

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

*Em Linhas*

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

**Síntese de Furanoquinolinas:  
Precusores Potenciais de Novos Antimaláricos**

**Maria Mercedes Pacheco Solís**

**Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE**

**Orientador:  
Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira**

**São Paulo  
2002**

*2002*

---

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

**Síntese de Furanoquinolinas:**  
**Precursores Potenciais de Novos Antimaláricos**

**Maria Mercedes Pacheco Solís**

**Dissertação para obtenção do grau de**  
**MESTRE**

**Orientador:**  
**Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira**

**São Paulo**  
**2002**

*J7024*

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004432

**Ficha Catalográfica**

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

Pacheco Solís, María Mercedes

P116s Síntese de furanoquinolinas: precursores potenciais  
de novos antimaláricos / Maria Mercedes Pacheco Solís. --  
São Paulo, 2002.  
218p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento  
de Farmácia.

Orientador: Silveira, Maria Amélia Barata da

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2.  
Malária : Medicina 3. Latenciação : Química farmacêutica  
4. Relações estrutura - atividade : Química farmacêutica I.  
T. II Silveira, Maria Amélia Barata da, orientador.

615.19 CDD

**Maria Mercedes Pacheco Solis**

**SÍNTESE DE FURANOQUINOLINAS:  
PRECURSORES POTENCIAIS DE NOVOS ANTIMALÁRICOS**

**Comissão Julgadora  
Dissertação para obtenção do Grau de  
Mestre**

**Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira  
Presidente e Orientador**

**Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior  
1º Examinador**

**Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli  
2º Examinador**

**São Paulo, 07 de março de 2002.**



**" QUANTO MAIS ESTUDAMOS,  
MAIS DESCOBRIMOS  
NOSSA IGNORÂNCIA"  
SHELLEY**

## AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA), a concessão de bolsa de estudos que permitiu atingir o objetivo almejado.

Ao CNPq e à FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro a projetos de pesquisa, nos quais este trabalho estava inserido.



## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais José Benito e Ana Julia, pela profunda dedicação, exemplos e ensinamentos que norteiam a minha vida e de meus irmãos.

Aos meus filhos Julio Octavio e Alvaro René que com sua compreensão entenderam minha ausência e foram um estímulo para que pudesse alcançar este objetivo.

À Nubia, minha irmã, que com seus exemplos de justiça e humanidade e, também, o seu apoio material e afetivo serviram para meu conforto e inspiração.

E aos meus caros irmãos José Benito, René, Adolfo, Maurício que com seus familiares forneceram o apoio tão importante para mim.

## AGRADECIMENTOS

À

Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira, pela valiosa orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. A sua forma de conduzir os trabalhos de maneira justa e tecnicamente adequada, propiciou meu desenvolvimento na área de química farmacêutica fazendo com que, pudesse superar com mais facilidade alguns obstáculos encontrados.

Ao

Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt, que me ensinou através da sua paciência e perseverança, que a dedicação e a prática formam o caminho do aprendizado. O dia à dia no laboratório deu-me a destreza e o conhecimento necessários para poder culminar com este trabalho.

---



## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Químicas da Nicarágua, aos docentes, aos alunos, aos administrativos a quem agradeço e ofereço os resultados do meu esforço.

À direção da Universidade Nacional Autônoma da Nicarágua – Leon, ao apoio manifesto através do qual pude superar dificuldades e que agora, posso agradecer e expressar minha admiração.

Ao Dr. Sérgio Caramagna, Diretor da Secretária Geral da OEA na Nicarágua, pela oportunidade oferecida para complemento da minha capacitação, a qual colocarei a serviço da sociedade como um todo.

Às Sras. Miriam Tünnerman e Dalila Barrios, ambas da OEA na Nicarágua, pela participação, pelas gestões e pelo apoio dados.

À Diretoria do Programa Promoção Profissional e Tecnológico, Casa Presidencial da Nicarágua a quem, além de agradecer, declaro minha determinação em colocar meus conhecimentos em benefício de meu país.

À Embaixada do Brasil na Nicarágua e ao Consulado da Nicarágua no Brasil pela atenção e presteza.

À Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli, pelo apoio técnico generoso e prestativo a qualquer momento que solicitado.

À Profa. Dra. Elisabeth Igne Ferreira, exemplo de dedicação, apoio, orientação nos caminhos da pesquisa científica, sugestões durante minha passagem pela USP, e por ter compartilhado de um momento tão difícil que tanto nos aproximou.

Ao Dr. Marcos Boulos pela disponibilidade, interesse e sugestões feitas com relação ao andamento e execução de meu trabalho.

Ao Dr. Evandro Rivite do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas, pela amizade e suporte pessoal e técnico.

A Eli Maria, secretária, Angela da Biblioteca do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas.

Ao Dr. Waltênio Vasconcelos do departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas pela amizade e apoio nos aspectos pessoais e acadêmicos.

Ao Dr. Heitor F. Andrade Jr. e sua equipe de pesquisadores Andrés, Danilo, Roberto, André, Roselaine, Miriam, Luciana, Bianca, Franco e funcionários pelo suporte material e técnico proporcionado em seu Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – FM – USP.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andrade Pinto pela amizade e apoio no dia a dia.

Aos Profs. Drs. de Biofarmacognosia pela amizade e força: Elfriede, Edna, Dominique, Vicente, Paulo Chanel e Herminie Fischer.

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, Diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelo interesse do andamento do meu trabalho.

Ao amigo e “mestre” Diogo Teixeira Carvalho, pelo apoio ilimitado desde o nosso encontro nas primeiras aulas, seu suporte na elaboração de meu seminário, projetos que compartilhamos, e as mesas de almoços que

dividimos. Por oportuno, gostaria de agradecer a Elisa pelos bons momentos.

Ao amigo Roberto Parise Filho, pela ajuda sempre pronta e irrestrita.

À Diretoria do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, através do Dr. Dirceu Raposo de Mello, Dr. Francisco de Paula G. C. Jr., Marcelo P. Bisson, Alvaro Favaro Jr. e Maria Eugênia Andrade pelas oportunidades de conviver com meus colegas farmacêuticos na busca de novos conhecimentos.

À Diretoria de Eventos do Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo nas pessoas de Carmen, Linda, Nina, Ana e Priscila pelo apoio, atenção e amizade que demonstraram em todos os nossos contatos.

A Margoth e Júnior pela amizade, apoio e confiança.

À colega Michelle Carneiro Polli, pela ajuda na busca de bibliografia e pela atenção em todas as horas.

À Kátia Botelho, amiga e companheira do laboratório, pela generosidade na solução de problemas técnicos e por estar sempre presente.

À Michelle Ortiz Valenzuela por compartilharmos de momentos alegres e tristes com a mesma dedicação e companheirismo. E a nossa amiga comum Claudete Valdívia pelos conselhos, apoio e amizade.

Ao Elizeu Ortega pela amizade, carinho e alegria contagiante.

À Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pelos conselhos, amizade, carinho e as palavras estimulantes.

Aos companheiros do dia à dia: Camila, Lica, Ana Cláudia, Maité, Talita, Bia, Simone, Sabrina, Renata, Heloísa, Maira, Diogo, Iguatemi, Paula, Andre, Gustavo, Robson, Beth, Maria Fernanda, Nara, Kátia Solange, Vanesca, Juliana, Marina, Alexandre, Marcia, Marco Aurélio, Rodrigo e Guilherme.

Ao Prof. Dr. Paulo Moreno do Departamento de Química – USP pelo apoio à interpretação dos espectros de massas.

Ao Dr. Araripe Pacheco pesquisador científico da SUCEN pelas sugestões e apoio.

À técnica Dra. Maria Inês Almeida pela disposição e competência com que sempre realizou as análises de RMN.

À Silvia Boschi Bazan pela amizade e ajuda nas atividades no laboratório.

A Dra. Rosângela Rodrigues da Faculdade de Medicina – LIM – 56 - USP pelo apoio, força constante e amizade.

Aos professores das diversas disciplinas: Mitsuko, Pitombo, Telma, Pedro, Jorge, Cristina, Massayoshi; e os professores visitantes Veiga e Souza, da Universidade de Coimbra.

Aos colegas Marco Aurélio, Andréia, Elza, Renato, Lucília, Andre, Patricia, Rafael, Henrique, Letícia, Túlio e Luciana com quem compartilhei aulas e amizade.

Ao Almir Robson Ferreira pela amizade e ajuda e, particularmente, na formatação da dissertação. E, especialmente, à Silvia e Iaguinho pela

compreensão. À Maria Iranides Santana, Rose, Erven pela ajuda na apresentação da dissertação, pelas sugestões e amizade.

À Silvia M. Di Santi e Karin Kirchgatter pela oportunidade de participarmos conjuntamente na realização técnica, científica para futuros ensaios biológicos.

À Leila e Adriana da Biblioteca do Conjunto das Químicas pela revisão das referências bibliográficas e à Marina pela elaboração da ficha catalográfica. Ao Srs. Angelo, Aguinaldo e funcionários os quais realizaram uma grande tarefa.

À Secretaria de Pós-Graduação nas pessoas de Elaine, Jorge e Benedita pelo apoio e atenção.

Aos estudantes do Centro Acadêmico de Farmácia e Bioquímica pela oportunidade de compartilhar com a vida acadêmica e duas Semanas Farmacêuticas.

Às secretárias do Departamento de Farmácia: Elisabete, Celi, Suzy e Rosana e Luiz por sua disponibilidade.

À Silvia Gomes, secretária da Diretoria do Departamento de Farmácia e demais colaboradores pelo inestimável apoio. À Iara, Rosely, Majó e Daniella, pela ajuda na Assistência Acadêmica e Protocolo, respectivamente.

À Dra. Valéria M. de Souza e ao Dr. Daniel Antunes pelo ensino dos cursos de manipulação.

À Maria Aparecida Rodrigues De Lá Hóz, do Departamento Financeiro pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Laboratório Ambulatório dos Viajantes pelo apoio técnico para o diagnóstico da malária e funcionários do centro de Imunização pelo apoio e amizade.

À Sra. Helena das Neves Lopes, e ao Sr. Mario, Paulo, Luciana e Luis Fernando pela amizade prestativa e apoio em todas as horas.

A D. Julieta , Sr. Hélio e Danilo pela amizade e momentos difíceis que nos uniu.

Aos funcionários Luzanira, Roberto, Luzia, Adriana, Cida e Vitor por estarem sempre por perto e prontos para ajudar.

À Luciano e Guilherme amiguinhos com os quais compartilhei momentos agradáveis no congresso em Caxambú.

Aos colegas e amigos do BIOFAR, na USP, pelo intercâmbio de experiências e pela amizade dedicada.

À Profa. Dra. Fro e equipe de pesquisadores científicos do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – FM - USP .

Aos professores da Farmacotécnica Valéria, Humberto, Cristiana, colegas e funcionários.

Às professoras Maria Inês, Erika, colegas e funcionários do Departamento de Controle de Qualidade de Medicamentos - FCF – USP.

As pessoas que apoiaram de uma ou outra forma na realização deste trabalho.

---

## ÍNDICE

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	1
RESUMO.....	3
SUMMARY.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	10
2.1. Forma de desenvolvimento.....	11
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3.1. Malária.....	12
3.2. Epidemiologia.....	13
3.3. Patogenia.....	15
3.4. Malária no Brasil.....	19
3.4.1. Características da transmissão da malária.....	20
3.4.1.1. Fora da Amazônia Legal.....	20
3.4.1.2. Dentro da Amazônia Legal.....	21
3.4.2. Riscos de Infecção.....	25
3.5. Diagnóstico da malária.....	26
3.6. Quimioterapia antimalárica.....	27
3.6.1. Classificação dos fármacos antimaláricos quanto ao ciclo do parasita.....	29
3.6.2. Classificação química dos antimaláricos.....	33
3.7. Esquema do tratamento da malária no Brasil.....	50
3.8. Medidas de controle.....	51
3.9. Resistência.....	52
3.10. Profilaxia.....	53
3.11. Vacina.....	55
3.12. Planejamento de fármacos.....	56
3.12.1. Introdução de novos fármacos.....	56
3.12.1.1. Gênese de fármacos.....	57
3.12.1.1.1. Acaso.....	57

3.12.1.1.2. Triagem empírica.....	59
3.12.1.1.3. Extração de fontes naturais.....	60
3.12.1.1.4. Modificação molecular.....	63
3.12.1.1.4.1 Processos gerais.....	64
3.12.1.1.4.2. Processos especiais.....	65
3.12.1.1.5. Exploração de efeitos colaterais.....	72
3.12.1.1.6. Ensaio de produtos intermediários.....	72
3.12.1.1.7. Análogos, pró-fármacos e latenciação de fármacos.....	72
3.12.1.1.8. Planejamento racional.....	74
3.13. Compostos $\beta$ -dicarbonílicos.....	76
3.13.1. Aspectos gerais dos compostos $\beta$ -enaminonas.....	77
3.13.2. Aspectos gerais sobre ciclização.....	81
3.13.2.1. Derivados furânicos.....	84
3.13.2.2. Derivados quinolínicos.....	89
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
4.1. Materiais.....	92
4.2. Métodos.....	95
4.2.1. Métodos de síntese.....	95
4.2.1.1. Alquenação do acetoacetato de etila.....	95
4.2.1.2. Formação de $\beta$ -enaminoéster.....	97
4.2.1.3. Formação do núcleo quinolínicos.....	98
4.2.1.4. Preparação do derivado deidrofurano.....	99
4.2.1.5. Preparação do composto furanoquinolínicos.....	100
4.2.2. Métodos analíticos.....	101
4.2.3 Avaliação da atividade biológica contra malária.....	103
4.2.3.1. Ensaio biológico <i>in vivo</i> .....	103
4.2.3.2 Ensaio biológico <i>in vitro</i> .....	107
5. RESULTADOS.....	112
5.1. Síntese e identificação dos compostos.....	112
5.1.1. Análise elementar.....	112
5.1.2. Análise espectrométrica do $\beta$ -dicarbonílicos.....	113
5.1.3. Análise espectrométrica da $\beta$ -enamina.....	119



5.1.4. Análise espectrométrica da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina.....	125
5.1.5. Análise espectrométrica do 2-metil-12 ( iodo-metila furanquinolina ).....	133
5.1.6. Análise espectrométrica da 2,12-dimetil-furanquinolina.....	141
6. DISCUSSÃO.....	149
6.1. Síntese e identificação.....	149
7. ENSAIO BIOLÓGICO.....	159
7.1 <i>In vivo</i> .....	159
7.2 <i>in vitro</i> .....	159
8. CONCLUSÕES.....	161
9. PERSPECTIVAS.....	162
10. Anexo 1.....	163
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	174

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1	Distribuição mundial da malária.....	14
Figura. 2	Ciclo Biológico do Plasmodium sp.....	18
Figura. 3	Distribuição epidemiológica da malária no Brasil nos últimos 10 anos.....	22
Figura. 4	Diagrama da ação de fármacos antimaláricos em relação ao estágio de desenvolvimento do parasita da malária.....	32
Figura. 5	Pirimetamina e Trimetroprima.....	33
Figura. 6	Estrutura dos alcalóides da quina.....	37
Figura. 7	Cloroquina.....	40
Figura. 8	Amodiaquina.....	41
Figura. 9	Mefloquina.....	43
Figura. 10	Primaquina.....	45
Figura. 11	Proguanil e de seu metabólito cicloguanil.....	46
Figura. 12	Artemisinina e derivados.....	49
Figura. 13	Produto Monoalquilado (2) e Dialquilado (2').....	76
Figura. 14	Centros Nucleofílicos e Eletrofílicos da $\beta$ -enaminonas	77
Figura. 15	Endo e exo.....	82
Figura. 16	Anel furano heteroaromático.....	84
Figura. 17	Estruturas de ressonância para o furano.....	85
Figura. 18	Anel nitrofurano.....	87
Figura. 19	Composto nitrofuranos.....	88
Figura. 20	Núcleo básico quinolínic.....	89

Figura. 21	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do $\beta$ -dicarbonílico (300 MHz, solvente: $\text{DCl}_3$ ).....	113
Figura. 22	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do $\beta$ -dicarbonílico (75 MHz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ).....	115
Figura. 23	Espectro IV do derivado $\beta$ -dicarbonílico, em Pastilha de NaCl.....	117
Figura. 24	Espectro de RMN $^1\text{H}$ da $\beta$ -enamina (300 MHz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ).....	119
Figura. 25	Espectro RMN $^{13}\text{C}$ da $\beta$ -enamina (75 MHz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ).....	121
Figura. 26	Espectro IV da $\beta$ -enamina, em pastilha de NaCl.....	123
Figura. 27	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina; (300 MHz, solvente: $\text{DMSO-d}_6$ ).....	125
Figura. 27a	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina;ampliado.....	126
Figura. 27b	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina;ampliado.....	126
Figura. 27c	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina;irradiação.....	126
Figura. 27d	Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina; irradiação.....	126
Figura. 28	Espectro RMN $^{13}\text{C}$ RMN da 2-metil-3-alil-4- hidroxiquinolina; (75 MHz, solvente: $\text{DMSO-d}_6$ ).....	127

Figura. 29	Espectro DEPT - 135° da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina; (75 MHz, solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ).....	129
Figura. 30	Espectro IV da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina, em KBr.....	130
Figura. 31	Espectro de massas da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina.....	132
Figura. 32	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano[3,2-c] quinolina;(300 MHz, solvente:DMSO-d <sub>6</sub> ).....	133
Figura. 32a	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano[3,2-c] quinolina; ampliado.....	134
Figura. 32b	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano[3,2-c] quinolina; ampliado.....	134
Figura. 33	Espectro RMN <sup>13</sup> C do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diifurano[3,2-c]quinolina; (75 MHz, solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ).....	135
Figura. 34	Espectro RMN <sup>13</sup> C do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diifurano[3,2-c] quinolina , em pastilhas de KBr.....	137
Figura. 35	DEPT 135° do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diifurano[3,2-c]quinolina; (75 MHz, solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ).....	139
Figura. 36	Espectro de massas do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diifurano[3,2-c] quinolina.....	140
Figura. 37	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do 2,4,dimetilfurano[3,2-c]quinolina; (300 MHz, solvente: DMSO- d <sub>6</sub> ).....	141

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela. I	Grupos Bioisósteros.....	68
Tabela. II	Dados da análise elementar do derivado furanoquinolínico.....	112
Tabela. III	Dados da espectrofotometria no IV para $\beta$ - dicarbonílico.....	118
Tabela. IV	Dados da espectrofotometria no IV para $\beta$ -enamina...	124
Tabela. V	Dados da espectrofotometria no IV para 2-metil-3alil- 4-hidroxiquinolina.....	131
Tabela. VI	Dados da espectrofotometria no IV para 2- (iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano.....	138
Tabela. VII	Dados da espectrofotometria no IV para 2,4- dimetilfurano[3,2-c]quinolina.....	146
Tabela. VIII	Determinação da toxicidade dos vários compostos contra LLCMK2 e <i>T. gondii</i> .....	167

## **ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

OPS	Organização Pan-Americana da Saúde
CG	cromatografia gasosa
ppm	partes por milhão
TMS	tetrametilsilano
s	singleto
sl	sinal largo
d	dubleto
dd	duplo dubleto
t	tripleto
q	quarteto
qui	quinteto
sex	sexteto
m	multipleto
J	constante de acoplamento
$\delta$	deslocamento químico
FID	ionização em chama
DMSO	Dimetilsulfóxido
DBU	1,8-diazobicyclo[5, 4, 0]undecil-7-eno
CEM	Campanha de Erradicação da Malária
IV	Infravermelho
d	dextro
l	levo
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN $^1\text{H}$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	ressonância magnética nuclear de carbono treze

---

## Abreviaturas e símbolos 2

p.f.	ponto de fusão
p.e.	ponto de ebulição
THF	tetraidrofurano
MS	espectroscopia de massa
MS	Ministério da Saúde
RPMI – 1640	meio de cultura biológica
MTT	brometo do (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dfenil-tetrazólio; azul de tiazol
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
GT	Gerência Técnica
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
DPET	Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização.
SDS	Dodesilsulfato de sódio

## Resumo

### SÍNTESE DE FURANOQUINOLINAS: PRECURSORES DE NOVOS ANTIMALÁRICOS

A malária continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias endêmicas no mundo. Causa cerca de 1,5 a 2,7 milhões de mortes ao ano. As estratégias usadas no controle desta parasitose vão desde medidas educacionais, até o uso dos quimioterápicos.

