aldrich)
- Sulfato de sódio (Vetec)
- Tetraidrofurano (Merck)

- Trietilamina (Cinética)

4.1.2. Equipamentos

4.1.2.1 Cromatógrafo para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatógrafo Shimadzu, equipado com estação de trabalho Class VP, com módulo de detecção SPD 10 A para análise no UV, utilizando coluna Lichrospher 100, RP 18, disponível no laboratório de Química Farmacêutica, FCF, USP, e com módulo espectrofluorimétrico, na Universidade de Mogi das Cruzes..

4.1.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Espectrômetro Advance DPX Brücker 300 MHz, disponível na FCF, USP.

4.1.2.3 Infravermelho

Espectrômetro FT-IR Bomem, disponível na FCF, USP.

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese dos bioisósteros de serina sob refluxo

4.2.1.1 Síntese do derivado diidroimidazólico protegido com NH-Fmoc-O-t-butil

Experimento 1

Em balão de 125 mL, adicionou-se 0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de serina NH-Fmoc-O-*t*-butil devidamente solubilizada em 25 mL de tolueno. Em seguida, adicionaram-se 0,09 mL ($1,35 \cdot 10^{-3}$) de etilenodiamina e 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Prosseguiu-se sob refluxo à temperatura de 80 °C, por duas horas. Interrompeu-se, então, o refluxo e destilou-se o tolueno sob pressão reduzida. O sólido resultante foi lavado com éter dietílico. O sobrenadante foi, então, seco com sulfato de magnésio anidro e filtrado. O solvente foi evaporado e o sólido obtido analisado por RMN.

Experimento 2

Em balão de 125 mL, adicionou-se 0,5 g ($1,3 \cdot 10^{-3}$ mol) de serina NH-Fmoc-O-*t*-butil devidamente solubilizada em 25 mL de tetraidrofurano. Em seguida, adicionaram-se 0,45 mL ($6,67 \cdot 10^{-4}$ mol) de etilenodiamina e 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Prosseguiu-se sob refluxo à temperatura de 80 °C, por duas horas. Interrompeu-se, então, o refluxo e filtrou-se o precipitado formado na reação. O líquido obtido foi evaporado em evaporador rotatório. O sólido resultante foi solubilizado em acetona e novamente filtrado. O solvente foi evaporado e o sólido obtido analisado por RMN.

4.2.1.2 Síntese da oxazolina protegida com NH-Fmoc-O-*t*-butil

Em um balão de 125 mL, solubilizaram-se 0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de serina NH-Fmoc-O-*t*-butil, juntamente com 0,017 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de etanolamina e 1 gota de ácido clorídrico concentrado. Seguiu-se com refluxo por 3 horas. Depois de interrompido o refluxo, realizou-se a extração em funil de separação com 3 porções de 30 mL de solução 0,1 M de carbonato de sódio. A fase

orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro e, em seguida, filtrada e o solvente evaporado. O sólido obtido foi recrystalizado em acetona e filtrado. O líquido obtido foi secado novamente com sulfato de sódio, analisando-se o sólido obtido.

4.2.1.3 Síntese do derivado diidroxatiólico protegido com NH-Fmoc-O-*t*-butil

Em balão de 125 mL, solubilizaram-se 0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de serina NH-Fmoc-O-*t*-butil, juntamente com 0,021 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de mercaptoetanol e 1 gota de ácido clorídrico concentrado. Seguiu-se com refluxo por 3 horas. Depois de interrompido o refluxo, realizou-se a extração em funil de separação com 3 porções de 30 mL de solução 0,1 M de carbonato de sódio. A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro e, em seguida, filtrada e o solvente evaporado.

4.2.1.4 Síntese do derivado diidroxazinico protegido com NH-Fmoc-O-*t*-butil

Em balão de 125 mL, solubilizaram-se 0,1g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) de serina NH-Fmoc-O-*t*-butil, juntamente com propanolamina 0,020 mol ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol) e 1 gota de ácido clorídrico concentrado. Seguiu-se com refluxo por 3 horas. Depois de

interrompido o refluxo, realizou-se a extração em funil de separação com 3 porções de 30 mL de solução 0,1 M de carbonato de sódio. A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro e em seguida filtrada e o solvente evaporado.

4.2.2 Síntese dos bioisósteros de serina utilizando ultrassom

Em erlenmeyers, solubilizou-se serina NH-Fmoc-O-*t*-butil em 15 mL de tetraidrofurano. Em seguida, adicionaram-se etanolamina, etilenodiamina, propanolamina, propilenodiamina mercaptoetanol, de acordo com o anel heterocíclico desejado. A Tabela II mostra as quantidades dos reagentes utilizados na síntese com ultrassom.

Tabela II. Condições reacionais para obtenção heterociclos com ultrassom

<div>Reagente</div> <div>Heterociclo</div>	diidroimidazol	diidroxazol	diidroxazina	tetraidropirimidina	oxatiol
Serina NH-Fmoc-O-butil	0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)	0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)	0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)	0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)	0,1 g ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)
etilenodiamina	0,017 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)				
etanolamina		0,016 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)			
propanolamina			0,020 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)		
propilenodiamina				0,021 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)	
mercaptoetanol					0,020 mL ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol)

Submeteu-se a reação ao ultrassom, por 30 minutos. Filtrou-se o meio reacional. O sobrenadante foi extraído em evaporador rotatório e o sólido obtido foi analisado por espectroscopia no infravermelho e por RMN ^1H e ^{13}C . O tempo reacional foi determinado por cromatografia em camada delgada, utilizando-se fase móvel diclorometano:metanol (8:2).

4.2.3 Desproteção do grupo O-*t*-butil dos derivados obtidos

4.2.3.1 Com ácido fórmico

Em balão de 50 mL adicionaram-se 0,2 g ($4,91 \cdot 10^{-4}$ mol) do derivado heterocíclico protegido com os grupos NH-Fmoc e O-*t*-butil, previamente sintetizado, juntamente com 10 mL de ácido fórmico e manteve-se sob agitação por 24 horas. O ácido fórmico foi, então, evaporado em destilador horizontal sob pressão reduzida. O sólido resultante foi analisado por CCD.

4.2.3.2 Com ácido tricloroacético

Em balão de 50 mL, adicionaram-se 0,2 g ($4,91 \cdot 10^{-4}$ mol) do derivado heterocíclico protegido, previamente sintetizado, juntamente com 20 mL de diclorometano e 0,5 g ($3 \cdot 10^{-3}$ mol) de ácido tricloroacético. A reação foi mantida em agitação à temperatura ambiente, por 36 horas. A agitação foi, então, interrompida e o meio reacional foi transferido para funil de separação. Adicionaram-se 200 mL de solução de carbonato de sódio 10% (p/v) até atingir a neutralidade. A fase orgânica foi, então extraída e evaporada em evaporador rotatório. O sólido obtido foi secado em bomba de alto vácuo e submetido à separação por coluna cromatográfica, utilizando fase móvel diclorometano:metanol (8:1). As frações com R_f 0,6 foram coletadas e, então, evaporadas em evaporador rotatório e analisadas por CLAE e RMN.

4.2.3.3 Com ácido trifluoracético

A desproteção do derivado heterocíclico protegido, utilizando-se o ácido trifluoracético, procedeu-se à temperatura ambiente, durante 15 horas, utilizando-se como meio reacional mistura de ácido trifluoracético e diclorometano (1:2), sob agitação magnética 0,2 g ($4,91 \cdot 10^{-4}$ mol) do derivado. Em seguida, a reação foi interrompida e o meio reacional transferido para um funil de separação, em que foi extraído com 5 porções de 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 M. A fase orgânica foi extraída e coletada em sulfato de sódio, o qual foi posteriormente filtrado. O líquido resultante foi secado em evaporador rotatório e o produto obtido analisado no infravermelho.