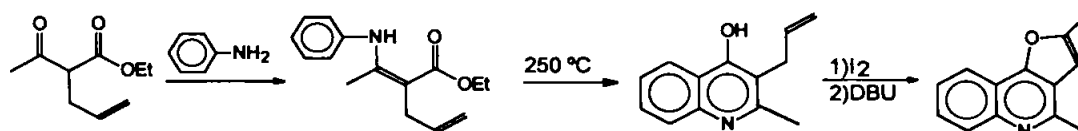
O aparecimento da resistência é um dos fatores que mais preocupa os especialistas. Destarte, justifica-se o esforço na busca de novas alternativas para o tratamento. A síntese de intermediários funcionalizados adequados permite sua aplicação na obtenção de moléculas mais complexas com potencial atividade, além de fornecer subsídios para o estudo de relações estrutura-atividade.

Com este objetivo foi sintetizado derivado quinolínico fundido a um anel furânico preparado a partir do 2-alilacetoacetato de etila, via  $\beta$ -enaminoéster correspondente, termociclização seguida de iodociclização/eliminação. O derivado obtido foi caracterizado mediante RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, ponto de fusão, IV, análise elementar, espectroscopia de massa e cromatografia gasosa.

Os produtos foram testados contra células em cultura e contra um protozoário do filo Apicomplexa, o mesmo da malária, mostrando que o composto intermediário 3 apresentava atividade específica para o agente intracelular, com D.E. 50 % de  $0,3\mu\text{g/ml}$ , contra atividade tóxica em células LLC-MK2 de  $75\mu\text{g/ml}$ .



O derivado furanoquinolínico servirá como protótipo para obtenção de novas substâncias ativas mediante uso da modificação molecular.



**Palavras-chave:** antimaláricos, agentes quimioterápicos, protozoário, bioisosterismo.

## Summary

### SYNTHESIS OF FURANOQUINOLINAS: PRECURSORS OF NEW ANTIMALARICS

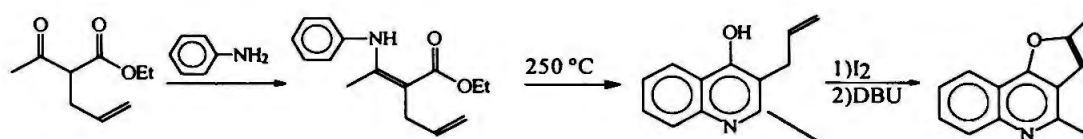
The malaria continues being one of the most important endemic parasitic diseases in the world. It causes about 1,5 to 2,7 million of deaths a year. The strategies used in the control of this parasitosis are going from educational measures, until the use of the chemotherapeutic.

The appearance of the resistance is one of the factors that it worries the specialists. Thus, is justified the effort in the search of new alternatives for the treatment. The appropriate synthesis of functionalized intermediary allows its application in the obtention of more complex molecules with potential activity, besides supplying subsidies for the study of structure-activity relationships.

With this objective derived quinolinic melted to a furanic ring starting from the ethyl-2-allylacetiactate, through corresponding b-enaminoéster, thermociclization followed by iodociclization/elimination. The derived obtained was characterized meantime of RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT, melting point, IV, elementary analysis, mass spectroscopy and gaseous chromothograph.

The products were tested against cells in culture and against a protozoan of the net Apicomplex, the same of the malaria, showing that the intermediary 3 derivative presented specific activity for the agent intracellular, with a D.E. 50% of 0,3 mg/ml, against toxicant activity in cells LLC-MK2 of 75 mg/ml.

The furanoquinolinic derivative will be good as a prototype for obtaining of new active substances by means use of the molecular modification.



**Keywords:** antimalaricals, chemotherapeutic agents, protozoan, bioisosterism.

## 1. INTRODUÇÃO

Paludismo ou malária é uma das mais importantes infecções causadas por protozoários no mundo. Atinge, principalmente, as regiões tropicais e subtropicais do planeta. Afeta os seres humanos e estima-se o surgimento de 300 a 500 milhões de novos casos por ano. O homem é infectado pelo *Plasmodium sp* (agente etiológico) pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. São quatro as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Cada um deles provoca reações e sintomas diferentes, sendo a infecção por *P. falciparum* a que ocasiona maior mortalidade nas áreas endêmicas (WIN *et al.*, 1992; BERGER, 1998; WOLFF, 1996 ; WHO, 2001).

A malária, é endêmica em aproximadamente 90 países, o que representa 40% da população mundial. Estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas estejam infectadas. O índice de mortalidade da doença varia entre 1,5 e 2,7 milhões por ano no mundo (WOLFF, 1996, RIETVELD, 2000).

No Brasil, a malária constitui uma das principais doenças endêmicas. Apesar de extensas áreas do país estarem praticamente desprovidas e livres de transmissão, ela ainda persiste, de forma intensa, em muitas regiões, especialmente na Amazônia (TRIGG , KONDRACHINE, 1998). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPS), em 1996, dos 444.049 casos de malária no Brasil, 99% aconteceram na Amazônia, sendo que 29% (128.418) destes casos são devidos ao *P. falciparum*. Entre 1988 e 1995, a mortalidade da malária diminuiu cerca de 67% sendo 51 casos devidos ao *P. falciparum*.

Vários fatores influenciam na incidência regional da malária: condições climáticas típicas das áreas florestais, dotadas de hidrografia abundante; chuvas torrenciais e enchentes que favorecem a formação de extensos criadouros de anofelinos; temperatura e umidade do ar elevadas; fluxo migratório expressivo; baixos níveis sócio-econômico e culturais da maioria da população e resistência dos plasmódios à terapêutica convencional (TRIGG, KONDRACHINE, 1998).

A malária é tratada clinicamente por quimioterápicos (DURRHEIM, 1999). A síntese dos compostos ativos começou na Alemanha, produto das pesquisas de indústrias de corantes. No início da Primeira Guerra Mundial, esta doença provocou efeitos devastadores. Mas foi a partir da Segunda Grande Guerra Mundial que os Estados Unidos e Inglaterra concentraram seus esforços em pesquisas para a descoberta de novos agentes antimaláricos (MUKHERJEE, 1991; GEENGOOD, 1995; WHO, 1999).

A pamaquina foi o primeiro antimalárico 8-aminoquinolínico a ser introduzido na medicina. Vários derivados da 8-aminoquinolina foram examinados, na tentativa de se descobrir compostos mais potentes e menos tóxicos do que a própria pamaquina. O principal valor dos novos derivados 8-aminoquinolínicos foi a redução da toxicidade sem diminuição concomitante da atividade antimalárica. O grande valor clínico da primaquina tecidual consiste no tratamento curativo da malária por *P. vivax* e *P. ovale* (*recidivante*) em situações em que o tratamento com cloroquina sanguínea revelou-se insatisfatório (TRACY, 1996).

A mefloquina é derivado 4-quinolinometanólico, estruturalmente relacionado com a quinina. Devido à sua grande atividade em modelos animais, foi um dos compostos escolhidos entre os mais de 300 derivados quinolínicos testados pelo Instituto Walter Reed, financiado pelo Exército.

Americano, durante a Segunda Guerra Mundial. Era empregada com o objetivo de atacar as espécies de *P. falciparum* resistentes aos fármacos existentes. Este fármaco, introduzido no mercado, em 1985, pela Hoffmann-La Roche com o nome de Lariam<sup>®</sup> é, provavelmente, um dos mais estudados entre os compostos antimaláricos (COOK, 1996; GULATI *et al.*, 1996; GOLDMAN, 2000).

A resistência *in vivo* tem sido relatada para quase todos os antimaláricos existentes na terapia, exceto para artemisinina e seus derivados (HIEN *et al.*, 1993). A artemisinina, fármaco extraído da planta *Artemisia annua*, foi descrita em 1972 por suas atividades antimaláricas. Era usada na medicina chinesa desde 2000 a.C., para o tratamento de estados febris similares aos produzidos pela malária (MUKHERJEE, 1991; EVANS, 1996; COOK, 1996).

Pesquisas estão voltadas também para a descoberta de vacinas. No entanto, ainda não existe vacina que seja capaz de induzir resposta imune completa por longos períodos. A primeira tentativa de criar-se uma vacina foi mediante purificação de três proteínas derivadas de merozoítos de *P. falciparum*. Recentemente, alguns estudos demonstraram baixa imunogenicidade desta vacina, a qual induzia somente resposta temporária de 6 meses.

Assim, justifica-se a existência de vários grupos de pesquisas, em todas as regiões do mundo, que buscam novas alternativas para o combate desta parasitose incluindo o conhecimento das relações entre parasito, hospedeiro e fármacos empregados.

A síntese de intermediários funcionalizados é importante pois permite a obtenção de moléculas mais complexas com atividade potencial, além de fornecer subsídios para estudos de relação estrutura-atividade.

## 2. OBJETIVO

Considerando-se :

- o grupo quinolínico como básico para a atividade antimalárica de diversos fármacos;
- a importância do grupo –OH da mefloquina na atividade antimalárica;
- o bioisosterismo como ferramenta útil na modificação molecular;

Pretende-se obter estrutura que contenha um anel furânico fundido a um núcleo básico quinolínico, como precursor de novos antimaláricos.

Este, servirá como base para obtenção futura de novos agentes potenciais mediante substituições no anel furânico inserido.

---

## 2.1. Forma de desenvolvimento do estudo

Para atingir o objetivo pretendido, etapas tiveram de ser cumpridas, como segue:

1. Planejamento da síntese de novos derivados furanoquinolínicos precursores dos antimaláricos.

2. Definir rotas sintéticas para obtenção destes intermediários.

3. Preparação dos compostos  $\beta$ -dicarbonílico,  $\beta$ -enammina, 2-metil-alil-4-hidroxiquinolina, 2-(iodometil)-4-metil-2,3-dihidrofurano[3,2-c]quinolina e 2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina.

4. Purificação e caracterização dos produtos sintetizados, por métodos de cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa, faixa de fusão, espectrometria de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e DEPT, análise elementar de C, H e N, espectro de massas e análise espectrofotométrica na região do infravermelho.

5. Avaliação da atividade biológica dos compostos obtidos *in vivo* e *in vitro* frente ao *Plasmodium sp.*



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Malária

A malária é doença infecciosa tropical, transmissível, caracterizada clinicamente por acessos febris periódicos e causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem pela picada de fêmeas de *Anopheles*. Esta é doença muito antiga, cuja sintomatologia dominante é a febre, a qual se apresenta na maioria das vezes bem específica ( WIN, *et al.*, 1992, TRACY, 1996).

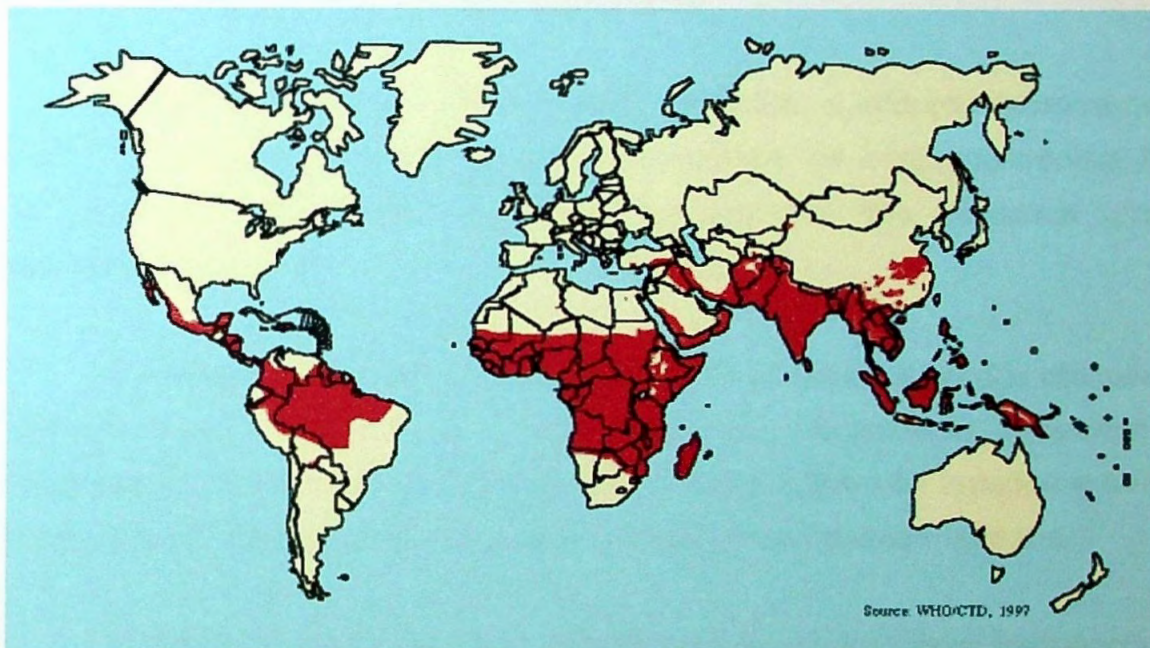
O período da incubação, compreendido entre a picada do mosquito infectado e o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas, depende da espécie de plasmódio, sendo de 7 a 10 dias para *P. falciparum*; de 10 a 15 dias para *P. vivax* e *P. ovale* e de 14 a 30 dias para *P. malariae* (WHO,1999, CIMERMAN,1999).

Os sinais e sintomas da malária podem incluir: febre, sudorese, calafrio, náusea, vômito, lombalgia, cefaléia, mialgia, artralgia, dores abdominais, faltas de apetite, podendo ser acompanhados de esplenomegalia. Após alguns ciclos de reprodução, o *P. falciparum* pôde causar graves complicações, tais como: anemia grave, hipoglicemia, insuficiência respiratória, edema pulmonar, insuficiência renal, coma (malária cerebral) e sangramentos espontâneos, podendo levar à morte, principalmente os imunodeprimidos, as gestantes e os viajantes não-imunes (TRACY, 1996).

### **3.2. Epidemiologia**

Malária, doença causada por protozário que mais mata no mundo, distribui-se pela África, Ásia e América. Apresenta taxa de incidência de cerca de 600 milhões de novas infecções e 3 milhões de mortes ao ano. O fardo dessa doença recai pesadamente sobre crianças com menos de cinco anos em algumas regiões da África. A mortalidade anual nessa população é cerca de 30% (WHO, 2001).

A distribuição da malária no final dos anos 90 é mostrada na Figura 1. No passado, a Europa e outras regiões temperadas eram suscetíveis a epidemias da malária de verão. A erradicação foi bem sucedida nestas regiões, mas o problema nos trópicos permaneceu.



- Áreas onde a malária desapareceu, foi erradicada ou nunca existiu.
- Áreas com risco limitado.
- Áreas onde a transmissão da malária ocorre.

**Figura 1. Distribuição mundial da malária.**

### 3.3. Patogenia

As reações e sintomas são diferentes para cada espécie deste protozoário unicelular. O *Plasmodium falciparum* causa malária terçã maligna, forma que pode ser letal em seres humanos e gera parasitemia intensa podendo causar doença fulminante em pessoas não-imunes. O tratamento tem que ser imediato devido à invasão rápida nos eritrócitos em qualquer fase do ciclo do parasita (REY,1992).

Seguindo-se esquema terapêutico adequado, a infecção termina no prazo de 48 horas. Se a terapêutica é inadequada, há a recrudescência. A infecção pode ser conseqüência de multiplicação dos parasitas que subsistem no sangue.

O *Plasmodium vivax* causa a malária terçã benigna, produz ataques clínicos menos intensos que os originados por *Plasmodium falciparum*. Registra-se cifras pequenas de mortalidade em adultos não tratados e tem como característica recaídas causadas pelas formas teciduais latentes.

O *Plasmodium ovale* gera infecção malárica com menor freqüência. Quanto à periodicidade e recaída assemelha-se ao *Plasmodium vivax*, e tem como característica ser mais benigna e de se curar mais facilmente. É oportuno destacar que esta espécie está ausente no Brasil.

O *Plasmodium malariae* causa a malária quartã e caracteriza-se pelo fato de que os ataques clínicos podem surgir anos depois da infecção e que é menos freqüente que a doença por *Plasmodium vivax*.

---

O ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* que envolve a participação do hospedeiro invertebrado (o mosquito) e o vertebrado (o homem) é apresentado na Figura 2 (REY,1992).

O ciclo se inicia com a reprodução sexuada do parasita, a qual ocorre em cerca de dez dias. Esta fase tem origem quando o mosquito se alimenta, através da picada de sangue de pessoa infectada.

No sangue sugado pelo mosquito, estão contidos os gametócitos femininos e masculinos, os quais migram para o estômago do anofelino. Posteriormente, origina-se um zigoto móvel, denominado oocisto. Este, atravessa a parede do estômago do mosquito, transformando-se em oocisto, contendo milhares de esporozoítos.

Em seguida à maturação, os esporozoítos migram, distribuindo-se por todo o corpo do hospedeiro, provavelmente por quimiotaxia, sendo atraídos para as glândulas salivares. Nestas, atingem os dutos, após terem desenvolvido membrana protetora.

Este mosquito hospedeiro, ao se alimentar, injeta fluidos salivares, contendo os esporozoítos nos tecidos subcutâneos de um segundo vertebrado, o homem, passando a exercer a função de vetor. Uma vez inoculados, os esporozoítos passam à circulação periférica e rapidamente migram para os hepatócitos, nos quais se iniciará a reprodução assexuada do ciclo do *Plasmodium*, constituída pelos estágios exoeritrocítico e eritrocítico.

O estágio exoeritrocítico é assintomático e depende da espécie do parasita. Neste período, por processo de esporogonia, os esporozoítos dão origem aos esquizontes. Estes, por segmentação transformam-se em



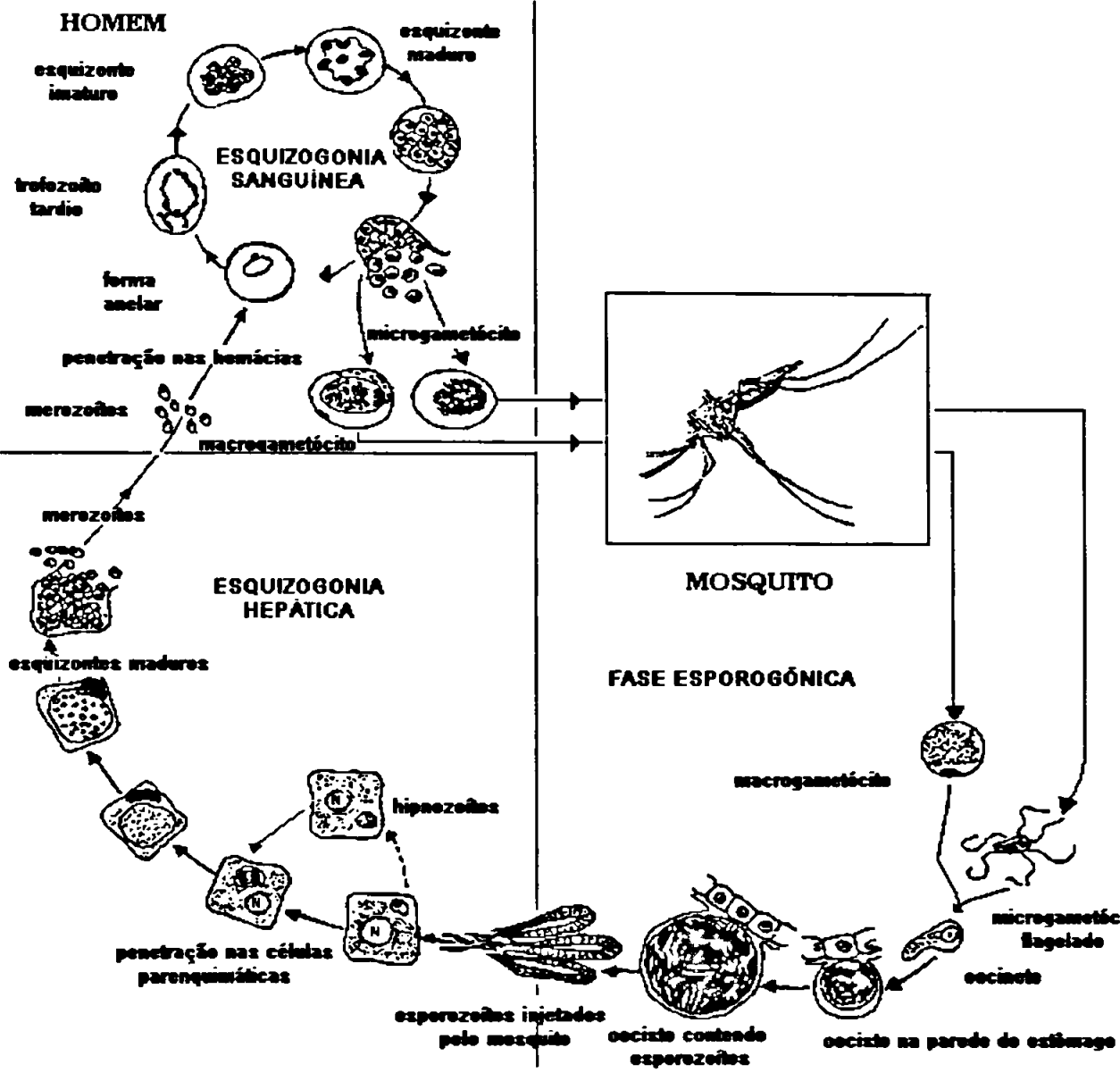
milhares de merozoítos, os quais causam o rompimento da célula, migrando para a corrente sanguínea.

Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* pode ocorrer a permanência de formas teciduais latentes, conhecidas como hipnozoítos, os quais são responsáveis pelas recaídas. A origem dos hipnozoítos não é totalmente esclarecida (SCHMIDT, 1986). É possível que se deva à existência de esporozoítos com comportamento distinto do usual (KROTOSKI *et al.*, 1980). Estes, ao penetrarem nos hepatócitos, teriam seu desenvolvimento retardado, permanecendo latentes. Por razão indeterminada, estas formas voltam a se desenvolver, causando o reaparecimento da infecção após meses e mesmo anos da exposição inicial.

O estágio eritrocítico da infecção inicia-se pela invasão dos merozoítos aos eritrócitos. O parasito, de forma anelar, transforma-se em trofozoíto maduro e em esquizonte que, por segmentação, transformam-se em merozoítos que são liberados na corrente sanguínea, invadindo outros eritrócitos. Nesta fase, a doença assume caráter sintomático, com quadros de febre em que a periodicidade depende da natureza do parasito.

A diferenciação sexual de alguns parasitas eritrocíticos gera os gametócitos, que, transferidos ao mosquito, levam ao reinício do ciclo.

---



Fonte: Adaptado de CDC Atlanta, <http://cdfound.to.it/html/pfc4.html>

Figura 2. Ciclo Biológico do *Plasmodium* sp.

### **3.4. Malária no Brasil**

Na década de 40, a malária distribuía-se por todo o território nacional afetando mais de 6 milhões de habitantes (BARRETO,1956), exigindo a implantação de um programa nacional de combate à doença, cuja principal diretriz era a aplicação de DDT.

Em 1965 foi oficializada a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), que incluía obras de saneamento, emprego de larvicidas e de inseticidas, diagnósticos e tratamento dos casos de malária reportados. No final da década de 60 foram registrados apenas 74 mil casos, com interrupção da transmissão da doença nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (MARQUES, GUTIERREZ,1998).

A partir do final da década de 70, o número de casos voltou a aumentar, em decorrência de projetos de desenvolvimento para integrar a Amazônia ao resto do país. Esta iniciativa acarretou a migração desordenada de pessoas de outros estados, abertura de grandes rodovias, construção de hidrelétricas, implantação de projetos de colonização e intensificação de exploração mineral. Tais alterações ecológicas favoreceram o crescimento da população dos mosquitos vetores (MARQUES, GUTIERREZ,1998).

Entretanto, a CEM não previa que as mudanças ecológicas e sociais fossem tão profundas bem como suas conseqüências, que são observadas até os dias atuais, com a notificação de 632 mil casos em 1999, sendo 99,7% transmitidos na Amazônia Legal.

---



Por outro lado, o retorno de muitos migrantes aos seus estados de origem acarreta permanente risco de reintrodução da malária na região extra-amazônica, exigindo constante vigilância, com diagnóstico e tratamento precoce dos casos importados (MARQUES, GUTIERREZ , 1998).

### **3.4.1. Características da transmissão da malária**

#### **3.4.1.1. Fora da Amazônia legal**

A área considerada não endêmica para malária compreende 17 estados das regiões Nordeste (exceto Maranhão), Sul, Sudeste e Centro-Oeste e Distrito Federal. A receptividade, devido à chegada de doentes e de portadores assintomáticos provenientes de áreas com transmissão ativa, constitui fator de risco para a ocorrência de casos autóctones fora da Amazônia Legal (BRAZ, 1999).

No início da década de 40, a malária era endêmica nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina parte do Rio Grande do Sul, com cerca de 40.000 casos por ano, distribuídos numa área habitada por 1 milhão de pessoas (DEANE,1988). A transmissão era relacionada a *A. (Kerteszia) cruzii* e *A.(Kerteszia) bellator*, considerados bons vetores, abaixo do paralelo 25° S, cujos criadouros, as bromélias, eram abundantes na região.

Estas duas espécies de mosquitos ou de vetores têm atividades intra e extradomiciliar, dentro e fora das matas e hábitos antropofílicos e zoofílicos (RACHOU,1958). A remoção de bromélias e a introdução do plantio de eucalipto, onde estas plantas não cresciam, além de outras medidas de controle vetorial, como borrifação, contribuíram para redução gradativa do número de casos. Em 1982, foram notificadas apenas 71 infecções na

região (DEANE,1988). Embora de ocorrência esporádica, casos autóctones continuam a ser descritos, a exemplo de relatos de *P. vivax*, no Rio de Janeiro (BARROSO,1999) e São Paulo (WANDERLEY *et al.*, 1994).

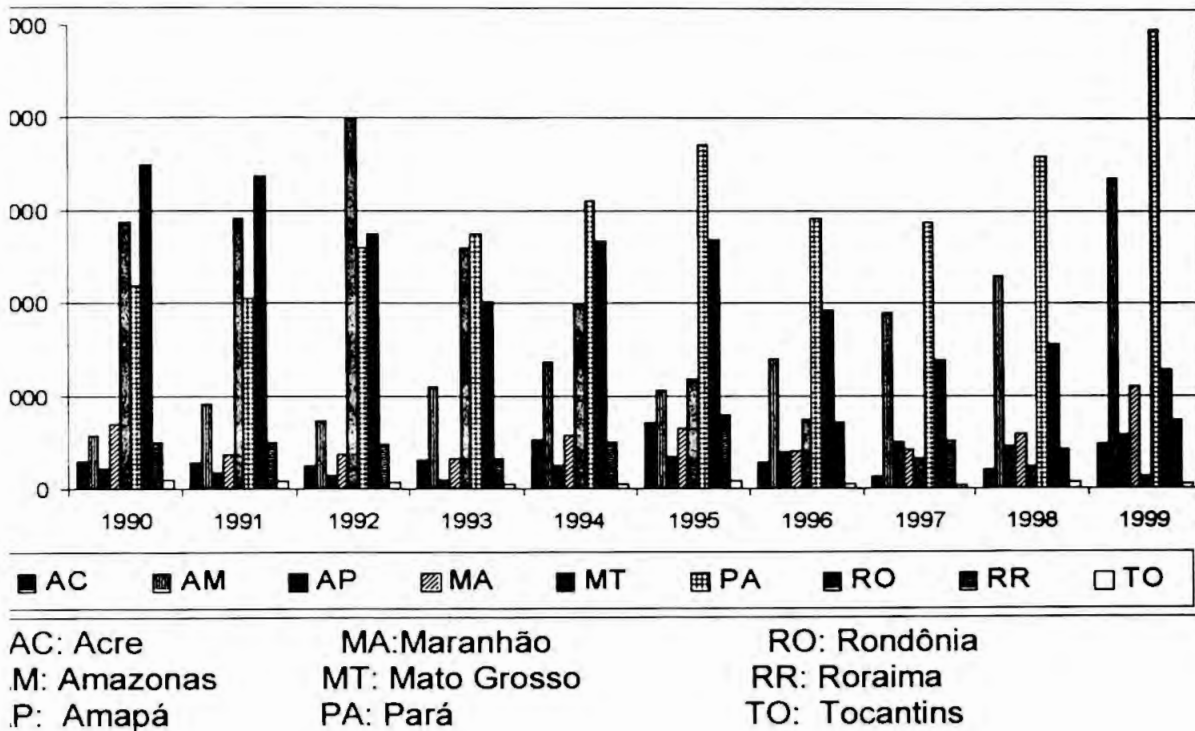
Primatas podem albergar parasitas como *P. brasilianum* e *P. simium*, entre outros. Eventualmente, a infecção pode ser transmitida ao homem, ocasionando parasitemia discreta e sintomatologia pouco exuberante, incluindo casos assintomáticos. *P. brasilianum* foi o primeiro parasita descrito em primatas do Novo Mundo (GONDER, BERENBERG-GOSSLER, 1908). Esta espécie de parasita é morfológica e biologicamente indistinguível do *P. malariae*. Mais tarde, em 1951, Fonseca descreveu a ocorrência de *P. simium*, de morfologia semelhante ao *P. vivax* em primata *Alouatta fusca* de São Paulo (FONSECA, 1951).

Estudos realizados por Deane (1988) mostraram que 22% dos primatas pesquisados no Brasil estavam infectados com *Plasmodium*, exceto nos estados do Nordeste. Em São Paulo esta taxa chegou a 60%. *P. brasilianum* foi encontrado em todo o Brasil, enquanto que *P. simium* foi detectado nas matas costeiras, entre 20° S e 30° S de latitude.

#### **3.4.1.2. Dentro da Amazônia legal**

A observação da distribuição epidemiológica da malária no Brasil nos últimos 10 anos (Figura 3), conduz a explicações interessantes.

Mato Grosso e Rondônia apresentam particularidades no processo de desenvolvimento, pela implantação de projetos oficiais de colonização e extração mineral desordenada, tendo em comum a diminuição constante no número de casos a partir dos anos referenciados.



Fonte: 1998-1999 → Avaliação Epidemiológica da Malária-Segundo o local de diagnóstico, Brasil, (04/09/00); 1990-1997 → Registro de Casos de Malária. MS-JNASA-GT-MALÁRIA. Brasil.

**Figura 3. Distribuição epidemiológica da malária no Brasil nos últimos 10 anos.**

A extração de ouro e cassiterita e a implantação de projetos agrícolas são fatores que influenciam a doença em Rondônia, atingindo seu pico em 1988, com 278 mil casos (FONTES, DUARTE, 1999).

Em 1992, Mato Grosso foi atingido principalmente na região norte, com quase 200 mil casos. Ambos os estados, mantendo este comportamento, serão considerados áreas de vigilância de malária, como está ocorrendo em Tocantins (FONTES, DUARTE, 1999).

Em Rondônia, foram registrados 278.408 casos de malária, em 1988, e 63.296 casos, em 1999, significando 77,3% de queda no período. Entre 1992 e 1999, observou-se 96,8% de redução, no Mato Grosso passando de 198.302 para 6.291 casos. O fator que contribuiu para diminuição do número de casos nestes estados, foi o término da atividade extrativista nas minas de ouro e de cassiterita com a conseqüente redução da mão de obra. Fontes e Duarte (1999) demonstraram a existência de associação ecológica positiva entre a incidência parasitária anual de malária (IPA) e a produção de ouro nos períodos de 1985 a 1996.

A diminuição da incidência de malária nestas regiões atingiu os objetivos e metas propostas. Com os recursos do Programa de Controle Integrado da Malária (PCIM), conforme recomendações da OMS, em 1992, o projeto de Controle da Malária na Bacia Amazônica (PCMAM) e os convênios firmados entre a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), estados e municípios, para acelerar o processo de descentralização da vigilância epidemiológica e controle da malária, conduziram a esta redução do número de casos (PERTEILE, *et al*; 2000).

No caso de Mato Grosso ocorreu o processo denominado “descentralização participativa” em várias etapas:

- Organização da rede básica,
- Fortalecimento dos sistemas locais, com capacitação de recursos humanos,
- Sistema de informação em Saúde,
- Pesquisa operacional, com a integração das entidades de pesquisa no Estado, e oficinas de educação para técnicos e professores (PERTEILE, *et al.*; 2000).

A atividade de geoprocessamento para controle da malária, tendo Rondônia como ponto de referência, permitiu o monitoramento e controle de focos de malária em outras localidades.

Muitos estados da Amazônia apresentaram número elevado de casos de malária. Entre alguns fatores podem-se citar a inexistência de vacina ou de medicamento único, que se aplique a todas as espécies e formas parasitárias esquemas de tratamento, permitindo adesão do paciente (TERRAZAS *et al.*, 2000).

Dos anos 1990 a 1999 o Amazonas passou de 28.479 para 167.722, com incremento de 488,9%; Maranhão, de 34.955 casos para 54.798, com aumento de 56,76%; no Pará, passou de 100.738 para 248.233, com 146,41%, de aumento (TERRAZAS *et al.*, 2000).

---

Em 1990, na Amazônia Legal observavam-se 5,3% do total de casos, aumentando para 26,5%, em 1999, com incremento de 21,2% devido à extensa movimentação da população, assentamentos agrícolas e expansão urbana (TERRAZAS *et al.*, 2000).

### 3.4.2. Riscos de infecção

Quanto aos grupos de risco para malária, os indivíduos mais afetados são trabalhadores que se expõem, com freqüência, nas áreas endêmicas devido às suas atividades ocupacionais. São, principalmente, trabalhadores agrícolas ou envolvidos na extração mineral e vegetal, tais como: lavradores, garimpeiros, madeireiros e extratores de borracha. Além destes, também se infectam com freqüência os trabalhadores do setor de transporte, que possuem o hábito de pernoitar dentro dos caminhões sem qualquer proteção individual para evitar o contato com mosquitos infectados (BRAZ, 1999).

São cinco as principais espécies de vetores de malária no Brasil. *A. (Nyssorhynchus) darlingi* é o vetor mais importante, cujos criadouros são grandes coleções hídricas. Com ampla distribuição, essa espécie é responsável pela transmissão de 90% dos casos. *A. (N.) albitarsis*, apresenta maior densidade, mas com baixa antropofilia e criadouros diversos; *A. (N.) acquasalis*, com incidência domiciliar elevada em áreas litorâneas é encontrado em águas com certo teor de sal. *A. (Kerteszia) cruzi* e *A. (K.) bellator*, espécies antropofílicas encontradas em áreas de Mata Atlântica, se reproduzem em água acumulada em bromélias (PINTO, 1968).

Os casos de malária no Brasil são classificados epidemiologicamente como: autóctones, se transmitidos localmente; importados, se transmitidos

fora da área onde ocorreu a detecção; introduzidos, se contraídos localmente, porém derivados de caso importado (introdutor); induzidos, se transmitidos acidentalmente por transfusão sanguínea ou outros procedimentos que envolvam material perfuro-cortante contaminado, incluindo uso compartilhado de seringas e/ou agulhas em usuários de drogas. O termo induzido também se aplica a casos de malária transmitidos de mãe para filho no momento do parto, por ruptura de vasos sanguíneos. Recaídas são casos de reaparecimento de parasitemia devido à ativação de hipnozoítas (formas latentes) dentro dos hepatócitos em infecções causadas por *P. vivax* ou *P. ovale* (DI SANTI, BOULOS, 1999).

### **3.5. Diagnóstico da malária**

Além dos programas de controle da malária são importantes o diagnóstico laboratorial e o diagnóstico clínico.