4.2.4 Desproteção do grupo Fmoc dos derivados heterocíclicos de serina

A desproteção do grupo NH-Fmoc se deu através da agitação dos derivados heterocíclicos desprotegidos do grupo *O*-*t*-butílico, com 10 mL de mistura tetraidrofurano e dietilamina (2:1), durante 5 horas em banho de gelo. Após o período de agitação, transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação e, então, efetuaram-se três lavagens com 15 mL de água destilada. A fração orgânica foi, em seguida, recolhida em erlenmeyer contendo sulfato de sódio e filtrada. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O sólido obtido foi suspenso em éter etílico e filtrado. O sobrenadante foi coletado e evaporado. O produto obtido da fase etérea foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C e no IV. A Tabela III mostra as proporções molares dos heterociclos protegidos serina:

Tabela III. Massas e número de mol dos derivados protegidos de serina

Derivado heterocíclico	Massa(g)/mol
diidroimidazólico	0,05/1,45.10 ⁻⁴
diidrooxazólico	0,05/1,42.10 ⁻⁴
diidroxatiólico	0,05/1,35.10 ⁻⁴
diidroxazínico	0,05/1,36.10 ⁻⁴
diidropiridínico	0,05/1,36.10 ⁻⁴

4.2.4.1 Desproteção do grupo Fmoc dos heterociclos de serina e formação de cloridrato

A reação seguiu o método anteriormente descrito. Adicionaram-se 5 gotas de ácido clorídrico na fração orgânica. O precipitado formado foi, então, filtrado e analisado por RMN ¹H ¹³C e no IV.

4.2.5 Síntese dos transportadores glicerídicos

4.2.5.1 1,2-Diestearilglicerol

Experimento 1

Em balão de fundo redondo, solubilizaram-se 1,98 g (7,0 .10⁻³ mol) de ácido esteárico, 3 mL de trietilamina em 20 mL de tetraidrofurano, mantendo-se sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,38 mL de 1,2-dibromo-propanol (14.10⁻³mol) e manteve-se sob refluxo por 4 horas. A solução foi, então, conservada em geladeira e filtrada. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotatório e analisado no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

Experimento 2

Em um balão de fundo redondo, solubilizaram-se, 1,98 g (7,0 .10⁻³ mol) de ácido esteárico, 2 mL de DBU (7,0 .10⁻³ mol) em 20 mL de tetraidrofurano, e mantido sob agitação magnética por 30 minutos. Após 30 minutos, adicionou-

se 0,38 mL ($14 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,2-dibromo-propanol, mantendo-se a reação sob refluxo por 4 horas a 80 °C. Em seguida, a solução foi conservada em geladeira e então filtrada. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotatório e analisado no IV e por CLAE .

Experimento 3

Em um balão de fundo redondo, solubilizaram-se, 1,98 g ($7,0 \cdot 10^{-3}$ mol) de ácido esteárico, 2 mL de DBU ($7,0 \cdot 10^{-3}$ mol) em 20 mL de tetraidrofurano, mantendo-se sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,38 mL ($14 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,2-dibromo-propanol e manteve-se sob refluxo por 24 horas 80 °C. A solução foi, então, mantida em geladeira e filtrada. O sobrenadante foi evaporado em evaporador rotatório e analisado no IV e por CLAE.

4.2.5.2 *Fosfodiestearilglicerol*

Do 1,2-diestearilglicerol obtido na etapa anterior, solubilizou-se 0,5 g ($8 \cdot 10^{-3}$ mol) em 20 mL de tetraidrofurano, adicionando-se 2 mL de ácido fosfórico e refluxando-se a mistura em banho de vaselina aquecida a 90°C, com auxílio de um agitador magnético, por 4 horas. Evaporou-se, então, o tetraidrofurano em evaporador rotatório e, no composto restante dentro do balão, adicionaram-se 30 mL de diclorometano para solubilização. Extraiu-se da fase orgânica, utilizando-se funil de separação e porções de 30 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, descartando-se a fase aquosa da mistura. Esta operação foi repetida por mais 2 vezes. À fase orgânica adicionaram-se, então, 10 g de sulfato de sódio anidro e, após filtração, evaporou-se o diclorometano da solução restante no balão em evaporador rotatório. O produto obtido foi analisado por CLAE e no infravermelho.

4.3 Análises

4.3.1. Análise cromatográfica

4.3.1.1 Por cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise de CCD foi efetuada em placas de sílica-gel G₆₀ da Merck, para o acompanhamento das reações e para avaliação da pureza de alguns produtos sintetizados. As fases móveis empregadas variaram de acordo com o experimento.

4.3.1.2 Por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu, equipado com estação de trabalho Class VP, com módulo de detecção SPD 10 A para análise no UV e para detecção espectrofluorimétrica, utilizando coluna Lichrospher 100, RP 18 (C18), disponível na FCF, USP, e na Universidade de Mogi das Cruzes. As fases móveis utilizadas variaram de acordo com o produto analisado.

4.3.2. Análises espectrométricas

As análises no infravermelho foram efetuadas no espectrofotômetro FTIR Bomem. Já as de ¹H RMN e de ¹³C RMN foram efetuadas em espectrômetro Advanced DPX Brücker 300 MHz, na FCF, USP.

4.3.3 Análise conformacional do 2,3-dibromo-1-propanol

A análise conformacional do 2,3-dibromo-1-propanol foi realizada utilizando o programa SPARTAN para Linux. Efetuou-se a otimização da geometria do composto por mecânica molecular e a análise conformacional pelo método de Monte Carlo. O confômero de menor energia foi avaliado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos bioisósteros de serina com refluxo

5.1.1 Síntese do derivado diidroimidazólico

A reação de formação do diidroimidazol derivado da serina mostrou-se eficaz tanto no experimento 1 quanto no 2. Em ambos os casos, a análise por RMN ^1H mostrou não haver mais o sinal referente ao hidrogênio ligado à carboxila ácida encontrada em 12 ppm. O espectro 1 mostra o perfil geral da formação da imidazolina.

Espectro 1 (RMN ^1H , 300 MHz, acetona deuterada, δ ppm). Derivado diidroimidazólico de serina protegido (espectro completo).

A análise detalhada por RMN ^1H mostrou a presença dos tripletos em 1,92 δ e 2,08 δ referentes aos hidrogênios 1 e 2, que formam o anel

imidazolinico. Esta mesma análise mostrou que na região de 2,71 δ encontra-se um singlete largo, referente à amina do anel imidazolinico. O espectro 2 mostra a visão ampliada da região entre 0-3,0 δ .

Espectro 2 (RMN ^1H , 300 MHz, acetona deuterada, δ ppm). Derivado diidroimidazólico protegido. Região ampliada 0-3 ppm.

Atribuições: RMN ^1H (300 MHz, acetona deuterada, δ ppm): 7,71(d, H, H12); 7,69 (d, H, H9); 7,43 (d, H, H12,21); 7,89 (d, H, 13, 20) 7,84 (d, H, 15,18) 7,28 (d, H, 14,19); 6,82 (s, NH, H7); 6,05 (d, 2H, H8); 4,0-4,05, (m, 2H, 5a, 5b); 3,88-3,90(m, H, H4) 2,71 (s, NH, H3); 2,08 (t, 2H, H2); 1,92 (t, 2H, H1) 1,09 (s, 9H, 6a, 6b, 6c).

A análise por RMN ^{13}C mostrou o desaparecimento do sinal referente à carboxila ácida. O sinal de baixa intensidade, localizado em 151 ppm, refere-se ao carbono que conecta o heterociclo à serina que forma a imidazolina (carbono 3). Os carbonos 1 e 2 aparecem em 46 δ . O espectro 3 mostra a análise de RMN ^{13}C .

Espectro 3 (RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Derivado diidroimidazólico protegido.

Atribuições: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 151 (C3); 143 (C8); 137 (C11 e C22); 131 (C12 e C21); 129 (C13 e C20); 127 (C14 e C19); 125 (C15 e C18); 124 (C16 e C17); 123 (C9); 107 (C10); 67 (C5); 46 (C1 e C2); 34 (C4) 29 (6a, 6b, 6c).

5.1.2 Síntese do derivado diidroxazólico

O método de síntese do derivado diidrooxazólico mostrou-se eficaz, porém a purificação do composto requer aprimoramentos. Isto porque o espectro de RMN ^1H mostrou sinal referente ao próton ligado à amina, representado, então, pelo sinal largo localizado em 1,92 δ , característico de amina substituída. A análise realizada por CLAE mostra a presença de 3

sinais com os seguintes tempos de retenção: 2,98, 3,66 e 4,54 minutos, o que evidencia a existência de mistura do composto em sua forma aberta e em sua forma cíclica (cromatograma 1). Ainda existe um contaminante, possivelmente o aminoetanol, que não reagiu. Esta informação pode ser confirmada pela presença de sinal de amina em 6,20 δ no espectro de RMN ^1H (espectro 4).