O diagnóstico laboratorial da malária continua a ser realizado através da gota espessa. Esta técnica baseia-se na visualização dos parasitas através de microscopia óptica, após coloração com derivados de Romanowsky (azul de metileno e Giemsa). Muitos métodos alternativos foram desenvolvidos, porém apresentam custos altos e pouca aplicabilidade a regiões endêmicas que são geralmente áreas desprovidas de recursos (CIMERMAN, CIMERMAN, 1999).

### **3.6 Quimioterapia antimalárica (BRUCE-CHWATT, 1986)**

Para entender as etapas pelas quais passou o tratamento da malária é importante descrever aspectos históricos relacionados à doença ao final do século XIX.

Em 1880, Laveran identificou o parasita da malária no sangue humano. Isto motivou a procura de organismos similares em animais e foi dez anos mais tarde que Danielsky encontrou uma espécie em sangue de aves.

A observação inicial de Guttman e Ehrlich que o azul de metileno tinha certos efeitos benéficos em um paciente afetado pela malária, contribuiu para estudos posteriores.

O objetivo imediato do tratamento da malária é abolir o ciclo de reprodução sanguínea do parasita responsável pelas manifestações clínicas agudas e eventuais complicações. Além disso, é importante para impedir as recidivas da infecção e eliminar os gametócitos, interrompendo a cadeia de transmissão do parasita. A escolha do esquema terapêutico deve considerar a espécie de plasmódio e a gravidade do caso.

Os antimaláricos usados para o tratamento podem ser divididos de acordo com o estágio do parasita que afetam. Daí a existência da variedade de fármacos usados no tratamento desta doença. A introdução dos medicamentos antimaláricos sintéticos é fato interessante na história da quimioterapia.

Os químicos alemães, precursores da pesquisa dos medicamentos antimaláricos sintéticos, motivados pelos intentos de Perkin para produzir

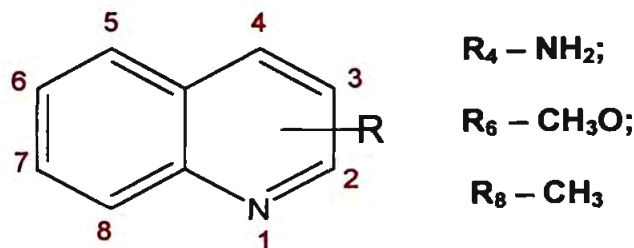


quinina artificial, tiveram sua tarefa facilitada pela observação da técnica de empregar o *relictum* em canários o que permitiu a comparação dos novos compostos com relação à quinina. Depois, isolaram os princípios ativos da casca da quina e tentaram sintetizá-los.

Baseados na observação de Ehrlich, na década de 1920 a 1930, Schuleman, Schönhofer e Wingler, concentraram sua atenção nos derivados da tiazina relacionados com azul de metileno. Foram obtidos compostos com cadeia lateral básica de dialquilaminoalquilamina que apresentaram atividade contra parasitas da malária aviária.

A combinação do grupo básico 6-metoxiquinolína, levou à obtenção do primeiro antimalárico sintético da série das 8-aminoquinolinas, chamado Plasmochin (pamaquina).

Modificações na cadeia lateral básica ligada a posição 4 do grupo quinolínico, feitas por pesquisadores alemães, resultaram na sontoquina e cloroquina, sintetizadas por Andersem, em 1934.



### Estrutura básica da quinolina

Desses estudos resultaram a pamaquina e mepacrina, que, submetidas a ensaios biológicos, mostraram atividade antimalárica, sendo a mepacrina menos tóxica.

Paul Ehrlich demonstrou que bactérias e parasitas patógenos têm uma série de quimiorreceptores diferentes entre si, alguns deles sem equivalentes no organismo humano. Dessa forma, um composto químico que atue especificamente sob o parasita sem provocar danos ao hospedeiro constituiria o medicamento ideal.

Todas estas observações levaram a procura de novos fármacos fundamentada em:

- Índice Quimioterapêutico: baseado no postulado de que nenhum composto químico externo ao organismo humano pode ser completamente inofensivo para este. Porém, este composto será tão mais aceitável quanto mais elevada seja a dose tolerada pelo indivíduo, desde que a dose mais baixa seja suficiente para eliminação do agente patogênico;
- Idéia de um fármaco que destruísse todos os parasitas com uma única dose.

### **3.6.1- Classificação dos fármacos antimaláricos quanto ao ciclo do parasita<sup>2</sup>**

#### **Esquizonticidas teciduais utilizados para profilaxia causal**

Estes fármacos atuam sobre formas teciduais primárias de plasmódios no interior do fígado e, dentro de um mês ou menos, destinam-se a iniciar a fase eritrocitária da infecção. A invasão dos entrócitos e a transmissão subsequente da malária ao mosquito são assim evitadas.

A pirimetamina é extensamente utilizada na profilaxia causal na malária por *P. falciparum*. A primaquina também possui atividade profilática causal, mas não é empregada para tal finalidade em virtude da sua toxicidade.

### **Esquizonticidas teciduais utilizados na prevenção de recidivas**

Estes compostos atuam sobre as formas hepáticas de *P. vivax* e *P. ovale*, que produzem recidivas após o ataque primário. Quando associados com esquizonticida sanguíneo apropriado, estes fármacos podem produzir cura radical das infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. a primaquina é o protótipo desses fármacos que evitam a ocorrência de recidivas.

### **Esquizonticidas sanguíneos utilizados para cura clínica ou supressiva**

Estes fármacos atuam sobre os estágios eritrocitários assexuados do parasita da malária, a fim de interromper a esquizogonia eritrocitária e suspender os ataques clínicos (cura clínica). O termo da cura supressiva refere-se à eliminação completa dos parasitas da malária do organismo mediante tratamento supressivo contínuo.

Os esquizonticidas sanguíneos podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a sua eficácia clínica e seus mecanismos de ação. O primeiro inclui os alcalóides antimaláricos clássicos cloroquina, quinina e derivados correlatos, como a quinidina, a mefloquina e a halofantrina. Estas bases fracas concentram-se nos eritrócitos infectados por plasmódios sensíveis, causam lesões características aos parasitas e produzem rápida melhora clínica, quando administradas isoladamente.

---

<sup>2</sup> NOTA: o conteúdo deste item foi pesquisado em: Bruce- Chwatt, 1986; Goodman & Gilman, 1996)

Seus mecanismos de ação não estão bem elucidados e o desenvolvimento de resistência do *P. falciparum* a eles é relativamente lento.

O segundo grupo inclui pirimetamina, proguanil e seus derivados, que inibem a diidrofolato-redutase; inclui também sulfonamidas e sulfonas, que interferem na síntese do ácido diidropteróico e, portanto, na biossíntese de folato (processo que não é importante para os mamíferos), e as tetraciclinas, que inibem a síntese de proteínas. Do ponto de vista clínico, estes compostos têm ações mais lentas, exibem menor eficácia e quase sempre são administrados com outros esquizotocidas sangüíneos. A resistência do *P. falciparum* a tais fármacos é comum no campo e facilmente produzida em laboratório.

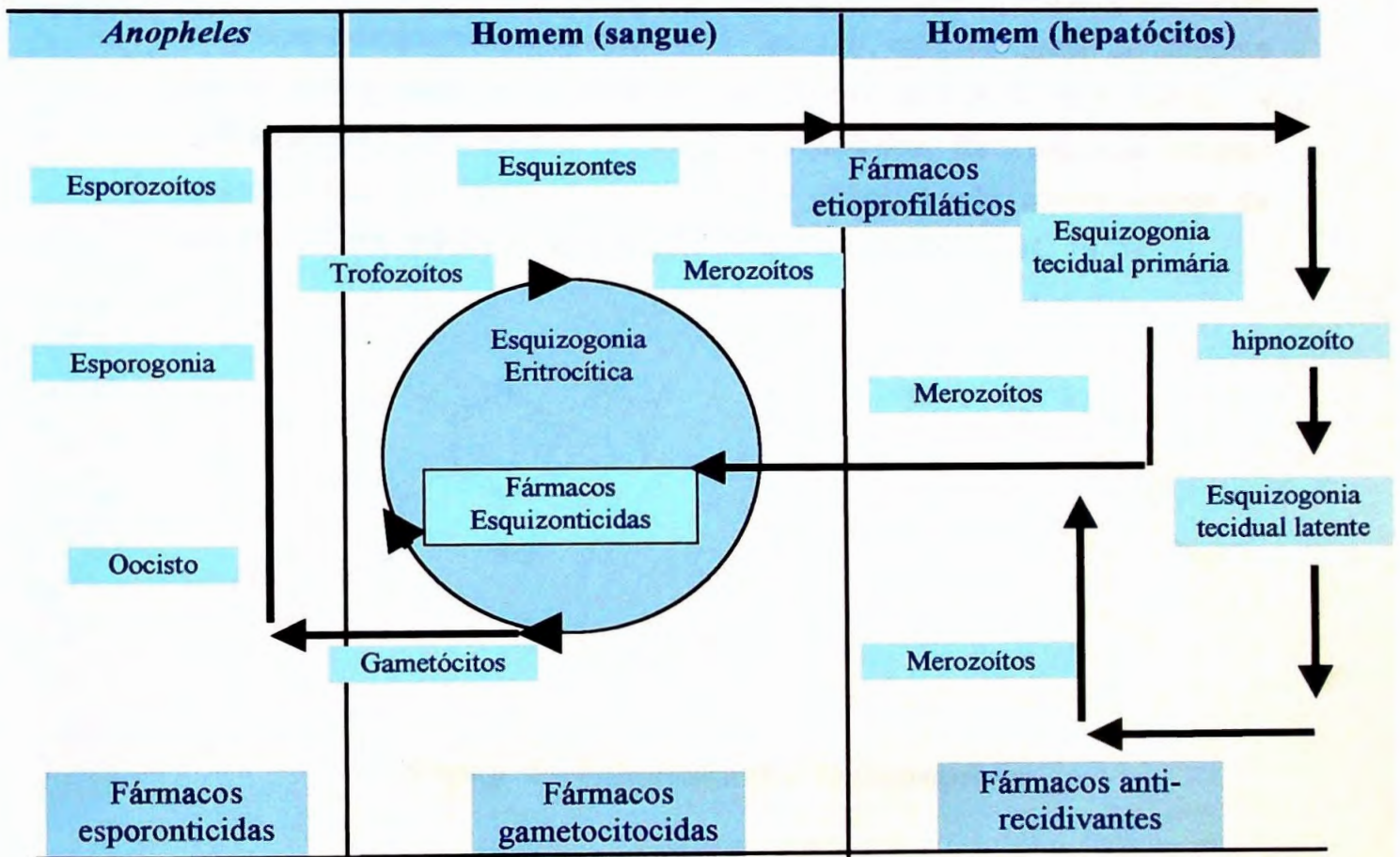
### **Gametocidas**

Este tipo de fármaco atua ao destruir as formas eritrocitárias sexuadas do plasmódio, impedindo assim a transmissão da malária ao mosquito. A primaquina possui potencialmente atividade contra *P. falciparum*. A cloroquina e a quinina exibem a mesma atividade gametocida contra *P. vivax* e *P. malariae*, mas não contra *P. falciparum*.

### **Esporonticidas**

Estes fármacos impedem a transmissão da malária ao evitar ou inibir a formação de oocistos e de esporozoítos da malária nos mosquitos infectados.

A primaquina e o proguanil são os principais antimaláricos com este tipo de ação (TRACY, 1996).



Adaptada de Bruce – Chawt, L.J. *et al.*, (1982) Quimioterapia Del Paludismo (2º ed) OMS – Série de monografias nº 27. SUCEN, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil, 1988.

**Figura 4 - Diagrama da ação de fármacos antimaláricos em relação ao estágio de desenvolvimento do parasita da malária**

### 3.6.2. Classificação química dos antimaláricos

#### Diaminopirimidinas

Quanto à atividade quimioterápica das 2,4-diaminopiridinas sintéticas destacam-se a pirimetamina (figura 5), utilizada quase unicamente como antimalárico, e a trimetoprima, como agente antibacteriano. A pirimetamina, com elevada atividade antimalárica, foi utilizada durante muito tempo na profilaxia, supressão e quimioterapia contra cepas de malária *P. falciparum* resistentes à cloroquina (FALCO *et al.*, 1951).

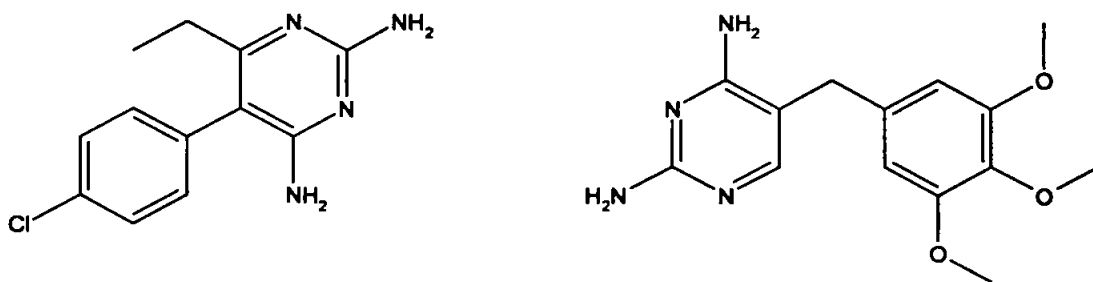


Figura 5 – Pirimetamina e Trimetoprima.

A cura supressiva de infeções por *P. vivax* pode ser obtida durante medicação contínua por 10 semanas, retirando-se o indivíduo da área da malária e verificando-se certa atividade profilática causal (DAVEY *et al.*, 1963).

Durante as pesquisas, foi demonstrado que este grupo atua ao inibir a diidrofolato-redutase dos plasmódios em concentrações muito menores do que as necessárias para produzir inibição comparável da enzima em

mamíferos (FERONE *et al.*, 1969). A diidrofolato-redutase catalisa a redução do diidrofolato a tetraidrofolato, sendo este necessário para biossíntese de purinas, pirimidinas e certos aminoácidos. Esta inibição manifesta-se no parasita da malária pela incapacidade de divisão nuclear na transformação dos esquizontes nos eritrocíticos no fígado.

Existe ação sinérgica na associação da pirimetamina e sulfonamidas (HITCHINGS, BURCHALL, 1965) O valor destas associações está em evitar ou retardar o desenvolvimento de resistência dos plasmódios (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1981).

Após administração, a pirimetamina oral sofre absorção lenta, acumulando-se nos rins, pulmões, fígado e baço, obtendo concentrações plasmática em cerca de 80 a 95 horas. Permanece no sangue em concentrações supressivas por duas semanas para cepas sensíveis ao fármaco (BROOKS *et al.*, 1969, STICKNEY *et al.*, 1973). A eliminação do fármaco é pela via urinária e pelo leite materno.

A pirimetamina atualmente é utilizada em associação com sulfonamidas e sulfonas e é de pouca valia no tratamento do ataque primário agudo da malária. Apesar de apresentar ação lenta na eliminação da parasitemia, evita o desenvolvimento do gameta fertilizado e possui certa atividade profilática causal. A associação com sulfadoxina é útil para ataques de malária por *P. falciparum*, resistente a cloroquina porém, mais recentemente, esta associação já não apresenta a mesma eficácia, uma vez que, em diversas regiões com na América do Sul, leste da África, sudeste da Ásia, a malária por este *Plasmodium* tem apresentado resistências (DE SOUZA, 1992, FERREIRA, 2002).

---

A pirimetamina associada com sulfadiazina é útil também no tratamento da toxoplasmose que é grave em pacientes com comprometimento imunológico (AIDS) (FELDMANN, 1968, McCABE, REMINGTON, 1984, LEPOR *et al.*, 1988).

### **Quinina e alcalóides da *Cinchona***

A quinina (figura 6) é o principal alcalóide da *Cinchona sp.*, nativa de certas regiões da América do Sul. A droga é também conhecida como casca peruana, casca dos jesuítas ou do cardeal.

O primeiro registro escrito a respeito do uso da cinchona foi feito num livro religioso redigido em 1633 e publicado na Espanha em 1639. O autor, um monge agostiniano chamado Calancha, de Lima, Peru, escreveu: "Uma árvore, que chamam de "árvore da febre", cresce na região de Loxa, e sua casca, da cor da canela, é transformada em pó com o uso de duas pequenas moedas de prata e dada como bebida para curar as febres terças tem produzido resultados miraculosos em Lima." Existem várias versões pitorescas e fantasiosas sobre a descoberta da casca da febre. Uma versão popular afirma que a casca foi empregada em 1638 para tratar a condessa Anna dei Chinchón, esposa do vice-rei do Peru, e cuja cura milagrosa resultou na introdução da cinchona na Espanha, em 1639, para o tratamento do paludismo. Não há provas de que a condessa tenha usado alguma vez a casca; contudo, o remédio foi chamado durante muitos anos *de os Polvos de la Condessa*. Todavia, o vice-rei efetivamente trouxe grande carregamento de cinchona para a Espanha.

Por volta de 1640, a casca era utilizada para as febres na Europa. Seu uso foi mencionado pela primeira vez na literatura médica européia, por um belga, Herman van der Heyden.



O termo *Cinchona* foi escolhido por Linné (que acidentalmente escreveu-o de maneira errada) para designar as espécies de árvores produtoras da casca. Embora este termo seja provavelmente derivado do nome da condessa, cuja pretensa cura levou a sua ampla utilização, alguns autores acreditam que tenha a sua origem numa palavra de origem inca, *Kinfa*, que significa “casca, cortiça”.

Os padres jesuítas foram os principais importadores e distribuidores da *Cinchona* na Europa, e a denominação “casca dos jesuítas” logo passou a designar a droga.

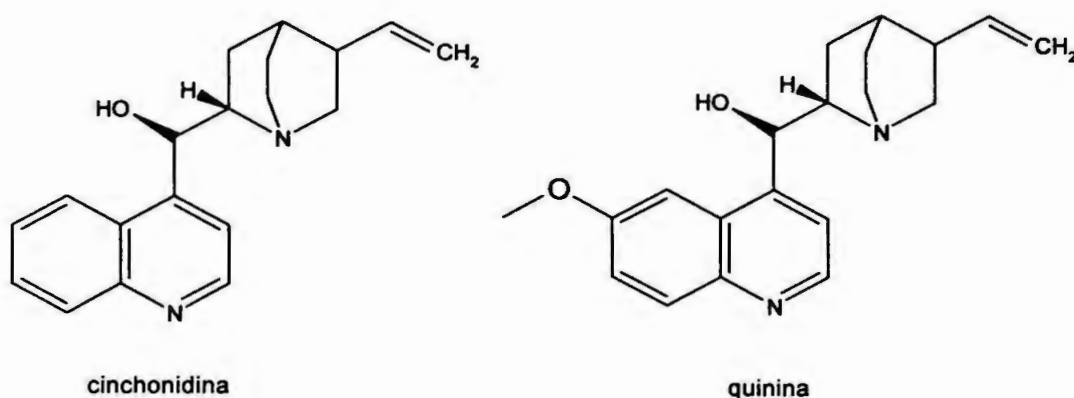
Em Roma, foi patrocinada principalmente pelo eminente filósofo, Cardeal de Lugo; por isso, passou a chamar-se “casca do cardeal”. Os grupos médicos conservadores encaravam o novo antipirético com desdém, porquanto seu uso não correspondia aos ensinamentos de Galeno. Outros consideravam-no como suspeito porque era utilizado pelos jesuítas. Por essas razões, a droga foi durante muitos anos administrada principalmente por charlatões, na forma de remédios secretos.

O primeiro reconhecimento oficial da *Cinchona* foi feito em 1677, quando a droga foi incluída numa edição da *London Pharmacopoeia* como “Córtex Peruanus”.

Durante quase dois séculos, a casca foi empregada em medicina na forma de pó, extrato ou infusão. Em 1820, Peletier e Caventou isolaram a quinina e a cinchonina, e o uso dos alcalóides como tal cresceu rapidamente.

A quinina (figura 6) e outros alcalóides ainda são obtidos totalmente

de fontes naturais . A *Cinchona sp* apresenta mistura de mais de 20 alcalóides. Os mais importantes são dois pares de diastereoisômeros ópticos, a quinina e a quinidina e a cinchonidina e a cinchonina. A quinina e a cinchonina são levorrotatórias.



**Figura 6 - Estrutura dos alcalóides da quina.**

A quinina contém um grupo quinolina unido através de uma ligação álcool secundário a um anel quinuclidina. Um grupo substituinte metóxi está ligado ao anel quinolínico (R) e existe um grupo vinil ligado ao quinuclidínico. A quinidina possui a mesma estrutura que a quinina, exceto pela configuração espacial do grupo álcool secundário. A estereoisomeria nessa posição constitui um fator importante na relação entre estrutura e atividade biológica. A quinidina é mais potente como antimalárico e também mais tóxica do que a quinina (WHITE, 1996).

Os numerosos alcalóides naturais relacionados a quinina e aos produtos químicos semi-sintéticos, derivados do quinina, diferem principalmente da natureza das substituições na cadeia lateral. Cada alteração na estrutura química da quinina provoca alterações quantitativas correspondentes, mas não qualitativas, nas ações farmacológicas dos

compostos resultantes (OETTINGEN, 1933; WISELOGLE, 1946).

A quinina atua como esquizonticida sangüíneo, tem pouco efeito sobre os esporozoítos ou formas pré-eritrocitárias dos parasitas da malária, atua como gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*, sendo mais tóxica e menos eficaz do que a cloroquina como agente supressivo e terapêutico, pelo fato de atuar como base fraca (SCHLESINGER *et al.*, 1988). Tem valor terapêutico para doença grave por cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina.

Na administração oral ou intramuscular são absorvidas em cerca de 80% na porção superior de intestino delgado, mesmo com pacientes apresentando diarreia, atingindo concentrações plasmáticas máximas em 1 a 2 horas após única dose oral. Ao término da terapia com quinina a concentração plasmática declina. A meia-vida é de 11 horas.

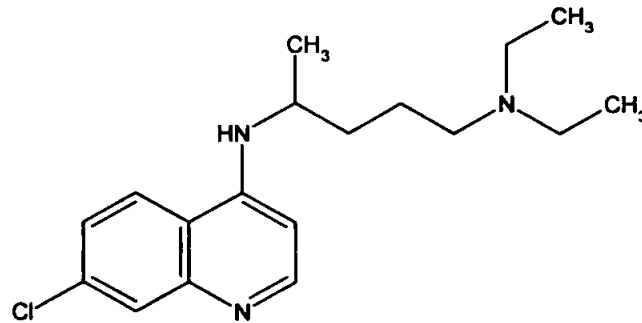
Os alcalóides da *Cinchona* são metabolizados no fígado e cerca de 10% são excretados inalterados pela urina. A toxicidade da quinina (2 a 8g), com doses administradas repetidamente apresenta um conjunto de sintomas relacionados à dose conhecida como cinchonismo. Na forma suave ocorrem zumbidos, náuseas e distúrbios visuais. Podem aparecer manifestações gastrintestinais, cardiovasculares e dermatológicos. Atualmente é utilizada, por via intravenosa, como fármaco esquizonticida de ação rápida no tratamento de formas graves de malária por *P. falciparum* resistente à cloroquina. Também como cura supressiva em pacientes com malária por *P. falciparum* multirresistente, em combinações com pirimetamina, sulfadoxina e tetraciclina (SYMPOSIUM, 1987, KROGSTAD *et al.*, 1992, WHITE, 1996).

### **Cloroquina e seus congêneres**

A cloroquina (figura 7) pertence à série das 4-aminoquinolinas, que foram investigadas como parte do extenso programa cooperativo de pesquisa antimalárica efetuado nos Estados Unidos durante a II Guerra Mundial. O objetivo era descobrir agentes supressores mais eficazes e menos tóxicos do que a mepacrina, um derivado da acridina que foi abandonado como quimioterapia da malária em virtude de sua toxicidade e incapacidade de curar a malária causada por *P. vivax* ou de atuar como agente profilático causal.

Embora as 4-aminoquinolinas tivessem sido descritas como antimaláricos potenciais por pesquisadores russos, não foi dada muita atenção a esse grupo químico, até o momento em que os franceses relataram que um dos derivados a santoquina, conhecida como santochin, era bem tolerado e apresentava alta atividade contra a malária humana (BRUCE-CHWATT, 1986).

A partir de 1943, vários desses compostos foram sintetizados e testados quanto à sua atividade. Posteriormente, a cloroquina mostrou-se a mais promissora e teve o seu uso liberado para estudos clínicos. Quando a guerra terminou, descobriu-se que a cloroquina tinha sido sintetizada e estudada pelos alemães desde 1934, com o nome de RESOCHIN (BRUCE-CHWATT, 1986).



**Figura 7 – Cloroquina.**

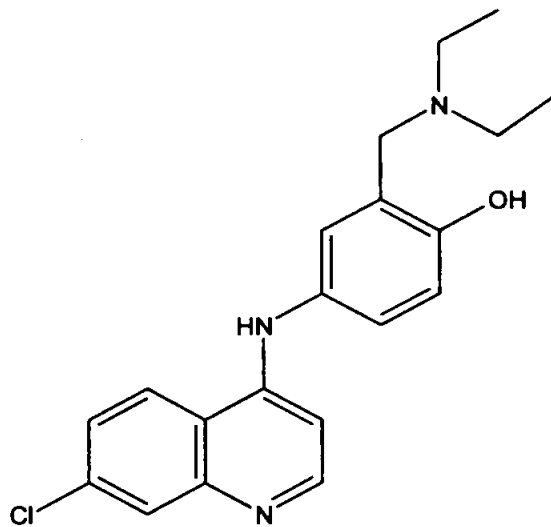
A cloroquina contém a mesma cadeia lateral alquílica da mepacrina e difere desta por ter um núcleo quinolínico em lugar de acridínico e por não apresentar o grupo metoxila. A cloroquina também apresenta estreita semelhança com a pamaquina e a pentaquina, antimaláricos obsoletos da 8-aminoquinolinas.

As formas *d*, *l* e *dl* da cloroquina são indistinguíveis nos testes de potência para malária em patos, porém o isômero *d* é um pouco menos tóxico do que o isômero *l* nos mamíferos (TRACY, 1996)

As 4-aminoquinolinas com maior atividade antimalárica em aves e em seres humanos possuem um átomo de cloro na posição 7 do núcleo quinolínico. Os detalhes sobre estrutura e atividade da cloroquina e seus congêneres são apresentados por BERLINER *et al* (1948) e COATNEY *et al* (1953).

Amodiaquina ( Fig. 8) é um congêneres da cloroquina, utilizado com menos freqüência no tratamento de ataques de malária estabelecida e na

sua supressão. Embora possa ser mais ativa do que a cloroquina contra certas cepas de *P. falciparum* com suscetibilidade diminuída à cloroquina, a amodiaquina não é mais recomendada para quimioprofilaxia em virtude de estar associada à ocorrência de toxicidade hepática e agranulocitose. A hidroxiquinolina, na qual um dos substituintes *N-etila* da cloroquina está  $\beta$ -hidroxilado, é considerada essencialmente equivalente à molécula original. A hidroxicloroquina tem sido utilizada com êxito em lugar da cloroquina contra cepas normalmente sensíveis. Em virtude da sua menor toxicidade, a hidroxicloroquina em altas doses tem vantagem em relação à cloroquina no tratamento da artrite reumatóide e do lúpus eritematoso (TRACY, 1996).



**Figura 8 – Amodiaquina**

A cloroquina não possui atividade significativa contra as fase teciduais exoeritrocitárias dos plasmódios, não é profilático causal, é eficaz para formas eritrocitárias assexuadas de *P. vivax* e cepas sensíveis de *P. falciparum* e também contra os gametócitos de *P. vivax*.

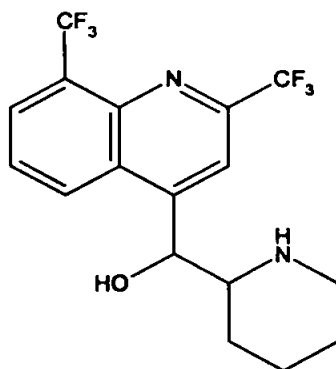
A cloroquina é bem absorvida, sendo cerca de 90% pelo trato gastrintestinal, e rápida absorção intramuscular ou subcutânea. Distribuí-se de modo lento devido à sua sequestração pelos tecidos como baço e fígado. O principal metabólito atinge concentrações plasmáticas de 20 - 35% das concentrações do composto original. A eliminação de 50% e 20% corresponde a cloroquina inalterada e seu metabólito monodesetilcloroquina (TRACY, 1996).

Não tem valor profilático nem radicalmente curativo nas infecções causadas por *P. vivax*. Resolve ataques agudos. Utilizada por longo prazo, atua como agente supressor e, ao se suspender a medicação, podem ocorrer recidivas. É eficaz em ataques agudos de cepas sensíveis de *P. falciparum*. É o fármaco de maior utilidade, sobretudo naquelas regiões onde existem cepas de *P. falciparum* que são sensíveis a cloroquina (TRACY, 1996).

### **Mefloquina**

A mefloquina (figura 9), é derivado 4-quinolinometanólico estruturalmente relacionado com a quinina. Devido à sua grande atividade em modelos animais, foi um dos compostos escolhidos entre mais de 300 derivados quinolínicos testados pelo Instituto Walter Reed, financiado pelo Exército Americano, durante a Segunda Guerra Mundial. Era empregada com o objetivo de atacar as espécies de *P. falciparum* resistentes aos

fármacos existentes. Este fármaco foi introduzido no mercado, em 1985 pela F. Hoffmann-La Roche com o nome de Lariam<sup>®</sup>. É, provavelmente, um dos mais estudados entre os compostos antimaláricos. Embora não tenha efeito sobre os gametócitos maduros, a mefloquina é agente efetivo contra as etapas intraeritrocíticas e pré-eritrocíticas do ciclo de vida do *Plasmodium* (COOK, 1996; GULATI *et al.*, 1996; GOLDMAN, 2000).



**Figura 9 - Mefloquina.**

Infelizmente, já são relatados casos de resistência. Entre os fatores que causam, podem ser citados:

- Alterações no alvo do fármaco:

Os parasitas têm genomas extremamente complexos, possuindo facilidade em alterar seu metabolismo nos microambientes de diferentes hospedeiros. Este fato dificulta o estudo dos mecanismos exatos de ação dos fármacos antimaláricos no metabolismo do parasita.



- Diminuição na capacidade de acumular o composto ativo: evidências indicam que as espécies de *P. falciparum* resistentes acumulam menos fármaco (ADAM, 1989).
- Tratamento terapêutico com uso indiscriminado e muitas vezes até incompleto.

Na administração oral, absorção é rápida e 98% ligam-se às proteínas plasmáticas, obtendo concentrações plasmáticas em poucas horas. A meia-vida de eliminação é de 2 semanas (DESJARDINS *et al.*, 1979; KARBWANG *et al.*, 1987). A eliminação ocorre principalmente nas fezes e uma quantidade muito pequena pela urina. É utilizada no tratamento e prevenção por *P. falciparum* resistente à cloroquina.

### PRIMAQUINA

A primaquina, (figura 10), foi o primeiro antimalárico 8-aminoquinolínico a ser introduzido na medicina. Outros derivados foram examinados na tentativa de se descobrir compostos mais potentes e menos tóxicos do que a própria primaquina. O principal objetivo dos novos derivados era a redução da toxicidade sem diminuição concomitante da atividade antimalárica (TRACY, 1996).

O grande valor clínico da primaquina consiste no tratamento curativo da malária por *P. vivax*, em situações em que o tratamento com cloroquina tenha se revelado insatisfatório.

A pentaquina, isopentaquina e a primaquina são três fármacos que foram selecionados para estudos mais aprofundados. A primaquina é mais

---

utilizada agora. Como principais sintomas tóxicos podem ser citados: metemoglobinemia, leucopenia, dor de cabeça, dores abdominais e o mais grave é a anemia hemolítica aguda, nos pacientes deficientes em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), (TRACY, 1996).

A primaquina é altamente ativa contra as formas exoeritrocitárias primárias de *P. falciparum*. É quase sempre usada em associação com um esquizontocida sanguíneo. As 8-aminoquinolinas exercem efeito gametocida acentuado contra as quatro espécies de plasmódios que infectam o homem, em especial o *P. falciparum*.

É usada para a cura radical da malária por *P. vivax* e outras malárias recidivantes. Se for administrada durante um longo período latente da infecção, a cura radical pode ser alcançada. Deve ser administrada sempre em associação com doses eficazes da 4-aminoquinolína esquizontocida, a cloroquina, a fim de reduzir a possibilidade de aparecimento de resistência ao fármaco. Também pode ser usada com uma 4-aminoquinolína para profilaxia ou para interromper a transmissão, em especial do *P. falciparum*.

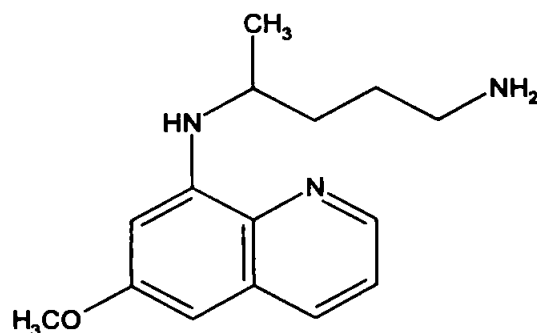
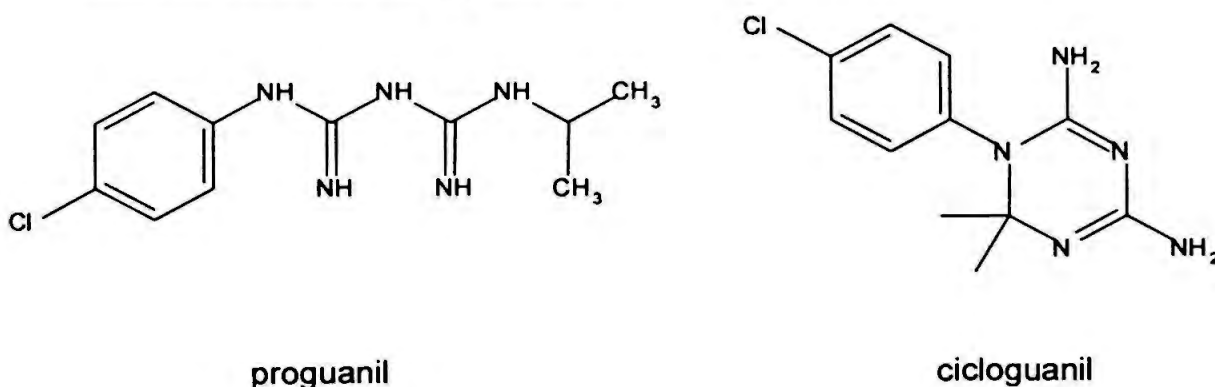


Figura 10 – Primaquina.

## Proguanil

Proguanil é derivado da biguanida, que surgiu em 1945 como produto da pesquisa antimalárica britânica. Nos mamíferos, o composto atua como bioprecursor convertido em metabólito triazínico cíclico, cicloguanil, que atua como inibidor da diidrofolato-redutase dos plasmódios (TRACY, 1996).

Seu uso como antimalárico profilático seguro e bem modelado é seriamente comprometido pelo desenvolvimento de cepas de *P. falciparum* resistentes ao proguanil. Todavia, houve interesse renovado por esse fármaco, sobretudo para profilaxia de cepas de *P. falciparum* na África subsaariana, que são resistentes à cloroquina, pirimetamina e sulfadoxina (FOGH *et al.*, 1988). Além disso, as pesquisas desse fármaco e de seu metabólito ativo, cicloguanil, abriram o campo para o desenvolvimento de outros inibidores antimaláricos da diidrofolato-redutase. Tais pesquisas também podem levar à descoberta de compostos que atuam sobre outros estágios dos parasitas da malária.



**Figura 11 - Proguanil e de seu metabólito cicloguanil.**

O proguanil apresenta maior margem de segurança entre grande série de análogos plasmocida da biguanida examinados. A substituição de halogênios nas posições 3 e 4 do anel benzenico produz a clorproguanil (LAPUDRINE), que é um pró-fármaco mais potente do que o proguanil, também utilizado em clínica.

O proguanil possui atividade profilática causal e supressora na malária por *P. falciparum*; controla adequadamente o ataque clínico agudo e em geral, erradica a infecção. O fármaco tem atividade supressora contra infecções causadas por *P. vivax* e controla o ataque clínico agudo. Não é totalmente profilático porque não afeta o estágio exoeritrocitário dessa infecção. Além disso, as formas eritrocitárias de *P. vivax* quase sempre reaparecem no sangue pouco depois da suspensão de doses supressivas de proguanil. Sua ação sobre a forma eritrocitária de todos os parasitas da malária é lenta, em comparação com a das 4-aminoquinolinas.

Os gametócitos não são destruídos, mas o fármaco impede geralmente o desenvolvimento dos gametas fertilizados encistados na parede intestinal do mosquito. O proguanil e a quinina não atuam de modo sinérgico para prevenção da recidiva da malária causada por *P. vivax*, em contraste com a associação de quinina com um antimalárico, exemplo: primaquina (8-aminoquinolínico).

Absorvido lentamente, pelo trato gastrintestinal, alcança concentração máxima plasmática em 5 horas. A meia-vida de eliminação plasmática é cerca de 16 a 20 horas. Cerca de 30% e 23% de seus metabólitos triazínico e a 4-clorofenilbiguanida inativa permanecem no plasma (BYGBJERG *et al.*, 1987). A eliminação no homem é cerca de 40% a 60%, seja do fármaco original ou de seu metabolito ativo.