Espectro 4 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) Derivado diidroxazólico.

Atribuições: ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,80(d, 2H, H12, H19); 7,73 (d, H, H9); 7,70 (d, 2H, H11, H20); 7,68 (d, 2H, H13, H18); 7,34 (d, 2H, H13, H15); 6,15 (s, NH, H7); 5,72 (d, 2H, H8); 4,23-4,29(m, 2H, 5a,5b) 2,71 (s, NH, H7); 1,92 (t, 2H, H2); 1,41(t, 2H, H1); 1,26 (s, 9H, 6a, 6b, 6c).

Cromatograma 1. Derivado diidroxazólico. Condições cromatográficas: Fase móvel: 90% de acetonitrila e 10% de metanol com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

5.1.3 Síntese do derivado diidroxatiólico

A análise por RMN ^1H não permite confirmar a presença do composto pretendido (espectro 5). Isto se deve ao fato de que não é possível visualizar a porção referente ao anel diidroxitiólico, embora seja possível visualizar os sinais referentes ao grupo Fmoc, com seus hidrogênios ligados a anel aromático encontrados entre 6 e 7 δ . A evidência de que este composto foi obtido está na análise por CLAE (cromatograma 2). Nesta são encontrados 3 sinais, presentes nos seguintes tempos de retenção: 3,04, 3,63 e 4,30 minutos. Devido à baixa polaridade do derivado sulfurado e considerando-se a fase móvel acetonitrila:metanol (80:30), presume-se que o composto em questão corresponda ao tempo de retenção de 4,307 minutos. Outra evidência de que este composto tenha se formado é a ausência do sinal no RMN referente à carboxila presente na serina, utilizada como reagente de partida.

Nesta mistura, o composto pretendido apresenta-se em concentração de apenas 12%. Acredita-se que esta baixa concentração se deva à baixa reatividade do átomo de enxofre.

Cromatograma 2. Derivado diidroxatiólico com impurezas. Fase móvel: 90% de acetonitrila e 10% de metanol com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

Espectro 5 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Produto na reação de síntese do derivado diidrooxatiólico.

5.1.4 Síntese do derivado do diidrooxazínico

Na síntese do derivado diidrooxazínico não foi possível realizar o ensaio cromatográfico, o que dificulta a confirmação da estrutura, haja visto que o espectro deste composto não se apresenta suficientemente definido (espectro 6).

Existem indicações de que a molécula tenha sido obtida, uma vez que estão presentes os sinais referentes aos hidrogênios pertencentes ao grupo Fmoc.

carboxílicos, presente em 1698 cm^{-1} e referente ao grupamento ácido carboxílico da serina.

A análise do espectro 7 referente ao derivado imidazólico de serina mostra a presença de 3 bandas, 1521 , 1610 e 1649 cm^{-1} . Estas são características das vibrações de deformação angular de N-H, referentes aos grupamentos amínico inserido para a formação do derivado heterocíclico de serina. Estas bandas, juntamente com aquela localizada em 1260 cm^{-1} , característica da deformação de axial C-N, indicam obtenção do derivado

proposto. O espectro no infravermelho do derivado diidroimidazólico exemplifica os espectros de IV dos compostos obtidos.

Espectro 7: Derivado diidroimidazólico de serina obtido por ultrassom.

A análise por RMN ^1H (espectro 8) mostra sinais entre 7-8 δ , indicando a presença dos hidrogênios aromáticos do grupo Fmoc. Também é possível visualizar o grupamento *O*-*t*-butílico em 1,45 δ .

Na região de 1,78 δ , encontra-se sinal referente ao hidrogênio amínico, presente no derivado diidroimidazólico de serina formado, porém não é possível visualizar os sinais referentes aos hidrogênios do anel heterocíclico,

Cromatograma 3. Produto de reação da síntese do derivado diidroimidazólico. Condições cromatográficas: Fase móvel: 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

Cromatograma 4. Serina NH-Fmoc-O-*t*-butil utilizada como reagente de partida. Condições cromatográficas: Fase móvel: 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

Espectro 10 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Derivado diidroxazínico.

Durante a síntese deste composto por ultrassom, formou-se um precipitado, que foi analisado por RMN ^1H . O espectro de ressonância de hidrogênio deste precipitado mostra a presença do derivado heterocíclico. A análise ainda revela que ocorreu a desproteção do grupo Fmoc. Esta desproteção ocorreu devido ao caráter alcalino do meio reacional. O espectro 11 mostra a espectrometria de RMN ^1H do precipitado obtido na síntese do derivado diidropirimidínico. O espectro 12 se refere à análise de RMN ^{13}C .

Espectro 11 (^1H , 300 MHz, D_2O , δ ppm). Precipitado obtido na síntese do derivado diidropirimidínico.

Espectro 12 (RMN ^{13}C , 75 MHz, D_2O , δppm). Precipitado obtido na síntese do derivado diidropirimidínico

Acredita-se que a presença do precipitado se deva à formação do derivado desprotegido na forma de um sal.

A análise por RMN ^1H (espectro 11) mostra a desproteção devido à ausência dos sinais de referentes aos prótons aromáticos presentes no grupo Fmoc, o quais usualmente se encontram na região entre 6 e 8 δ .

Confirmação análoga pode ser feita por meio da análise do espectro de RMN ^{13}C (espectro 12), o qual não mostra os sinais referentes aos carbonos aromáticos, presentes na região de 120 a 140 ppm.

Este mesmo processo ocorreu com os derivados diidroimidazólico, diidroxazólico, diidroxazínico e diidroxatiólico da serina

5.3 Desproteção do grupo *O*-*t*-butil dos bioisósteros de serina

A desproteção utilizando o ácido fórmico mostrou-se ineficaz, uma vez que a imidazolina previamente obtida não foi solubilizada nesse ácido. Utilizando a cromatografia por camada delgada, não foi possível observar a presença de um composto.

Para solucionar este problema utilizou-se a técnica de clivagem com ácido tricloroacético em diclorometano.

A análise por CLAE mostrou a presença de dois picos com tempos de retenção de 6,052 minutos e 7,258 minutos. A presença destes sinais mostra que, provavelmente, existe a mistura entre a imidazolina protegida e a desprotegida. O cromatograma 5 mostra a mistura descrita.

Cromatograma 5. CLAE do produto da desproteção do derivado diidromidazólico protegido. Condições cromatográficas: Fase móvel com 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min, utilizando coluna C18, detector de UV em 254 nm.

Esta informação pode ser confirmada na análise por RMN ^1H (espectro 10). O espectro foi dividido em regiões, para facilitar a visualização. É possível observar a presença dos sinais referentes às metilas em 1,25 δ . Porém, também é possível observar na região entre 4,20 e 4,30 ppm, o quadrupletto

referente à hidroxila desprotegida (espectro 11). Completando a varredura, no espectro 13 encontram-se os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos presentes no grupo Fmoc, localizados entre 7,70 e 7,5 δ . O singlete em 1,71 δ pertence ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da imidazolina.

Espectro 13. (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Região entre 0 e 2,0 ppm.

O espectro 14 mostra a região ampliada entre 3,5 e 4,0 δ do composto mencionado.

Espectro 14 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Região entre 3,5 e 4,0 ppm.

O espectro 15 mostra a região ampliada entre 7 e 8 ppm.

Es
pe
ctr
o
15
(R
M
N
 ^1H ,
30
0
M
Hz,
CD

Cl_3 , δ ppm). Região entre 7,2 e 8,0 ppm.

Atribuições do espectro total: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,72(d, 2H,, H8,H15); 7,68 (d, 2H, H9, 14); 7,54 (d, 2H, H10,H13); 7,25 (d, 2H, H11,H12); 4,21 (d, 2H, H5a, H5b); 4,02(d, H ,H4) 3,64 (d, H7, H7) 1,71 (s, NH, H3); 1,25 (s, 9H, 16a, 16b, 16c).

Após a tentativa de desproteção do grupo *O*-*t*-butil utilizando-se o ácido tricloroacético e o formaldeído, tentou-se desproteger utilizando-se o ácido trifluoroacético. Os espectros 16 a 18 correspondem ao infravermelho dos compostos diidroimidazólico, diidrooxazolico e diidrooxazinico:

Espectro 16. IV (KBr, ν cm⁻¹) do bioisómero imidazólico de serina desprotegido do grupo *O*-*t*-butil.