Atualmente é utilizado como alternativa à pirimetamina e sulfadoxina na profilaxia em longo prazo da malária resistente à cloroquina por *P. falciparum*.

### Artemisinina e seus derivados

A planta *Artemisia annua* (ginghao) foi utilizada pelos chineses como antipirético por séculos. Por volta dos anos 60 o *Plasmodium falciparum* começou a apresentar resistência a cloroquina, o que levou os chineses a trabalhar na identificação de alguns compostos da mencionada planta que fossem eficientes (MURKHERJEE, 1991, POSNER, 1994/1996).

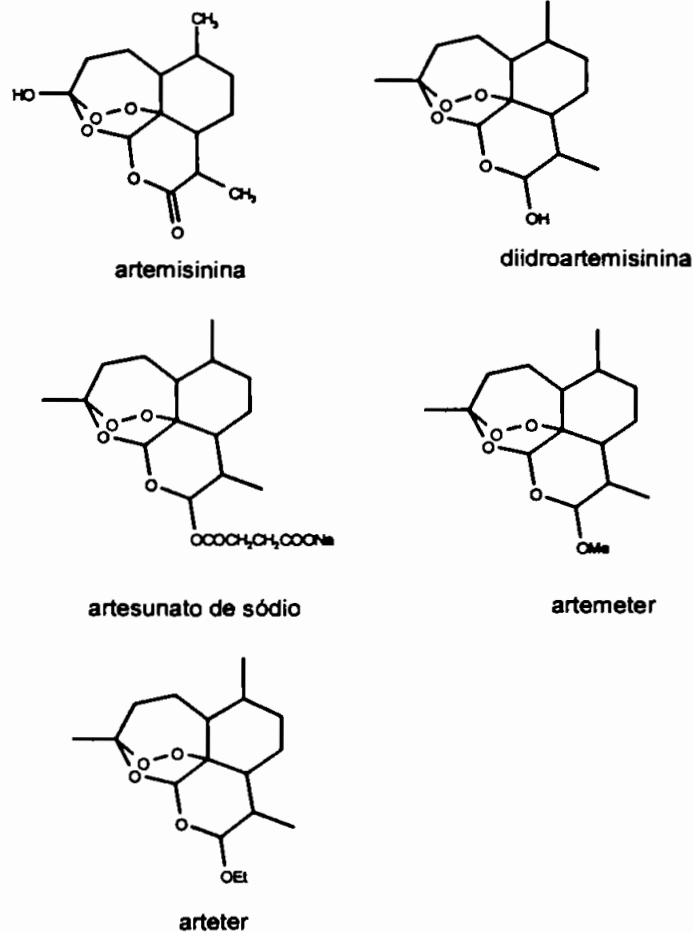
Em 1972, finalmente, no Instituto Chinês de Estudos Médicos a artemisinina ou *qinghaosu* (figura 12) foi isolada, sendo que a atividade antiprotozoária deve-se à 1,2,4 trioxano sesquiterpenolactona não alcalóidica (CUMMING, 1997, BARREIRO E FRAGA, 2001).

Depois da descoberta da artemisinina como antimalárico potente, promissor nas fases sangüíneas do *P. falciparum*, e suas espécies resistentes *in vitro* e *in vivo*, vários estudos foram efetuados com animais e em humanos (FISHWICK, 1995).

Ensaio clínico feito na China mediante administração oral e parenteral, em mais de 2000 casos de pacientes com malária, dos quais 1511 infectados com *P. vivax* e 558 casos *P. falciparum* e outros por que apresentavam resistência à cloroquina e 141 casos com malária cerebral, mostraram resultados alentadores (MURKHERJEE, 1991).

Os ensaios realizados foram considerados eficazes nas formas eritrocíticas assexuadas, sem provas nas formas tissulares. Dentre os

derivados da artemisinina, o primeiro sintetizado foi a diidroartemisinina. Seguiram-se o artesunato de sódio, artemeter e arteter.



**Figura 12- Artemisinina e derivados.**

Durante os ensaios clínicos o fármaco foi utilizado na forma de comprimidos, suspensão oleosa e aquosa devido à pouca hidrossolubilidade, que apresentava. Os pacientes foram clinicamente curados e a temperatura foi normalizada. Possui baixa toxicidade. É bem

tolerado pelo homem, absorvido com rapidez, obtendo-se concentração plasmática máxima em 1 hora. A meia-vida é de 4 horas (KLAIMAN, 1985).

Estudo mostrou que a artimisinina e seus derivados são esquizonticidas sanguíneos e não apresentam toxicidade significativa nos pacientes testados, sendo eficaz contra *P. vivax* e cepas de *P. falciparum* sensíveis ou resistentes à cloroquina (MESHNICK, *et al.*, 1996).

Nos ensaios realizados em ratos, o artemeter e o arteter mostraram neurotoxicidade e efeitos cardíacos, durante duas semanas. Em cães, as disfunções neurológicas permaneceram por uma semana. Foi verificado em estudos posteriores *in vitro*, que estes derivados inibiam a proliferação neuronal e provocaram neurite em concentração de 10 nM. Outra série de estudos realizados em macacos mostraram 75% de anomalias cardíacas. Foram relatados efeitos teratogênicos em ratos após administração do fármaco durante a primeira metade da gestação (WESCHE *et al.*, 1994; FISHWICK *et al.*, 1995; BHAREL *et al.*, 1996; CUMMING, 1997).

Os derivados são usados em tratamentos clínicos financiados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na forma de injeções. Dessa forma, no Brasil, organismos governamentais, como a SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias, para o Estado de São Paulo - são encarregados da implementação de esquemas de combate à doença (PACHECO, 1998).

### **3.7. Esquema de tratamento da malária no Brasil**

No Brasil, assim como em todas as regiões sujeitas à malária, a terapêutica da malária, a resistência dos parasitas aos fármacos e a

implantação de esquemas terapêuticos de fácil operacionalização, requerem constante atenção de todos que atuam no controle dessa endemia (WHO, 1993, GREENWOOD, 1995, PACHECO, 1998).

Além disso, a escolha da medicação mais indicada, a via de administração e a duração do tratamento devem levar em consideração as seguintes particularidades: a gravidade da infecção e as condições particulares do hospedeiro, em especial idade, imunidade prévia à malária e a condição de gestação.

O objetivo imediato do tratamento é abolir o ciclo de reprodução sanguínea do parasita, responsável pelas manifestações clínicas agudas e eventuais complicações. Além disso, o tratamento visa impedir as recidivas da infecção e eliminar os gametócitos, afetando a cadeia de transmissão da parasitose.

Portanto, das discussões realizadas com técnicos da Fundação Nacional da Saúde, da Organização Mundial da Saúde, da Organização Panamericana da Saúde, do Instituto Evandro Chagas, do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, Universidade de São Paulo e Universidade do Estado de São Paulo surgiram propostas de esquemas de tratamento como, por exemplo, o detalhado no Manual de Terapêutica de Malária, da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, São Paulo, 1998.

### **3.8. Medidas de controle**

Podemos afirmar que as medidas de controle da malária são as mesmas tanto para os países desenvolvidos como para os em desenvolvimento (WHO, 2000).



Existem algumas diretrizes gerais para o controle da malária. A diretriz universal e rápida é identificar o paciente com malária e proporcionar o tratamento.

Uma vez identificado o paciente com suspeita de malária mediante sinais e sintomas, fazer o diagnóstico laboratorial, aplicação do tratamento dirigido para o diagnóstico em questão, considerando alguns fatores, como o sócio-econômico, educativo e terapêutico. Direcionar o tratamento de acordo com as condições do paciente, enfatizando a importância do cumprimento deste e garantindo a distribuição adequada dos diferentes fármacos.

Por outro lado, outra medida de controle é o apoio à estruturação dos sistemas locais de Saúde, para alcançar objetivos e metas propostas como: identificar, localizar e capacitar as equipes existentes para atuarem em áreas rurais, orientar os profissionais de Saúde no sentido de nova prática educativa, compromisso e ação no atendimento à comunidade considerando os doentes de malária de rotina das unidades de saúde, ampliar a participação ao planejamento das ações e adoção das medidas preventivas.

### **3.9. Resistência**

Resistência é a capacidade que os parasitas de uma cepa adquirem para sobreviver e multiplicar-se além da administração e absorção de um medicamento em doses iguais ou superiores aos que se prescrevem habitualmente, compreendidas dentro dos limites da tolerância do paciente, esta definição foi desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde em versões de 1965, 1973 e 1986 ( BRUCE-CHWATT, 1986).

A resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos constitui-se em obstáculo para os programas de controle. No Brasil, a resistência à quinino foi relatada pela primeira vez por Couto, em 1908. O uso da combinação de quinino mais tetraciclina mostrou a superioridade deste esquema em relação ao quinino isolado (BOULOS *et al.*, 1986).

Em 1997, Segurado *et al.*, relataram resposta RIII (grau de resistência de acordo com o sistema de gradação, ou seja, é a falta da redução notável da parasitemia assexuada com o uso de quinino isolado). A resistência a outros antimaláricos na Amazônia brasileira está amplamente documentada. Inicialmente, foi descrita por Almeida, em 1951 e Rodrigues, em 1961 a falha terapêutica com o uso de cloroquina em infecções por *P. falciparum*. Mais tarde, os dados sobre resistência *in vivo* mostraram alta resistência do *P. falciparum* à cloroquina, impossibilitando sua utilização (ALECRIM, 1986; SEGURADO *et al.*, 1997).

A resistência do *P. falciparum* aos antifolatos no Brasil foi descrita por Almeida Netto *et al.*, em 1972, Alecrim *et al.*, em 1982, e Boulos *et al.*, em 1986. A análise molecular do gene da diidrofolatoredutase de *P. falciparum* (PETERSON *et al.*, 1991) corroborou com os achados *in vivo*. Isolados de *P. falciparum* resistentes à mefloquina têm sido detectados em estudos *in vitro* (ALECRIM, 1986; VASCONCELOS, ROSÁRIO, 1983; DI SANTI *et al.*, 1987/1988) e *in vivo* (BOULOS *et al.*, 1986; NORONHA *et al.*, 2000).

### 3.10. Profilaxia

A profilaxia da malária com uso de quimioterápicos é pouco recomendada, pois as dosagens preconizadas podem não ser eficazes na

prevenção da doença. Além disso, os efeitos colaterais observados em alguns casos sugerem a avaliação do custo-benefício quanto ao uso de quimioprofilaxia. Mais ainda, o uso continuado de dosagens subterapêuticas favorece o aparecimento de cepas resistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994, DURRHEIM, 2000).

Medidas individuais de proteção para evitar o contato com mosquitos transmissores são aconselhadas.

Entre elas podemos citar:

- aplicação de repelente com dietiltoluamida (DEET) nas partes expostas do corpo;
  - ingestão de complexo B ou cápsulas de alho, que repelem os mosquitos mediante o odor exalado com a transpiração. Este fato carece de comprovação científica;
  - dormir em locais protegidos por telas;
  - usar mosquiteiros impregnados com inseticidas (com os piretróides) são preconizadas;
  - é fundamental evitar estar fora de moradias, principalmente durante o amanhecer e o anoitecer, períodos de maior atividade dos mosquitos;
  - utilizar roupas claras de mangas compridas;
  - utilizar inseticidas contendo permetrina, deltametrina ou outros piretróides, na forma de spray, pastilhas ou outros.
-

### 3. 11. Vacina

O desenvolvimento de vacinas eficazes representa um dos caminhos mais promissores em prover intervenções com custo-efetivo contra doenças tropicais. Ainda que progresso considerável tenha sido feito na última década, em entender os mecanismos imunes, identificar antígenos candidatos à vacina e demonstrar a prova do princípio em modelos animais, poucos candidatos a vacinas progrediram até um ensaio clínico (WHO, 2000).

A primeira tentativa de desenvolver uma vacina foi efetuada mediante purificação de três proteínas derivadas de merozoítos de *P. falciparum*. Estudos recentes demonstraram baixa imunogenicidade em relação à vacina, a qual induzia somente uma resposta humoral temporária de 6 meses. Além de criar controvérsia, tornou-se valiosa experiência para condução de estudos futuros na procura de uma vacina efetiva, que possa provocar uma resposta imune, nas diferentes etapas da infecção (WHO, 1999).

Atualmente, pesquisadores da Universidade de Oxford, na Inglaterra, desenvolveram uma vacina para combater a malária. Esta vacina foi feita de fragmentos do DNA do plasmódio. Testada com sucessos em voluntários infectados com malária na Inglaterra, será posteriormente testada na África. Esta informação foi dada pelo Prof. Dr. Marcos Boulos, infectologista e diretor do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, através do site: [www.revistasaude.com.br](http://www.revistasaude.com.br).

---

### **3.12. Planejamento de fármacos**

#### **3.12.1. Introdução de novos fármacos**

Os pesquisadores têm-se dedicado na busca de novos agentes terapêuticos, a ponto de hoje, existir quantidade enorme de medicamentos que vão dos anti-histâmicos e antiespasmódicos aos ganglioplégicos, miorelaxantes e barbitúricos (STELLA, 1985; KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 1996; FERREIRA, 1999; BARREIRO, 2001) .

Atualmente, o esforço científico está canalizado para o ensaio e a síntese de novos agentes antiinfeciosos, agentes antineoplásicos, agentes cardiovasculares, fármacos para sistemas endócrinos e os que atuem no sistema nervoso central.

Diversas estratégias são conhecidas para a introdução de modificações estruturais em um composto protótipo, com o intuito de melhorar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas

A introdução, retirada e modificação de grupos químicos partindo de um protótipo ativo conhecido com a finalidade de melhorar suas propriedades terapêuticas, é recurso prático de grande utilidade. Dentre estes métodos destaca-se especialmente o bioisosterismo.

O método da modificação molecular é método de planejamento em que, à partir de uma substância com atividade reconhecida, empregada ou não na terapêutica, efetuam-se em sua estrutura, modificações químicas, obtendo-se derivados com propriedades físico-químicas diferentes, que conferem atividades terapêuticas modificadas ou superiores em relação à

---

substância de partida. Inúmeros fármacos foram obtidos desta forma para a obtenção de moléculas com atividade contra cepas de *Plasmodium* resistentes aos fármacos utilizados na quimioterapia da malária (KOROLKOVAS, 1988, BARREIRO, 2001).

### 3.12.1.1. Gênese de fármacos

Os processos principais de introdução de novos fármacos na terapêutica são:

#### 3.12.1.1.1. Acaso

É o acaso que, na lide constante de vários profissionais da área médico-laboratorial, tem resultado na introdução de vários fármacos. Os exemplos se sucedem. A fenilbutazona era indicada, apenas, com agente solubilizante da aminofenazona mas, resultados como antiinflamatório, antipirético e analgésico foram notados. Com os médicos, Cahn e Hepp, em 1886, em Strasbourg, o acaso aconteceu quando, uma prescrição de naftaleno para tratamento de parasitose intestinal foi aviada como acetanilida e causou redução da temperatura do paciente. Foi Alexander Fleming, em 1929, que registrou a ação antibacteriana da penicilina-G em uma cultura de bactérias contaminada por fungo, reconhecida por volta de 1930 (BARREIRO, 2001).

Janbon e colegas, em 1942, com suas observações da carbutamida no tratamento da *diabetes mellitus*, propiciaram o desenvolvimento das sulfoniluréias como um agente de hipoglicemiante por via oral.

Em 1955, Stone e colegas descobriram que a mecamilamina, prevista para agir contra a hipertensão era, na verdade, eficiente como hipotensor. Hald e Jacobsen, em 1948, pesquisando novos anti-helmínticos descobriram

a ação positiva do dissulfiram contra o alcoolismo. Boismaré, farmacêutico de Rouen, usava, até antes de 1949 a piperazina no tratamento da gota, notou sua eficiência como anti-helmíntico.

Foi Kuhn, em 1958, enquanto investigava novos hipnóticos da classe dos análogos de fenotiazina, quem descobriu que a imipramina age como antidepressivo. O desenvolvimento dos inibidores da MAO é resultado das observações de Fox, em 1952, sobre as propriedades antidepressivas da iproniazida enquanto analisava sua eficiência como agente tuberculostático.

Sprague e Beyer, em 1958, produziram a clorotiazida, o primeiro membro das tiazidas e hidrotiazidas que são duas classes de diuréticos administrados por via oral, durante uma síntese orgânica para obter novos compostos relacionados com a diclorfenamida, inibidor da anidrase carbônica usado como diurético. As tentativas de formular um derivado aminado da diclorfemamida 5-cloro-2,4-dissulfamoilanina, sem êxito, mas levaram à clorotiazida (KOROLKOVAS, 1988).

O acaso levou Leo H. Sternbach e colaboradores, ao clordiazepóxido que é o primeiro membro dos agentes ansiolíticos benzodiazepínicos. Foi durante uma pesquisa sobre um composto químico diferente, com ação de tipo diverso que chegaram à clordiazepóxido cujas propriedades sedativas miorreloxantes e anticonvulsivantes semelhantes às dos barbitúricos são agora utilizadas para o alívio da tensão, apreensão, ansiedade, angústia e outros sintomas das neuroses (STERNBACH, 1990).

### 3.12.1.1.2. Triagem empírica

É neste processo que todas as substâncias químicas disponíveis são submetidas a uma variedade de ensaios biológicos na esperança de que algumas manifestem atividade útil. Nota-se que é um processo extremamente trabalhoso e nem sempre recompensador. Podemos citar como exemplo o fato de que um fármaco novo resulta, em média, de 200.000 compostos novos, enquanto que para introduzir um novo anticonvulsivante é necessária a submissão de 500.000 compostos químicos à triagem (KOROLKOVAS, 1988).

Spinks afirma que 400.000.000 de compostos são exigidos para a introdução de um antineoplásico, ou seja, 80 vezes o número de substâncias conhecidas. Esta quantidade pode sugerir um absurdo, já que, em clínica apenas 40 compostos são usados como antineoplásicos; porém nenhum deles é tão eficiente como o são os antibióticos nas infecções bacterianas.

A triagem empírica *racionalmente dirigida* é uma outra vertente deste método. Existem alguns exemplos de sua utilização como: na busca por novos antibióticos, por volta de 1940, oriundos de diversos microorganismos e plantas superiores gerando centenas de antibióticos mas, somente, menos de cem são usados; durante a Segunda Guerra Mundial, este método foi usado na busca de novos antimaláricos, de mais de 14.000 compostos usados poucos foram selecionados para ensaios clínicos. Outro exemplo é o do uso deste método para o isolamento e identificação de produtos do metabolismo de medicamentos, como é o caso da acetanina e fenacetina que são metabolizados a paracetamol, que exerce a principal ação analgésica. Nesta mesma condição podemos citar: desipramina, da imipramina; cicloguanila, da proguanila.



### 3.12.1.1.3. Extração de fontes naturais (BARREIRO,2001)

A utilização de extratos vegetais ou animais para o tratamento das mais diversas doenças é a base para uma grande variedade de medicamentos tais como: alcalóides, antibióticos, vitaminas e hormônios.

A ampla e variada arquitetura molecular que se encontra nos produtos naturais de origem vegetal pode ser vista nos terpenos, bioformados pela mesma rota biossintética geral, com diversos centros esterogênicos e possuindo apenas átomos de C, H e O.

A arquitetura molecular do tipo enantiopura é fartamente encontrada nas várias classes de produtos naturais como quinonas, alcalóides, isoflavonóides, flavonóides, lignas, neolignas, glicosídeos, cumarinas, cronomas e isocronomas.

A descoberta do AAS a partir da salicina é um dos melhores exemplos da importância dos produtos naturais na formulação de fármacos. A salicina é um glicosídeo natural de *Salix sp*, derivado do ácido salicílico e encontrado no salgueiro (*Salicaceae*). Foi este glicosídeo que permitiu a descoberta do ácido acetilsalicílico, empregado como analgésico, inclusive para uso pediátrico, com estrutura de apenas nove átomos de carbono.

A mefloquina e a cloroquina são derivados antimaláricos descobertos a partir da quinina (componente da casca da *Cinchona officinalis*), um composto-protótipo com conhecidas propriedades antitérmicas.

É importante lembrar que os derivados quinolínicos originais eram da classe 4-amino ou 8-amino-quinolinas como a cloroquina e primaquina.

E os primeiros antimaláricos descobertos possuíam em sua estrutura um sistema aza-heterocíclico, inicialmente acridínico, como a quinacrina, ou quinolínico, imitando aquele presente no protótipo natural.

A mefloquina é um derivado antimalárico descoberto no Instituto Walter Reed do exército americano, nos EUA. Tem um índice alto de similaridade estrutural com o protótipo natural, demonstrando em sua estrutura o sistema quinolinil-piperidinometanol, originado do esqueleto rubano da quinina substituído por dois grupamentos trifluormetila em C-2 e C-8. Apesar de possuir dois sítios vulneráveis aos efeitos conjugativos do metabolismo de primeira passagem —, a hidroxila benzílica e o grupamento amino secundário da subunidade piperidino-metanol—, este derivado pôde ser administrado em uma dose diária. Este aparente paradoxo metabólico resulta da natureza  $\beta$ -hidróxi-amina presente na cadeia lateral da mefloquina que por razões conformacionais protegem os sítios vulneráveis ao metabolismo, enquanto que a presença dos substituintes fluorados, protegendo o heteroátomo do anel quinilínico, asseguraram à mefloquina a posologia estratégica desejada.

A meperidina tem a estrutura caracterizada pela presença de um sistema piperdínico contido na morfina, com o carbono C-4 quaternário, ligado a um anel benzênico semelhante àquele existente em. É importante salientar que a morfina, foi o protótipo natural dos derivados 4-fenilpiperidínicos, importante classe de analgésicos centrais a que pertence a meperidina, desenvolvidos por simplificação molecular da morfina.

O etopósido foi obtido por discreta modificação estrutural da podofilotoxina, isolada de *Podophyllum peltatum*, que registrava modestas propriedades carcinostáticas.

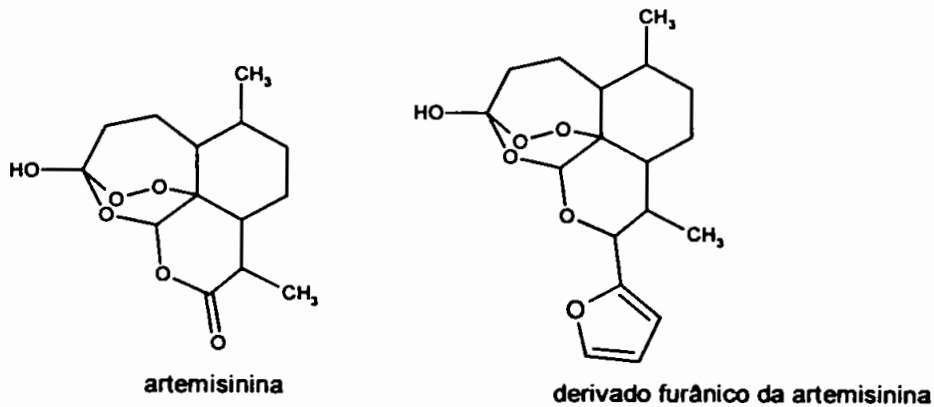
---

O etopósido é um derivado glicopiranosídico com propriedades anticâncer, particularmente útil para o tratamento de tumores de próstata e carcinomas pulmonares.

A artemisinina é um importante composto-protótipo natural, isolado da planta *Artemisia annua*, sendo outro exemplo da química da natureza. Este composto é um terpeno pentaoxigenado, com uma função endoperóxida cíclica, envolvida em um cetel, que caracteriza a subunidade trioxânica, a qual esta relacionada aos seus efeitos antimaláricos que se originam da interação de unidade peróxido com a hemina do protozoário envolvendo o Fe.

Como a artemisinina, devido a suas propriedades farmacocinéticas, apresenta dificuldades ao uso terapêutico; alguns pesquisadores buscaram alternativas. É o caso do grupo liderado pelo Prof. Gary Posner que identificaram a subunidade farmacofórica contida no sistema trioxânico como essencial à atividade observada contra cepas do *Plasmodium*, e conduziram à obtenção de substâncias ativas *in vivo*, inclusive em cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina. Os derivados epiméricos ao nível de C-10, substituídos por anéis heterocíclicos, permitiram a adequada biodisponibilidade e mostraram-se extremamente ativos.

O derivado furânico da artemisinina apresentou IC<sub>50</sub> mais efetiva que a artemisinina (IC<sub>50</sub> = 9,9 nM) na ordem de 1,4 nM, quando ensaiados *in vitro* contra cepas NF54 de *P.falciparum*, resistentes à cloroquina. Por sua vez, o isómero 2-N-metilpirrólico apresentou ED<sub>50</sub> de 0,7 mg/kg e 4,5 mg/kg, quando administrado subcutaneamente (SC) e por via oral (PO), respectivamente, em animais infectados pelo *P. falciparum*. Estes análogos sintéticos, estruturalmente relacionados à artemisinina representam os primeiros compostos trioxânicos ativos por via oral contra o mais letal agente causador da malária (BARREIRO, 2001).



#### 3.12.1.1.4. Modificação molecular

É o método mais usado e que tem apresentado mais contribuições. É conhecido como método: da manipulação molecular, da variação, mecanístico e seletivo. É o método que submete compostos com atividade biológica conhecida e comprovada a algumas alterações estruturais (KOROLKOVAS, 1988, BARREIRO, 2001).

Este método tem dois objetivos: (a) descobrir o agrupamento *farmacofórico* essencial, isto é, a característica da molécula que confere ação farmacológica ao medicamento; (b) obter fármacos que apresentem propriedades mais desejáveis que o protótipo em potência, especificidade, duração de ação, facilidade de aplicação ou administração ou manejo, estabilidade e custo de produção.

Foi Schueler quem melhor elencou as vantagens deste método registrando a maior probabilidade de os congêneres, homólogos e análogos apresentarem propriedades farmacológicas semelhantes às do protótipo do que aqueles compostos selecionados ou sintetizados a esmo; que permite e

obter produtos farmacologicamente superiores; que há a probabilidade da produção dos novos fármacos ser mais econômica; que há síntese semelhante à do protótipo, com economia de tempo e dinheiro; que os dados obtidos poderão elucidar a relação entre estrutura e atividade; e, finalmente que são empregados os mesmos métodos de ensaios biológicos utilizados para o protótipo.

#### **3.12.1.1.4.1. Processos gerais**

Para executarmos este método podemos utilizar dois processos gerais :

(a) Disjunção, dissecação ou simplificação ou dissociação molecular: é a síntese e ensaio sistemáticos de análogos cada vez mais simples do composto modelo. Estes análogos são réplicas parciais ou virtuais do fármaco protótipo. Este protótipo é geralmente um produto natural de estrutura química muito complexa.

(b) Associação molecular ou conjunção: é a síntese e ensaio de análogos cada vez mais complexos do protótipo. Esses análogos incorporam determinadas características do composto modelo ou todas elas. Distinguem-se três tipos principais de associação:

1. Adição molecular: associação de grupamentos diferentes através de forças fracas (tais como atração eletrostática e ponte de hidrogênio);
2. Replicação molecular: associação de grupamentos *idênticos* através de formação de ligação covalente; se a associação

3. or de dois grupos, teremos duplicação molecular,; se for de três, triplicação; e analogamente teremos tetraplicação, pentaplicação e hexaplicação moleculares;
4. Hibridação molecular: associação de grupamentos *diferentes* ou mistos através de formação de ligação covalente.

#### **3.12.1.1.4.2. Processos especiais**

Schueler agrupou estes processos em duas classes com as suas respectivas sub-divisões:

- a) Alterações que aumentam ou diminuem as dimensões e a flexibilidade de uma molécula. Esta classe se sub-divide em:
  - Fechamento ou abertura de anel: alguns exemplos de fármacos são: cloroquina e amodiaquina, proguanil e cicloguanil;
  - Formação de homólogos mais baixos ou mais altos: podem ser facilmente formadas séries alcânicas, polimetilênicas e ciclopolimetilênicas de homólogos. Infelizmente não é possível estabelecer regras rígidas para as propriedades farmacológicas de compostos homólogos.
  - Introdução de ligações duplas: estas podem causar dois efeitos principais:

- ✓ Modificando a estereoquímica do fármaco, poderá dar origem a composto de atividade diferente daquela apresentada pelo composto saturado;
  - ✓ Alterando as propriedades físico-químicas, pode modificar a atividade biológica.
- 
- Introdução de centros opticamente ativos: modificando-se a estereoquímica da molécula do fármaco, esta mudança pode alterar, às vezes drasticamente, sua atividade farmacológica.
  - Introdução, retirada ou substituição de grupos volumosos polares: este processo especial é usado principalmente para converter agonistas em antagonistas, e vice-versa.

b) Alterações de propriedades físicas e químicas através da introdução de novos grupos ou substituição de determinados agrupamentos por grupos diferentes, esta classe inclui os seguintes processos:

- Substituição isostérica: no planejamento de fármacos, os grupos isotéricos e bioisotéricos são extensivamente aplicados na modificação molecular de medicamentos conhecidos e no planejamento racional de antimetabólitos. A definição de isótero como sendo compostos ou grupos de átomos que têm o mesmo número e disposição de elétrons e que caracterizam-se por propriedades físicas semelhantes, foi dada por Langmuir, em 1919. Grimm, em 1925, ao introduzir sua lei relativa ao deslocamento do hidreto e com seu "pseudo-átomo" ampliou o conceito. Erlenmeyer, mais tarde, redefiniu isósteros como sendo

átomos, íons ou moléculas em que as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas”. Consideram-se como isósteros também os grupos que possuem configurações estéricas e eletrônicas semelhantes, a despeito do número de elétrons compreendidos.

A expressão “compostos que preenchem a mais ampla definição de isótero e têm o mesmo tipo de atividade biológica”, mesmo que antagônica foi resumida no termo bioisósteros criado por Friedman, em 1951 (KOROLKOVAS, 1988).

Burger, em 1970, classificou e subdividiu os bioisósteros em duas categorias: os Clássicos, que são átomos e grupos monovalentes, divalentes, trivalentes, tetravalentes e anéis equivalentes; e os Não-Clássicos, que são os grupos interconversíveis.

Em 1991 redefiniu isósteros como “compostos ou grupos de átomos que possuem formas e volumes moleculares quase iguais, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons e que exibem propriedades físicas similares”.

---



**Tabela I – Grupos de bioisósteros**

**Clássicos**

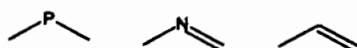
Monovalentes

F, OH, NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>

Bivalentes



Trivalentes



Equivalentes anelares



**Não-Clássicos**

Hidroxila

OH, CH<sub>2</sub>OH, NHCOR, NHSO<sub>2</sub>R, NHCONH<sub>2</sub>, NH

Carbonila

CO, C=C(CN)<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NR, CONRR', =CHCN

Carboxila

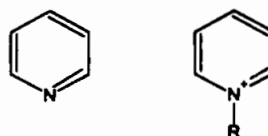
CO<sub>2</sub>H, SO<sub>2</sub>NHR, SO<sub>3</sub>H, PO(OH)NH<sub>2</sub>, CONHOH



Halogênios

Cl, CF<sub>3</sub>

Piridina



Grupos espaçantes



A análise minuciosa dos aspectos físico-químico, eletrônicos e químicos envolvidos contribui para o correto uso do bioisosterismo e, para a estimativa do comportamento das propriedades físico-químicas da nova substância bioisostérica.

Existem diversos fatores que devem ser considerados quando de uma substituição bioisostérica, como: a reatividade química dos grupos funcionais ou subunidades estruturais bioisostéricas, com intenção de antecipar as alterações importantes nos processos de biotransformação, referente às possíveis alterações da toxicidade relativa dos metabólidos principais; o grau de solubilidade lipídica e aquosa, de forma, a possibilitar a previsão da alteração das propriedades físico-químicas  $pK_a$ ; os fatores conformais inclusive a capacidade diferencial de formação de ligações-H inter ou intramoleculares; e o tamanho, volume e a distribuição eletrônica dos átomos ou o grau de hibridação, polarizabilidade, ângulos de ligação e efeitos indutivos e mesométricos.

Como exemplo de alterações de solubilidade lipídica-aquosa e da reatividade química temos o exemplo de bioisosterismo clássico, na substituição bioisostérica de um grupo  $-OH$  por um  $-NH_2$  -. Aqui, se for considerada esta troca bioisostérica em um grupo aromático como o da anilina *versus* fenol veremos que é importante a alteração de  $pK$ , deixando claro que a característica farmacocinética dos bioisósteros será diferente.

Porém, um exemplo marcante da substituição isostérica envolvendo os grupamentos  $OH/NH_2$  pode ser encontrado no desenvolvimento de derivados arilsulfonamídicos com propriedades semelhantes às catecolaminas. Este exemplo representa o bioisosterismo não-clássico envolvendo grupamentos monovalentes.

---

O que temos é uma metilsulfonamida funcionalizada, com semelhança estrutural com a dopamina, diferenciando-se apenas devido a presença do grupamento monovalente  $-NHSO_2CH_3$ , que substitui o anel aromático regioequivalente ao grupamento OH. Assim, devido a constatação de atividades biológicas comparáveis em ambos podemos considerá-los autênticos bioisósteros.

É importante salientar que embora grupamentos envolvidos possam ser considerados bioisostéricos, a atividade relativa dos compostos resultantes se modifica drasticamente. Por esta razão, entre outras, uma substituição bioisostérica efetuada com sucesso em uma série não obrigatoriamente terá o mesmo êxito em uma outra série terapêutica.

O isosterismo e o bioisosterismo são utilizados para alterar a estrutura de compostos biologicamente ativos, uma vez que, não é possível a utilização do isosterismo puro. É desta forma que são produzidos equivalentes de produtos naturais, parametabólitos, paravitaminas, parahormônios e miméticos e, também, seus antagonistas, antimetabólitos, antivitaminas, anti-hormônios e líticos.

O isosterismo tem permitido avanços positivos nos derivados de colina, barbitúricos, penicilina, cloranfenicol, meprobamato, inseticidas e, já existem estudos de substituir o C por Si em alguns fármacos.

- Mudança de posição ou orientação de certos grupos: a posição de certos grupos é às vezes essencial para uma dada atividade biológica. Por exemplo, dos três isômeros do ácido hidroxibenzóico somente o o-hidroxi é ativo, porque pode formar ponte de hidrogênio intramolecular e, deste modo, agir como quelante;
-

- Introdução de grupamentos alquilantes: estes grupamentos, quando bem posicionados, permitem ação prolongada aos fármacos devido à formação de ligação covalente com um grupamento apropriado no local de ação;
- Modificações no sentido de inibir ou promover estados eletrônicos diversos: alguns grupos químicos geram efeitos eletrônicos chamados de *indutivos* e *conjugativos*. Tais efeitos alteram a atividade biológica.

Os *efeitos indutivos ou eletrostáticos* resultam de migrações eletrônicas ao longo de ligações simples, devido a eletronegatividade. Dessa forma, temos os grupos que exercem efeitos indutivos negativos ou aceptadores de elétrons, ou seja, atraem elétrons mais fortemente que o hidrogênio; e aqueles de efeitos indutivos positivos ou doadores de elétrons, ou seja, que atraem menos o hidrogênio. A intensidade dos efeitos indutivos é que permite ordenar de forma crescente ou decrescente os grupos ou átomos.

Os *efeitos conjugativos ou de ressonância* resultam da alta mobilidade e delocalização dos elétrons  $\pi$  e ocorrem nos compostos que possuem ligações duplas conjugadas. Quando há o aumento da densidade eletrônica de um grupo nos sistemas conjugados apresentam caráter +R, quando diminuem tal densidade, caráter – R.

#### **3.12.1.1.5. Exploração de efeitos colaterais**

A exploração dos efeitos colaterais de fármacos através de modificação molecular adequada possibilita a descoberta de novos fármacos (KOROLKOVAS, 1988).

Os exemplo são inúmeros mas, o mais significativo é o caso das sulfas. A modificação da estrutura das sulfas que manifestaram outra atividade além da antibacteriana da primeira sulfa, redundou em muitos novos fármacos: antimaláricos como a proguanila, diuréticos como as tiazidas, antidiabéticos como a sulfoniluréias, antibacterianos como as sulfas, hansenostáticos como as sulfonas, antitireóideos como a tiamazol e agentes para o tratamento da gota como a probenecida.

#### **3.12.1.1.6. Ensaio de produtos intermediários**

Em razão da similaridade dos produtos intermediários com o produto final, é que se recomenda ensaiar os intermediários e foi, a partir daí, que se descobriu novos fármacos. Como exemplo podemos citar a isoniazida, utilizada como tuberculostático, a qual é resultante da síntese de tiosemicarbazonas.

#### **3.12.1.1.7. Análogos, Pró-Fármacos e Latenciação de fármacos**

Apesar de possuírem estrutura semelhante aos fármacos protótipos, os análogos e pró-fármacos diferem destes no âmbito das propriedades biológicas (potência, espectro de ação, índice terapêutico e biodisponibilidade). Em geral, apenas isómeros presentes no fármaco matriz é que tornam um análogo diferente de um fármaco protótipo. Porém o

---

análogo tem sua atividade farmacológica baseada em características próprias.