Espectro 17. IV (KBr, ν cm⁻¹) do bioisómero diidroxazólico de serina.

Espectro 18. IV (KBr, ν cm⁻¹) :Espectro do bioisótero oxazínico

Nestes três espectros é possível observar a presença de uma banda em 3016 cm⁻¹, o que indica a presença de uma hidroxila livre, sugerindo que a desproteção do grupo *O*-*t*-butil ocorreu. Este sinal não está presente no espectro no IV da serina protegida (espectro 19). Ainda em comparação com derivado de serina protegida, não são visíveis os sinais referentes aos grupamentos alquílicos alifáticos localizados em 2881 e 2931 cm⁻¹, os quais seriam referentes ao grupamento *t*-butil.

Espectro 19. IV (KBr, ν cm⁻¹): Espectro de de serina protegida com grupos Fmoc e *O*-*t*-butil.

O espectro de RMN ¹H (espectro 20) do compostodiidrooxazólico mostra ausência dos sinais metílicos do grupo *t*-butil, em 1,24 ppm, indicando que houve a desproteção deste grupo.

Espectro 20 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Derivado oxazólico desprotegido do grupo *O*-*t*-butílico.

5.4 Desproteção do grupo NH-Fmoc

A desproteção do grupo NH-Fmoc mostrou-se eficaz, uma vez que pela análise do espectro de RMN ^1H (espectro 21) observou-se o desaparecimento dos sinais de grupos aromáticos encontrados na região de 6,0-8,0 ppm. Ainda é possível observar um sinal referente à amina, agora desprotegida, em 9,5 ppm e, também, um sinal fraco na linha base entre 2,0 e 3,0 ppm, indicando a presença da amina imidazolinica.

Espectro 21 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Derivado diidroimidazólico desprotegido do grupo Fmoc.

Os sinais na região de 1,4 e 1,6 ppm indicam a presença dos hidrogênios 1 e 2 do anel imidazólico, confirmando a presença da imidazolina. O espectro 22 mostra a região ampliada entre 0 e 3,5 ppm.

Es
pe
ctr
o
22
(R
M
N
1H,
30
0
M
Hz,
CD
Cl3
,
δ

ppm). Derivado diidroimidazólico da serina desprotegido de Fmoc. Ampliação da região entre 0 e 3,50 ppm.

Atribuições: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 9,51 (s, NH, H3); 3,4-3,6 (m, 1H, H5b); 3,07-3,1 (m, 1H, H5a); 2,37 (t, 1H, H4); 1,65 (t, 2H, H2); 1,48 (t, 2H, H1); 1,25 (s, 9H, 6a, 6b, 6c).

A presença do sinal em 9,51 ppm refere-se ao NH do anel imidazólico em tautomerismo anelar, o que faz o sinal amínico aparecer em campo mais baixo. O sinal referente ao grupo amínico primário aparece na forma de uma ondulação na linha base encontrada na região de 2,5 ppm, o qual fica oculto pelo sinal do tripleto em 2,37 ppm.

5.5 Formação dos bioisósteros de serina

Os derivados heterocíclicos de serina obtidos anteriormente e desprotegidos do grupo O-*t*-butil foram submetidos à desproteção do grupo NH-Fmoc, utilizando a dietilamina. Na primeira síntese ocorreu a desproteção do derivado diidroimidazólico. O espectro de RMN ^1H (espectro 23) mostra a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos presentes no grupo Fmoc, localizados entre 6,0 e 8,0 ppm, confirmando a desproteção do composto. Também está ausente o singlete em 1,5 ppm referente aos hidrogênios metílicos do grupo *t*-butílico.

Espectro 23 (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm). Derivado diidroimidazólico da serina desprotegido.

Espectro 25. IV (KBr, ν cm⁻¹) Derivado imidazólico de serina.

Embora o composto final tenha sido sintetizado com êxito, o espectro de RMN ¹³C não apresentou boa definição devido à baixa solubilidade deste em clorofórmio deuterado. Além disto, a análise por CCD mostrou contaminação pelo grupo *t*-butílico.

Visando facilitar a purificação do composto final, utilizou-se a estratégia de formação do cloridrato do derivado heterocíclico. Esta estratégia também melhora a solubilidade do composto em água, permitindo, desta maneira, melhorar a definição dos espectros de RMN. Os espectros 26, 27 e 28 mostram a melhor definição mencionada.

Espectro 26 (RMN ¹H, 300 MHz, D₂O, δ ppm). Derivado diidroimidazólico na forma de cloridrato.

Espectro 27 (RMN ¹H, 300 MHz, D₂O, δ ppm): Derivado diidroimidazólico (região ampliada entre 0-3 ppm).

Espectro 28 (RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): Espectro de carbonos do derivado diidroimidazólico na forma de cloridrato.

No espectro de RMN ^1H não estão visíveis os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos grupos *t*-butil, assim como também não estão visíveis os sinais referentes aos hidrogênios pertencentes ao grupo Fmoc.

Atribuições: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,04 (q, 1H, H₄); 2,89 (t, 2H, H₅); 1,72-1,78 (m, NH, 2H); 1,26 (t, 2H, H₂); 0,42 (t, 2H, H₂),

Atribuições: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 57,01 (C₅); 44,92 (C₄); 21,73 (C₂); 17,62 (C₁)

No espectro de ^{13}C , aparecem os sinais referentes a ciclo formado em 21 e 17 ppm. Também é possível visualizar os sinais referentes aos carbonos 4 e 5. Porém, não é possível visualizar o sinal referente ao carbono 3 do heterociclo formado.

A análise por CLAE mostra a presença de pequena contaminação, a qual não foi possível visualizar no espectro de RMN. O cromatograma 6 mostra a análise do derivado diidroimidazólico obtido.

Cromatograma 6. Cloridrato do derivado diidroimidazólico de serina. Condições cromatográficas: Fase móvel: 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

Uma vez que a formação do cloridrato do derivado formado mostrou-se eficaz para a purificação do produto final, assim como para a solubilidade em água e conseqüentemente para a análise por RMN, adotou-se a mesma estratégia para obtenção dos derivados restantes. O espectro 29 mostra a análise de RMN ^1H para o derivado diidroxazólico na forma de cloridrato.

Espectro 30 (RMN ¹H, 300 MHz, D₂O, δ ppm). Derivado diidroxazólico da serina com supressão de água.

Atribuições: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3,03 (q, 1H, H4); 2,84 (t, 2H, H5); 1,63-1,74(m, NH, 2H); 1,19(t, 2H, H2); 0,5 (t, H, H1)

Pela análise de RMN ¹³C do composto final obtido (espectro 31) observa-se a presença do sinal carbinólico, confirmando a desproteção do grupo *t*-butílico. Neste espectro também se confirma a desproteção do grupo Fmoc, devido à ausência dos sinais referentes aos anéis aromáticos deste grupo.

Espectro 31 (RMN ^{13}C , 75 MHz, D_2O , δ ppm.) Derivado diidroxazólico da serina

Atribuições: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 57,13 (C_5); 45,04 (C_4); 21,85 (C_2); 17,74 (C_1)

A análise por CLAE mostrou a presença de apenas um sinal, o que evidencia a ter se obtido o composto puro.

Cromatograma 7. CLAE do cloridrato do derivado diidroxazólico. Condições cromatográficas: Fase móvel com 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min, utilizando coluna C18, detector de UV em 254 nm.

O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção do composto diidroxazínico. A análise de RMN ^1H (espectro 32) e de RMN ^{13}C (espectro 34) mostra que as desproteções dos grupos Fmoc e *t*-butil ocorreram com sucesso.

Espectro 32 (RMN ¹H, 300 MHz, D₂O, δ ppm). Cloridato do bioisómero diidroxazínico da serina.

Atribuições: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3,04 (q, 1H, H5) 2,90 (t, 2H, H6); 1,69-1,80 (m, 2H, H2); 1,25 (t, 1H, H1); 0,65 (t, 2H, H3),

Espectro 33 (RMN ^{13}C , 75 MHz, D_2O , δ ppm). Cloridato do bioisótero diidrooxazínico.

Atribuições: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 194 (C_4); 57,01 (C_6); 44,92 (C_5); 21,74 (C_3); 17,63 (C_1); 13,21 (C_2)

A análise do espectro de RMN ^{13}C (espectro 33) confirma a desproteção do grupo *O-t*-butil pela presença do sinal em 57 ppm, referente ao carbono carbinólico. O sinal em 44,9 ppm indica a presença do carbono ligado à amina. O sinal presente em 194 ppm é referente ao carbono quaternário do anel oxazínico.

A análise por CLAE (cromatograma 8) indica a presença de apenas um sinal, o que comprova a eficácia do método de purificação.

Cromatograma 8. CLAE do cloridrato do derivado oxazínico da serina. Condições cromatográficas: Fase móvel com 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min, utilizando coluna C18 como fase estacionária e detector de UV em 254 nm.

Utilizando a mesma estratégia de purificação, através da formação de cloridrato, foi possível obter, ainda, os derivados diidropirimidínico e diidroxiático.

O composto diidropirimidínico pode ser confirmado nos espectros 34 e 35, que se referem, respectivamente, ao espectro de RMN ^1H e sua ampliação na região de 0-3,4 ppm.

Espectro 34 (RMN ^1H , 300 MHz, D_2O , δ ppm). Derivado diidropirimidínico.

Espectro 35 (RMN ^1H , 300 MHz, D_2O , δ ppm). Derivado diidropirimidínico (região ampliada 0-3,4 ppm) .

Espectro 36 (RMN ^{13}C , 75 MHz, D_2O , δ ppm). Derivado diidropirimidínico.

Atribuições: **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,03 (q, 1H, H5) 2,89 (t, 2H, H6) 1,74(m, 2H, H2); 1,25 (t, H, H1); 0,61 (t, 2H, H3),

Atribuições: **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 54,35 (C_6); 42,26 (C_5); 19,08(C_3); 14,96 (C_1); 10,54(C_2)

O cromatograma 9 mostra a presença de apenas um sinal em 1,8 min, confirmando a obtenção do derivado diidropirimidínico puro.

Cromatograma 9. CLAE do derivado diidropirimidínico. Condições cromatográficas: Fase móvel: 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

A obtenção do derivado diidroxiático pode ser comprovada pelos espectros 37 e 38, de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Espectro 37 (RMN ^1H , 300 MHz, D_2O , δ ppm). Derivado dihidroxatiólico.

Atribuições: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,05 (q, 1H, H4); 2,89(t, 2H, H5); 1,68-1,80 (m, NH, 2H); 1,24 (t, H, H1); 0,60 (t, 2H, H2)

Espectro 38 (RMN ^{13}C , 75 MHz, D_2O , δ ppm). Derivado diidroxatiólico

Atribuições: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 57,25 (C_5); 45,16 (C_4); 21,98 (C_1); 17,87 (C_2 ,)

A análise por CLAE do derivado diidroxatiólico (cromatograma 10) permitiu observar pequena contaminação persistente no composto.

Cromatograma 10. Derivado diidroxatiólico. Condições cromatográficas: Fase móvel: 100% de acetonitrila com fluxo de 1,6 mL por min. Coluna C18, utilizando detector UV em 254 nm.

5.6 Síntese dos diglicerídios

A síntese dos diglicerídios a partir do 2,3-dibromo-propanol foi realizada por duas técnicas, utilizando trietilamina ou DBU como catalisadores.

No caso da reação com trietilamina, a análise por CCD não mostrou a formação do composto esperado, nem mesmo a formação do derivado monoglicerídico, indicando, desta forma, que não houve a esterificação.

No segundo método, utilizando o DBU, a análise por CCD indicou a formação do derivado monoglicerídico. O espectro no IV do produto obtido (espectro 39) mostrou banda em 1722 cm^{-1} , que indica a presença do monoéster. No entanto, a reação ocorreu com baixo rendimento.

Espectro 39. IV(KBr, ν cm⁻¹) do produto de reação para síntese de diglicerídios de ácido esteárico.

A partir da dificuldade em se obter o derivado, sugerido pelo baixo rendimento, procedeu-se à análise conformacional, por modelagem molecular, do 2,3-dibromo-propanol, a fim de verificar sua distribuição eletrônica e seu arranjo espacial. O ensaio mostrou que o 2,3-dibromo-propanol apresenta bloqueio estérico, que impede que a reação ocorra. Este impedimento estérico se deve à hidroxila presente no carbono 1 do 2,3-dibromopropanol, que “bloqueia” o carbono 2 do referido composto. A Figura 22 mostra o impedimento estérico causado pela hidroxila.

Figura 22. Confômero de menor energia do 2,3-dibromo-propanol representado em bastão, CPK, e seu mapa de potencial eletrostático. Cores: Vermelho: O; Branco: Hidrogênio; Laranja: Bromo. Mapa de potencial eletrônico: Azul: menor concentração eletrônica; Vermelha: maior concentração eletrônica;

Este impedimento é crucial para a reação, considerando-se que esta ocorre através de mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que o ataque do nucleófilo ocorre no carbono em “face oposta” a qual se encontra o grupo abandonador. A Figura 23 mostra o mecanismo reacional utilizando DBU como catalisador.

Figura 23. Mecanismo de reação de esterificação com DBU como catalisador. Fonte: Ono *et al.*, 1978¹⁰⁹

O DBU permitiu a obtenção de melhores resultados que a trietilamina. A alteração do tempo reacional (de 4 horas para 8 horas) e temperatura (elevada de 80 °C para 120 °C no refluxo), com o intuito de fornecer mais energia à reação, “abrindo” a molécula do 1,2-dibromo-propanol, facilitaria a reação por SN_2 nos 2 carbonos da molécula.

O material obtido nesta reação analisado no IV (espectro 40) e por CLAE e os resultados indicaram que houve sucesso na esterificação com a obtenção do produto proposto.

Espectro 40. IV(KBr, ν cm^{-1}) do composto obtido da reação de esterificação com DBU. R = estearila.

Atribuições: IV (KBr, ν , cm^{-1}): 3457 (larga, νOH); 2915, 2849 (forte, $\nu\text{C-H}$ alifático); 1735 (forte, $\nu\text{C=O}$ éster); 1139 (fraca, $\nu\text{C-O}$)

A banda de 1735 cm^{-1} observada no espectro 41 indica estiramento carbonila de éster do composto, que foi obtido com maior rendimento, confirmando, assim, o sucesso da 1ª etapa da síntese.

Na análise por CLAE (cromatograma 11), o pico único em 1,742 minutos indica a presença de apenas um produto.

Cromatograma 11. Análise por CLAE do composto do composto obtido da reação de esterificação com DBU. Condições Cromatográficas: Fase móvel com 50% acetonitrila:50% metanol, com fluxo de 1,0 mL por min, utilizando coluna C18 como fase estacionária e detector espectrofluorimétrico com excitação em 305 nm e emissão em 395 nm.

Após a obtenção do 1,2-diestearilglicerol, realizou-se a esterificação do mesmo com ácido fosfórico para a formação do 1,2-diestearil-fosfatidil-glicerol. O produto formado foi analisado por CLAE (cromatograma 12) e no IV (espectro 41).

Cromatograma 12. Análise por CLAE do composto resultante da fosforilação do 1,2-diestearilglicerol. Condições cromatográficas: Fase móvel com 50% acetonitrila:50% metanol, com fluxo de 1,0 mL por min., utilizando coluna C18 como fase estacionária e detector espectrofluorimétrico com excitação em 305 e emissão em 395 nm.

O pico em 2,25 minutos indica a presença de um único composto e o fato de o tempo de retenção ser diferente daquele do 1,2-diestearilglicerol sugere a presença de um derivado com características mais polares, provavelmente o composto esperado, uma vez que a introdução do grupo fosfórico à molécula torna-a mais polar, com a criação de carga.

Espectro 41. IV(KBr, ν cm⁻¹) do fosfodiestearilglicerol. R = estearila.

A banda de absorção de ésteres fosfato está localizada na posição de 1299~1250 cm⁻¹. A banda em 1265 cm⁻¹ que aparece no espectro 42 sugere ter sido formado o derivado fosforilado, como o esperado.

Atribuições: IV (KBr, ν , cm⁻¹): 3064 (forte, ν OH); 2966, 2921 (forte, ν C-H alifático); 1739 (forte, ν C=O éster); 1265 ν (forte P-O, éster fosfato)

6. CONCLUSÕES

- Os bioisósteros derivados de serina foram obtidos com êxito, tanto pelo método convencional (refluxo) quanto por ultrassom;
- O método de desproteção do grupamento *O*-*t*-butil ocorreu com êxito, principalmente quando se utilizou o ácido trifluoracético;
- A desproteção utilizando dietilamina foi adequada para a retirada do grupo *t*-butílico dos derivados heterocíclicos;
- A formação do cloridrato facilitou a purificação do derivado formado por meio de cristalização;
- A definição dos espectros de RMN foi muito baixa, principalmente na primeira e segunda etapas. Isto se deve à baixa solubilidade dos compostos obtidos nos solventes deuterados disponíveis. Com a formação do cloridrato, os derivados heterocíclicos obtidos apresentaram boa solubilidade em água deuterada, o que permitiu a boa resolução dos espectros dos produtos da terceira etapa;
- A síntese do derivado diglicerídico apresentou dificuldades, tanto com o uso da trietilamina como catalisador como com o emprego do DBU;
- A análise conformacional do 1,2-dibromo-propanol mostrou a existência de impedimento estérico, o que dificulta a reação. Este impedimento estérico pode ser superado de duas formas: aumentando o tempo reacional e aumentando a temperatura. Com isto foi possível obter o diglicerídico;
- O derivado diglicerídico fosfatado foi obtido com sucesso apenas com o emprego do ácido fosfórico em refluxo.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliação biológica dos derivados heterocíclicos sintetizados a fim de verificar sua atividade antimalária;
- Síntese dos fosfolipídios dos ácidos palmítico e decanóico;
- Acoplamento dos derivados heterocíclicos obtidos aos fosfolipídios sintetizados;
- Estudos de *docking*, a fim de verificar a possível atividade dos heterocíclicos sobre a enzima serina hidroximetiltransferase, propondo, desta forma, mais um possível mecanismo de ação para estes compostos.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- SACHS, J., MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature*,v. 415, p. 680-685, 2002.
- 2- FERREIRA, E.I. *Malária: aspectos gerais e quimioterapia*, Atheneu-EDUSP, 1982.
- 3- OLLIARO, P., CATTANI, J., WIRTH, D. Malaria, the submerged disease. *JAMA J. Am. Med. Ass.* v. 275, p. 230-233, 1996.
- 4- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Roll Back Malária - Malária a global crisis. [Last review: 03-06-2000] Disponível na internet <http://www.who.int>. Acessado em 15/07/2001.
- 5- ROLL BACK MALARIA – A Global Partnership. Disponível na internet em: www.rbm.who.int. Acessado em 01/09/2008.
- 6- MALÁRIA FOUNDATION INTERNATIONAL Learn about malaria. [last reviewed: 25/05/2000] Disponível na internet: www.malaria.org . Acessado em 12/07/2001.
- 7- **Ministério da Saude.** Situação epidemiologica da malaria no Brasil. Disponível em www.bvsms.saudegov.br/bvs/publicacoes. Acessado em 22/12/2007
- 8- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE- FUNASA. *Situação e controle da malária no Brasil*. Disponível na internet em www.funasa.gov.br Acessado em outubro de 2002.
- 9- DI SANTI, S. M., BOULOS, M. Protozoários-Malária. In: CIMERMAN,B., CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus fundamentos*. São Paulo: Atheneu, p. 139-155, 2000

- 10- MILLER, L.H., BARUCH, D., MARSH, K., DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v. 415, p. 673-679, 2002
- 11- CASTEEL, D. A. Antimalarial agents. In. WOLF, M.E., ed. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 5. Ed. Wiley-Interscience, v.5, cap. 59, p.3-91, 1997
- 12- HALDAR, K., AMORIM, A. F., CROSS, G. A. M. Transport of fluorescent phospholipid analogues from erythrocyte Membrane to the parasite in *Plasmodium falciparum*-infected cells. *J. Cell Biol.*, v. 108, p.2183-2192, 1988.
- 13- BREUER, V. W., KUTNER, S., SYLPHEN, J., GINSBURG, H., CABANTCHIK, Z.I., Covalent modification of the permeability pathways induced in the human erythrocyte membrane by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Physiol.*, v. 133, p. 55-63, 1967.
- 14- KUTNER, S., GINSBURG, H., CABANTCHIK, Z.I. Permeability changes in malaria (*Plasmodium falciparum*) infected human red blood cell membranes. *J. Cell. Physiol.*, v. 114, p.245-251, 1983.
- 15- KUTNER, S., BREUER, V. W., GINSBURG, H., ALEY, S.B., CABANTCHIK, Z.I. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: Association with parasite development. *J. Cell. Physiol.*, v.125, p. 512-527, 1985.
- 16- NOGUEIRA, P.A., WUNDERLICH, G., SILVA, L.H.P. Variant antigens of *Plasmodium falciparum* encoded by the *var* multigenic family are multifunctional macromolecules. *Res. Microbiol.*, v.152, p.141-147, 2001.

- 17- CRAIG, A., SCHERF, A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v 115, p. 129-143, 2001.
- 18- BOWMAN, S., HORROCKS, P. Assessing the impact of *Plasmodium falciparum* genome sequencing. *Microb. Inf.*, v. 2, p 1479-1487. 2000.
- 19- KRISHNA, S., WEBB, R., WOODROW, C. Transport proteins of *Plasmodium falciparum*: defining the limits of metabolism. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.1331-342, 2002.
- 20- GRELLIER, P., RIGOMIER, D., CLAVEY, V., FRUCHART, J.C., SCHREVEL, J., Lipid Traffic between high density lipoproteins and *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J. Cell Biol.*, v.112, p-267-277, 1991.
- 21- VIAL, H. J., ELDIN, P., TIELENS, A. G. M., van HELLEMOND, J.J. Phospholipids in parasitic protozoa-Review. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.126, p. 143-154, 2002
- 22- ELABBADI, N., ANCELIN, M. L., VIAL, H. J., Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem. J.*, v. 324, p. 435-445, 1997.
- 23- HOLZ, G.G., Lipids and the malarial parasite. *Bull. WHO*, v. 55, p. 237-248, 1977.
- 24- VIAL, H. J., ANCELIN, M. L., Malarial Lipids. An overview. *Subcell. Biochem.*, v. 18, p.259-306, 1992.

- 25- TAMEZ, P.A., BHATTACHARJEE, S., OIJ, C.V., HILLER, N.L., LLINAS, M., BALU, B., ADAMS, J.H., HALDAR, K., An erythrocyte vesicle protein exported by the malaria parasite promotes tubovesicular lipid import from the host cell surface. *P.L.O.S. Pathogens*. v.4, l. 8, p.1-12, 2008.

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

- 27- LEMKE, T.L. Antiparasitic agents *In: WILLIAMS, D.A., LEMKE, T.L., ROCHE, V.F., ZITO, S.W., Foye's principles of medicinal chemistry*. 6. ed. Ed: Lippincott Williams & Wilkins, New York, cap.39, 2008. p.1084-1111.

- 28- WOSTER, P. M. New therapies for malária. *Annu. Rep. Med. Chem., San Diego*, v.38, p. 203-211, 2003.

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

- 30- BULLER, R., PETERSON, L.M., ALMARSSON, O., LEISEROWITZ, L., Quinoline binding site on malaria pigment crystal: A rational pathway for antimalaria drug design. *Crys. Growth Des.*, v. 2, n.6, 553-562. 2002.

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

- 32- AUGUSTO, O., SCHEREIBER, J., MASON, R.P. Direct ESR detection of a free radical intermediated during the peroxidase-catalized oxidation of the antimalarial drug primaquine. *Biochem. Pharmacol., Oxford*, v.37, n.14, p.2791-2797, 1988.

- 33- MIHALY, G.W., WARD, S.A., EDWARDS, G., L'EORME, M., BRECKENRIDGE, A.M. Pharmacokinetics of primaquine in man:

identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, , v. 17,p. 441-446, 1984.

- 34-** DUA, V.K., SINHA, S.N., BISWAS, S., VALECHA, N., PURI, S.K., SHARMA, V.P. Isolation and antimalarial activity of peroxydisulfate oxidation products of primaquine. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, v.12 , p. 3587-3589, 2002
- 35-** ARAÚJO, M.J., BOM, J., CAPELA, R., CASIMIRO, C., CHAMBEL, P., GOMES, P., IELY, J., LOPES, F., MORAIS, J., MOREIRA, R., OLIVEIRA, E., ROSÁRIO, V., VALE, N., Imidazolin-4-one derivative of primaquine as novel transmittion-blocking antimalarials. *J. Med. Chem.*v.10.n.48. p.888-892 2005.
- 36-** VÁSQUEZ-VIVAR, J., AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. *J. Biol. Chem.*, v.267, n. 10, p. 6848-6854, 1992.
- 37-** ALZEER, J., CHOLLET, J., HEINZE-KRAUSS, I., HUBSCHWERLEN, C., MATILE, H., RIDLEY, R.G. Phenyl β -metoxiacrylates: A new antimalarial pharmacophore. *J. Med. Chem.*, v. 43. p. 560-568, 2000
- 38-** LEFÈVRE, G., CARPENTER, P., SOUPPART, C., SCHMIDLI, H., MARTIN, J.M., LANE, A., WARD, C., AMAKYE D. Interaction trial between artemeter and lumefantrine and quinine in healthy pacients. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 42 p. 1147. 2002.
- 39-** AVERY, M.A., MEHROTRA, S., JOHNSON, T. L., BONK, J.D., VROMAN, J.A., GOINS, K., MILLER, R. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 4. effect of substitution at C-3. *J. Med. Chem.*, v. 39, p. 2900-2906, 1996.

- 40- AVERY, A.M., MURALEEDHARAM, K.M., DESAI, P.V., BANDYOPADHYAYA, A.K., FURTADO M.M., TEKWANI, B.L., Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin.8. Design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin based drugs against leishmania and malaria. *J. Med. Chem.* v. 46, p. 4244-4258, 2003.
- 41- AVERY, A.M., GAO, F., CHONG, W.K.M., MEHROTRA, S., MILHOUS, W.K. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and C-10-deoxoartemisinin. *J. Med. Chem.*, v. 36. p. 4264-4275, 1993.
- 42- TRIPATHI, R., DUTTA, G.P., VISHWAKARMA, R.A. Gametocytocidal activity of alpha/beta arteether by the oral route of administration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 54, n. 6, p. 652-654, 1996.
- 43- PAITAYATAT, S., TARNCHOMPOO, B., THEBTARANONTH, Y., YUTHAVONG, Y. Correlation of antimalarial activity of artemisinin derivatives with binding affinity with Ferroprotoporphyrin IX. *J. Med. Chem.* v. 40, 633-638 1997.
- 44- PANDEY, A.V., TEKWANI, B.L., SING, R.L., CHAUHAN, V.S. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification system in malaria parasite. *J. Biol. Chem.*, v.274, n. 27, p. 19383-19388, 1999.
- 45- AVERY, M.A., ALVIM-GASTOM, VROMAN, J.A., WU, B., AGER, A., PETERS, W., ROBINSON, B.L., CHARMAN, W. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin.7. Direct modification of (+)-artemisinin and *In vivo* antimalarial screening of new, potential pre-clinical antimalarial candidates. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 4321-4335, 2002.

- 46- AVERY, M.A., MEHROTRA, S., JOHNSON, T. L., BONK, J.D., VROMAN, J.A., MILLER, R. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 5. Analogs of 10-Deoxoartemisinin substituted at C-3 and C-9. *J. Med. Chem.*, v. 39, p. 4149-4155. 1996.
- 47- AVERY, M.A., ALVIM-GASTOM, M., RODRIGUES C.R., BARREIRO, E.J., COHEN, F.E., SABNIS, Y.A., WOOLFREY, J.R. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 6. The development of predictive *In vitro* potency models using CoMFA and HSAR methodologies. *J. Med. Chem.*, v.45, p.292-303, 2002.
- 48- VANNERSTROM, J.L., AGER, A.L., ANDERSEN, S.L. GRACE, J.M., WONGPANICH, V., ANGERHOFER, C.K., HU, J.K., WESCHE D.L., Assesment of the antimalarial potential of tetraoxane WR 1489990. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 62, n. 5, p.573-578. 2002
- 49- MESHNICK, S.R. Artemisinin: mechanism of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p.1655-1660, 2002.
- 50- ROBERT, A., BENOIT-VICAL, F., DECHY-CABARET, O., MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action artemisinin. *Pure Appl. Chem.*, v. 73, n. 7, p. 1173-1188, 2001
- 51- CHENG, F., SHEN, J., ZHU, W., GU, J., JI, R., JIANG, H., CHEN, K., Molecular docking and 3D QSAR studies on the possible antimalarial mechanism of artemisinin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 10. p. 2883-2891. 2002

- 52- O' NEILL, P.M., BISHOP, L.P., STORR, R.C., RAWLEY, S.R., MAGGS, J.L., WARD, S.A., PARK, K.B., Mechanism-based design of parasite targeted artemisinin derivatives. Synthesis and antimalarial activity of benzylamino and alkylamino ether analogues of artemisinin. *J. Med. Chem.*, v. 39, p. 4511-4514, 1996.
- 53- WHITE, N.J. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J. Antim. Chemother.*, London, v. 30, n. 5, p. 571-585, 1992.
- 54- KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara 2002/2003*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- 55- GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 36, n. 5, p. 857-872, 1995.
- 56- FERREIRA, E.I. Trends in the research for the new antimalarial agents. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, v. 29, n. 1, p.1-15, 1993.
- 57- FOSTER, S.D. Pricing, distribution, and use of antimalarial drugs. *Bull. WHO*, Geneva, v. 69, p. 349-363, 1991.
- 58- COWMAN, A.F., FOOTE, S. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int. J. Parasitol.*, v. 20, , p.503-513, 1990.
- 59- KEYSTONE, J.S. Prevention of malaria. *Drugs*, v. 39, p. 337-354, 1990.
- 60- GILLES, H.M. The treatment and prophylaxis of malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 81, p. 607-617, 1987.

- 61- BRUCE-CHWATT, L.J. *Chemotherapy of malaria*, 2nd ed. revised, Geneva: World Health Organization, 1986.

- 62- MENEZES, C.M.S., KIRCHGARTTER, K., DISANTI, S.M.F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F.G., PAULA, G.A., FERREIRA, E.I. Antimalarial effect *in vitro* and lack of modulating effect of desipramine and imipramine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.91, n.6, p. 697-700, 1997.

- 63- MENEZES, C. M. S., KIRCHGATTER, K., DI SANTI, S. M. F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F. G., PAULA, G. A., FERREIRA, E.I. *In vitro* evaluation of erythromycin as a modulating agent in Brazilian freshly chloroquine resistant *falciparum* isolates. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*, v. 41, p. 211-253, 1999.

- 64- MENEZES, C. M. S., KIRCHGARTTER, K., DI SANTI, S. M. F., PAULA, G. FERREIRA, E.I. *In vitro* evaluation of verapamil and other modulating agents in Brazilian chloroquine-resistant *P. falciparum* isolates. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberlândia, n.43, v. 4, p.221-226, 2002a.

- 65- MENEZES, C. M. S., KIRCHGATTER, K., DI SANTI, S. M. F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F. G., PAULA, G. A., FERREIRA, E.I. *In vitro* chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian Plasmodium falciparum: intrinsic antimalarial activity of phenothiazine drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1033-1039, 2002b.

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

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

- 68- PANISKO, D.M., KEYSTONE, J. S. Treatment of malaria - 1990. *Drugs*, v. 39, p. 160-189, 1990.
- 69- RIDLEY, R. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, v.415, p.686-693, 2002.
- 70- TRIPATHI, R., DUTTA, G.P., VISHWAKARMA, R.A. Gametocytocidal activity of alpha/beta arteether by the oral route of administration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 54, n. 6, p. 652-654, 1996.
- 71- DIECKMANN-SCHUPPERT, A., BAUSE, E., SCHWARZ, R. T. Studies on O-glycans of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes- Evidence for O-GlcNac-transferase in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.*, v.216, p.779-778, 1993.
- 72- EDA, S., SHERMAN, I.W., Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidilserina. *Cell. Physiol. Biochem.*, v.12, p.373-384, 2002.
- 73- WENGELNIK, K., VIDAL, V., ANCELIN, A. M., CATHIARD, A. M., MORGAT, J. L., KOCKEN C. H., CALAS, M., HERRERA, S., THOMAS, A. W., VIAL, H. J. A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected Erythrocytes. *Science*, v. 95. p. 1311-1314, 2002.
- 74- CALAS, M., CORDINA, G., BOMPART, J., BEM BARI, M., JEI, T., ANCELIN, L. M., VIAL, H. Antimalarial activity of molecules interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism. Structure-activity relationship analysis. *J. Med. Chem.*, v. 40, p.3557-3566, 1997.
- 75- ROGGERO, R., ZUFFEREY, R., MINCA, M., RICHIER, E., CALAS, M., VIAL, H., BEN MAMOUN, C. Unraveling the Mode of Action of the Antimalarial Choline Analog G25 in *Plasmodium falciparum* and

Saccharomyces cerevisiae. *Antimicrob.. Agents Chemother.*, v. 48, n. 8, p. 2816-2824. 2004.

- 76- ANCELIN, M.L., CALAS, M., BONHOURE, A., HERBUTE, S., VIAL, H. J. *In vivo* antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts Interfering with *Plasmodium* phospholipids metabolism. *Antimicrob.. Agents Chemother.*, v.47, n. 8, p. 2598-2605. 2003.
- 77- BIAGINI, G.A., PASINI, E.M., HUGHES, R.M., KONING, H.P.D., VIAL, H.J., O'NEILL, P.M., WARD, S.A., BRAY, P.G. Characterization of the choline carrier of the *Plasmodium falciparum*: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs. *Blood*. v.104, n.10, p. 3372-3377. 2004.
- 78- PESSI, G., CHOI, J.Y., REYNOLDS, J.M., VOELKER, D.R., C. BEN MAMOUN. *In Vivo* Evidence for the Specificity of *Plasmodium falciparum* Phosphoethanolamine Methyltransferase and Its Coupling to the Kennedy Pathway. *J. Biol. Chem.*, v.280 12461-62005.
- 79- NISHIJIMA, N., HANADA, N., ITAMURA, T., FUKASAWA, T., MAGISTRADO, P. A., HORII, T. Neutral sphingomyelinase activity dependent on Mg^{2+} and anionic phospholipids in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, v. 346. p. 671-677. 2000.
- 80- SALCEDO, E., SIMS, P. F.G., HYDE, J.E., A glycine-cleavage complex as part of the folate one-carbon metabolism of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.*, v.21, n.9. p.406-411. 2005.
- 81- FRANÇA, T.C.C., PASCUTTI, P.G., RAMALHO, T.C., FIGUEROA-VILLAR, J.D. A three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine and 5-formyl-

- tetrahydrofolate. Homology modeling and molecular dynamics. *Biophys. Chem.*, v.115. p.1-10. 2005.
- 82- PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, v. 3, p. 241-246, 1987.
- 83- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria situation in 1990. *Bull. WHO*, v. 70, p. 801-807, 1992.
- 84- CRUZ, M. L., FERREIRA, E. I., KOROLKOVAS, A. Latentiation of chemotherapeutic agents. Part 2: Synthesis of oxidized cellulose imine derivatives and antimalarials. *Starch/Stärke*, v. 49, p. 66-70, 1997.
- 85- OHARA, M. T., SAKUDA, T. M., CRUZ, M. L., FERREIRA, E. I., KOROLKOVAS, A. Antimalarial activity of imine oxidized starch and cellulose derivatives. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, n. 9, 522-527, 1995.
- 86- WERMUTH, C.G., The practice of medicinal chemistry. London: Academic Press, 2003.
- 87- PATANI, G. A. LaVOIE, E.J., Bioisosterism. *Chem. Rev.* v.96, p. 3147-3176, 1996.
- 88- CHUNG, M. C., FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, v.22, p.75-84, 1999.
- 89- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors II. Bioprecursors prodrugs. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, 1996. p. 697-716.

- 90- WERMUTH, C. G., GAIGNAULT, J.-C., MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I: Carrier prodrugs. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 671-196.

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

- 92- BUNDGAARD, H., Ed. *Prodrug design*. Amsterdam: Elsevier, 1985.

- 93- BALANT, L.P., DOELKER, E. Metabolic considerations in prodrug design. In: WOLFF, M. E. *Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery*.v. 1: Principles and practice. New York: Wiley-Interscience., p. 949-982. 1995.

- 94- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, v .16, p. 443-458. 1991.

- 95- ROSEEUW E., COESSENS V., BALAZUC, A M., LAGRANDERIE M., CHAVAROT, P., PESSINA, A., NÉRI, M.G., SCHACHT, E., MARCHAL, G., DOMURADO, D. Synthesis, degradation, and antimicrobial properties of targeted macromolecular prodrugs of norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v47,11, p.3435-41.

- 96- SEYMOR, L. W., SOYEZ, H., De MARRE, A., SHOIABI, M.A., SCHACHT, E. H. Polymeric prodrugs of mitomycin C designed for tumour tropism and sustained activation. *Anticancer Drug Des.*, v.11, p.351-65, 1996.

- 97- GINSBURG, H., KUTNER, S., KRUGLIAK, M., CABANTCHICHIK, Z.I. Charactazrzation of permeation pathways appearing in the host

membrane of *Plasmodium falciparum* infected red cell. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.14, p. 313-322.1984.

- 98-** LAMBERT, D. M., Rational and applications of lipids as prodrug carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 11, p. S15-S27. 2000.
- 99-** JONES, G. Lipoidal pro-drug analogues of various anti-inflammatory agents. *Chem. Ind.*, p. 452-4566, 1980.
- 100-** PARIS, G.Y., GARMAISE, D. L., CIMON, D.G., SWEET, L., CARTER, G. W., YOUNG, P. Glycerides as prodrugs. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of 1,3 bis - (alkanoyl)-2-(O-acetylsalicyloil)glycerides (aspirin triglycerides). *J. Med. Chem.*, v. 22, p. 683-687, 1979.
- 101-** PARIS, G.Y., GARMAISE, D. L., CIMON, D.G., SWEET, L., CARTER, G. W., YOUNG, P. Glycerides as prodrugs. 2. 1,3-dialkanoyl-2-(2-methyl-4-oxo-1,3-benzodioxan-2-yl)glycerides (cyclic aspirin triglycerides) as antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.*, v. 23, p. 79-82, 1980.
- 102-** GARZON ABURPEH, A., POUPAERT, J. H., CLAESEN, M., DUMONT, P., ATASSI, G. 1,3-Dipalmitoylglycerol esters of chlorambucil as a lymphotropic orally administrable antineoplastic agent. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 26, p. 1200-1203, 1983.
- 103-** DEVERRE, J. R., LOISEAU, P., COUVREUR, P. LETOURNEUX, Y., GAYRAL, P., BENOIT, J. P. *In vitro* evaluation of filaricidal activity of GABA and 1,3-dipalmitoyl-2-(4-aminobutyryl)glycerol HC1; a digliceryde prodrug. *J. Pharm. Pharmacol.* , v. 41, p. 191-193, 1989.

- 104-** GREENE, T. W., WUTS, P. G. M. *Protective groups in organic synthesis*. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 1999. p. 102-103 e 434-435.
- 105-** KOCIENSKI, P.J. *Protecting groups*. New York. Georg Thieme Verlag, 1994. p. 48, 148-149.
- 106-** SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. *Organic chemistry*. 7 ed. New York: Wiley., 2000. p. 498.
- 107-** CORBRIDGE, D. E. C. *Phosphorus: An outline of its chemistry, biochemistry and technology*- New York: Elsevier. p. 495-507.
- 108-** KOSOLAPEFF, G. M., MAIER, L. *Organic phosphorus compounds*. New York: Wiley-Interscience. 1973 p. 230-231
- 109-** ONO, N., YAMADA, T., SAITO, T., TANAKA, K., KAJI, A. A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bull. Chem. Soc. Japan*, v. 51, p. 2401-2404, 1978.
- 110-** JOHNSON, D.AJ., OWEN, A., PLANT, N., BRAY, P.G., WARD, S.A., Drug-regulated expression of *Plasmodium falciparum* P-glycoprotein homologue 1: a putative role for nuclear receptors. *Antimicrob. Agents and Chemother.* v. 52, n.4, p. 1438-1445. 2008