O pró-fármaco, também chamado de derivado reversível ou bio-reversível de fármacos, é derivado de fármaco conhecido e provado, derivado este que em razão de suas propriedades físico-químicas melhoradas, aumenta a biodisponibilidade do referido fármaco e que, mediante processo enzimático ou químico, é transformado no fármaco primitivo, antes de atingir o seu local de ação ou no local de ação. São exemplos de pró-fármacos: a triacetina, obtida por tratamento do ácido acético com glicerol; e a metenamina, sintetizada a partir do formol e da amônia (KOROLKOVAS, 1988).

A latenciação de fármacos é o nome do processo de obtenção do pró-fármaco que é, na verdade, a conversão - via modificação química - de um composto biologicamente ativo em forma de transporte inativa que, após ataque enzimático ou químico, liberta o fármaco ativo.

Vários fármacos apresentam grupos modificáveis por reações químicas, produzindo grupos reversíveis. O uso do pró-fármaco tem como objetivos mais importantes:

- a) **Alteração da farmacocinética do fármaco *in vivo* a fim de melhorar a sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção:** é comum a alteração da farmacocinética visando prolongar ou abreviar a ação de um fármaco. Para o prolongamento utiliza-se a esterificação ou amidificação, formação de complexos, formação de sal e formação de polímero. Na abreviação é mais comum a substituição de um grupo estável por um lábil.

- b) **Melhoria da biodisponibilidade** : entre os modos de melhoria da biodisponibilidade temos: aumento da hidrossolubilidade, localização do fármaco e regulação do transporte.
- c) **Aumento da estabilidade**: como vários fármacos tem vida curta, e podendo sofrer alterações as mais diversas, a transformação deles em pró-fármacos pode aumentar sua estabilidade;
- d) **Auxílio à formulação farmacêutica**: na busca por tornar os medicamentos mais palatáveis, indolores, menos irritantes do ponto de vista gastrointestinal, também, preparam-se pró-fármacos;
- e) **Diminuição da toxicidade e dos efeitos colaterais**: este é um item em que os pró-fármacos são muito utilizados.

#### **3.12.1.1.8. Planejamento racional (KOROLKOVAS,1988)**

O planejamento racional de fármacos tem o objetivo de, através da implementação de ações organizadas, encontrar novas substâncias químicas que possam contribuir para com a medicina na cura, prevenção e no restabelecimento da saúde física ou mental dos indivíduos.

O caminho na busca de fármacos que tenham ação farmacológica específica é árduo. Os registros mostram que é de 3.000 para 1 o índice de sucesso na formulação de novos fármacos após as etapas de síntese e ensaio, que envolvem este processo.

Schueler, diz que os profissionais que se envolvem no planejamento racional de fármacos têm características pessoais que, por vezes, os assemelham aos artistas e outras aos religiosos. Dos artistas o sentido de

---

compor uma visão significativa e elegante do mundo para o olho mental; e dos religiosos pela motivação por sua busca do mistério da natureza. Porém, diferente dos citados, o pesquisador precisa ser extremamente objetivo. Outra característica deste profissional é a de a partir de conjecturas abstrair a verdade.

As possibilidades de sucesso dos pesquisadores estão, também, ligadas ao conhecimento profundo de várias ciências como a Química Bioquímica, Biologia Clássica e Molecular, Fisiologia, Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Farmacologia Clássica, Molecular e Quântica.

O conhecimento obtido através de uma variedade de aspectos contribui para o planejamento racional de fármacos. É de grande importância a informação de local e mecanismos de ação dos fármacos aos níveis molecular e submolecular e que as relações qualitativas e quantitativas entre estrutura química e atividade biológica são dados significativos no processo.

Saber sobre os receptores de fármacos e sua topografia, são itens relevantes, bem como o modo de interação fármaco-receptor e os efeitos de grupos químicos específicos. Os efeitos farmacológicos de grupos químicos específicos e os parâmetros físico-químicos relacionados com a atividade dos fármacos: hidrofóbicos, estéricos e eletrônicos (empíricos e semi-empíricos) conjugados às diferenças citológicas, bioquímicas e outras, entre mamíferos e parasitos, quando se cogita de novos quimioterápicos revelam-se informações extremamente importantes.



### 3.13. Compostos $\beta$ -dicarbonílicos

Este item busca demonstrar a importância dos  $\beta$ -dicarbonílicos não só pela sua utilidade no processo de alquilação de uma nova substância mas, que isto pode ser feito através de um composto acessível e de baixo impacto econômico como o acetoacetato de etila (MARVEL, 1948).

A alquilação destes compostos se dá por meio da geração de carbânions, os quais possuem alta reatividade. Na presença de substratos alquilantes que possuam bons grupos abandonadores, tais carbânions atuam como fortes nucleófilos, levando à conseqüente formação do produto alquilado desejado. No entanto, a posição destas alquilações irá variar de acordo com a facilidade de retirada de hidrogênios desta estrutura, isto é, com a acidez dos diferentes hidrogênios ácidos na posição 2, devido à presença das carbonilas.

Assim as alquilações são favorecidas nesta posição. Dessa forma, os hidrogênios entre as carbonilas do acetoacetato de etila são facilmente removidos pelo emprego de uma base como etóxido de sódio.

É possível alquilar o acetoacetato de etila utilizando etóxido de sódio em etanol, meio homogêneo. Entretanto, mistura do produto desejado **2** (monoalquilado) é obtido juntamente com o produto dialquilado **2'** numa proporção de 87:13, respectivamente conforme análise por cromatográfico de gás (MARVEL, 1948).

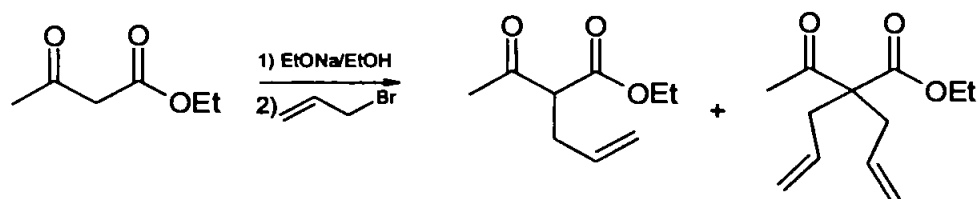
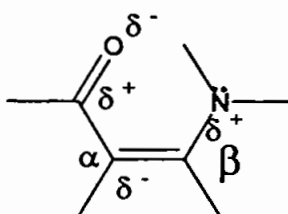


Figura 13 – Produto monoalquilado (**2**) e dialquilado (**2'**)

### 3.13.1. Aspectos gerais dos compostos $\beta$ -enaminonas

As  $\beta$ -enaminonas apresentam cinco centros reativos, sendo dois eletrofílicos e três nucleofílicos. Centros nucleofílicos (O, C $\alpha$ , N) e centros eletrofílicos (C=O e C $\beta$ )(EBERLIN, 1988).



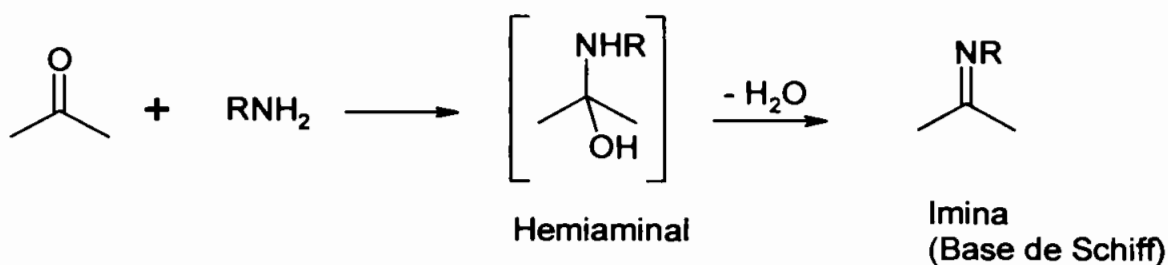
**Figura 14 – Centros nucleofílicos e eletrofílicos da  $\beta$ -enaminonas.**

Estes compostos são de grande importância na química orgânica sintética, pois são moléculas pequenas funcionalizadas, que apresentam vários centros reativos.

A reatividade desses compostos varia de acordo com os substituintes ligados aos átomos de carbono ou nitrogênio, ocasionando alteração tanto na densidade eletrônica dos centros reativos como na conformação do sistema.

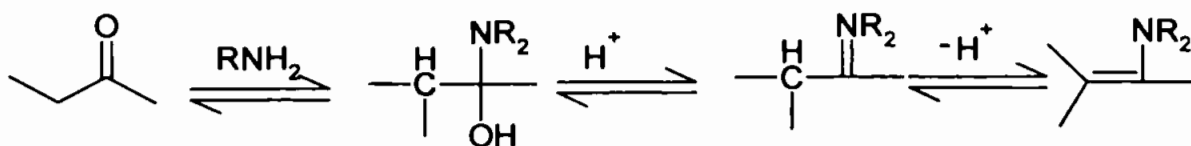
Dentre os vários métodos de preparação de enaminonas, destacam-se as reações de adição de aminas a aldeídos e cetonas. Aminas primárias, secundárias e terciárias podem ser adicionadas a aldeídos e cetonas levando à formação de diferentes tipos de compostos. Aminas primárias levam a iminas, suficientemente estáveis para serem isoladas, em contraste com os produtos hemiaminas e/ou iminas esperados, são compostos geralmente instáveis. Iminas com um hidrogênio ligado ao átomo de

nitrogênio polimerizam espontaneamente. Compostos hemiaminais estáveis podem ser preparados a partir de cetonas e aldeídos polifluorados ou policlorados (MARCH, 1985).



Cetonas reagem mais lentamente que aldeídos e requerem condições mais enérgicas de temperatura.

Se aminas secundárias são aquecidas com aldeídos ou cetonas na presença de um catalisador ácido, os compostos hemiaminas *N,N*-dissubstituídos não podem perder água da mesma maneira, e por isso podem ser isolados. No entanto, são geralmente instáveis e sob as condições da reação reagem com eliminação de água, se há algum hidrogênio em posição  $\beta$  aos grupos  $\text{NR}_2$  e  $\text{OH}$  presentes na molécula, formando enaminas correspondentes.



Este é o método mais comum de preparação de enaminas, e é usualmente aplicado quando um aldeído ou cetona contendo um hidrogênio em posição  $\beta$ - são tratados com uma amina secundária. A água, como

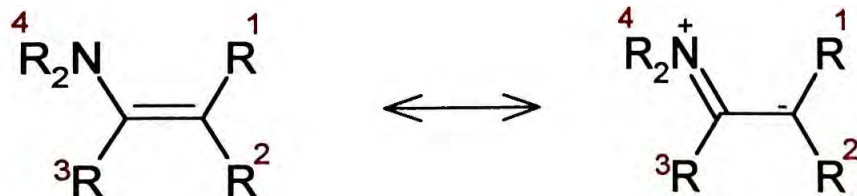
ocorre na síntese das iminas, pode ser removida ou por destilação azeotrópica e, especificamente, pela adição de agente desidratante.

Aminas terciárias podem apenas gerar sais de amônio. Iminas e enaminas estão em equilíbrio tautomérico, sendo que as enaminas são normalmente estáveis somente quando não existe hidrogênio ligado no nitrogênio ( $R_2C=CR-NR_2$ ), caso contrário a forma imina predomina (SHAINYAN E MIRSKOVA, 1979).



As enaminas são nucleófilos potenciais para as reações de aumento de cadeia carbônica, por exemplo, em reações de alquilação e acilação.

Reagem mais eficazmente do que os enóis pela maior tendência do nitrogênio em doar elétrons, aumentando a reatividade (nucleofilicidade) do carbono  $\beta$  em comparação ao oxigênio dos enóis (CAREY *et al.*, 1990).

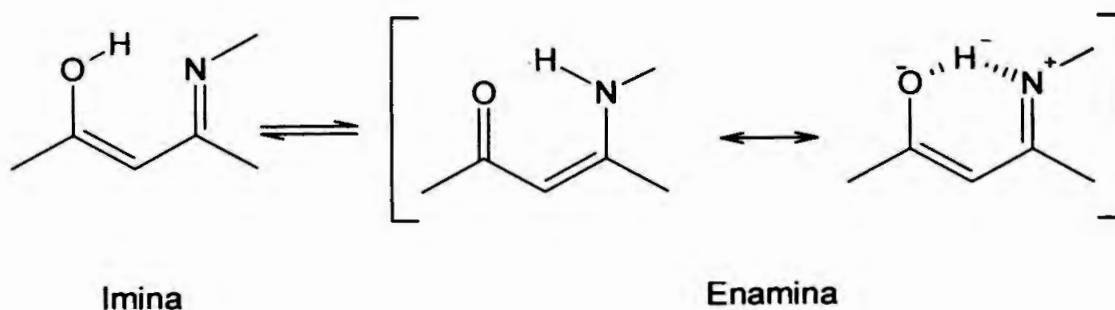




Uma classe especial de enaminas, conhecidas como  $\beta$ -enaminonas, é definida pelos compostos que contêm o sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado com o grupo carbonila, como mostra a figura a seguir. Dependendo do grupo R ligado à carbonila estes compostos podem ser classificados como enaminoacetona, enaminoésteres, ou enamino nitrilas. Estes compostos são de grande utilidade na síntese de heterociclos de nitrogênio.

A forma usual de preparação de  $\beta$ -enaminonas envolve a reação direta de uma 1,3-diona com amônia, ou uma amina primária ou secundária, em solvente aromático, com remoção azeotrópica da água formada (AZARRO *et al.*, 1981).

Foi estabelecido que  $\beta$ -enaminonas existem predominantemente na forma de enamina, que é estabilizada pela contribuição dos mesômeros A e B (GREENHIL, 1977).



Tais reações são efetuadas pela mistura direta do composto  $\beta$ -dicarbonílico e aminas primárias, sem utilização de solventes. Estas reações, em meio homogêneo, levam à obtenção de acetamidas como produto principal, devido às condições drásticas de reação que se fazem necessárias. Estudos de ativação aniônica (BRAM *et al.*, 1980) demonstram, em muitos casos, que forças eletrostáticas favorecem a adsorção de ânions em aluminas.

### 3.13.2. Aspectos gerais sobre ciclização

Dentre os vários métodos de preparação de compostos heterocíclicos destacam-se as reações de ciclização (ANTONIELETTI, 1988, BRANDT *et al.*, 1991). Várias lactonas, éteres, aminas e amidas cíclicas presentes em compostos naturais têm sido sintetizadas por meio deste método (NICOLAU *et al.*, 1984; LIOTTA, 1987). ANTONIELETTI, em 1995, descreveu a iodolactonização de série de derivados  $\beta$ -dicarbonílicos, em que os ésteres cíclicos obtidos foram transformados em derivados furânicos. Iniciou-se também, em 1990, a preparação de enamionas via compostos  $\beta$ -dicarbonílicos e sua viabilidade de reagirem com eletrófilos de iodo, levando assim a compostos heterocíclicos de nitrogênio (BRANDT *et al.*, 1991; FERRAZ *et al.*, 1995).

As reações de ciclização ocorrem mediante adição de um eletrófilo  $E^+$  à uma molécula insaturada contendo um nucleófilo (Nu) interno em que a estratégia é a formação de um anel e sua funcionalização. Estes são precursores interessantes, permitindo a obtenção de compostos biologicamente importantes (CLIVE *et al.*, 1980 e BARTLETT, 1984). As reações podem acontecer de duas formas diferentes, *endo* e *exo*.

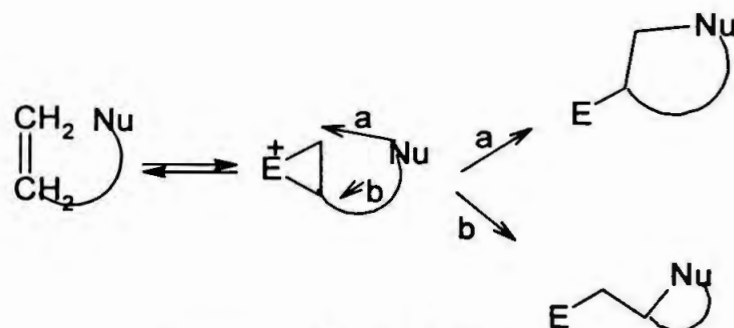


Figura 15- Endo e Exo.

Considerando a regioquímica da reação, deve-se notar que o complexo  $\pi$  inicialmente formado pode sofrer ataque nucleofílico de duas maneiras (caminhos a ou b) levando a diferentes produtos de ciclização (CARDILLO, 1990).

Para compostos com possibilidade de formar anéis de cinco e seis membros, há uma competição na formação dos dois, obedecendo em geral a regra de Markownikov. A formação preferencial de um dos anéis não depende somente do efeito eletrônico causado pelos substituintes na ligação dupla, mas também do efeito estérico na estabilização da molécula. Portanto, nem sempre é possível prever com exatidão a estrutura do produto da reação de cicloadição. (BALDWIN, 1976).

Anéis heterocíclicos de cinco membros oxigenados, como furanos e diidrofuranos, são importantes unidades estruturais em moléculas orgânicas já que servem de intermediários de síntese de inúmeros outros compostos.

Clive e colaboradores, em 1977, introduziram o termo ciclofuncionalização para descrever o processo em que a adição de um eletrófilo a um alceno contendo um nucleófilo interno, promove a ciclização. Este eletrófilo permanece ligado a um dos carbonos da ligação dupla

envolvida na reação, permitindo modificações adicionais, que depende do eletrófilo escolhido como agente de ciclofuncionalização (CLIVE *et al.*, 1980). Podem agir como nucleófilos internos no fechamento do anel, grupos eletrodadores tais como  $-\text{CO}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCO}_2\text{R}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{SAc}$ .

As primeiras reações de ciclofuncionalização datam do século retrasado, quando Fittig *et al.*, em 1883, observaram que ácidos carbonílicos  $\gamma,\beta$ -insaturados ao reagirem com bromo, formavam  $\gamma$ -lactonas. Depois, constatou-se que outros eletrófilos provocam reações semelhantes.

Embora anéis de todos os tamanhos estejam presentes em compostos de origem natural, os mais comuns são anéis de 5 e de 6 membros. Baldwin *et al.*, em 1976, formularam regras empíricas para prever a facilidade relativa da formação de anéis. Estas regras são baseadas na trajetória do reagente que ataca um átomo de carbono tetraédrico, trigonal ou diedro, levando ao composto *exo* quando a ligação que se quebra é exocíclica ao anel que se forma e *endo*, indicando a quebra de uma ligação endocíclica ao anel que está se formando.

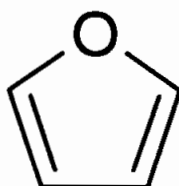
Vários agentes eletrofílicos são usados com a finalidade de obter o fechamento de anéis, e a natureza do eletrófilo tem um papel importante. Existem duas propostas mecanísticas para o ataque eletrofílico à ligação dupla: uma sugere a formação de um íon ônio e a outra é um mecanismo simultâneo com ataque do nucleófilo num complexo  $\Pi$  ligação dupla-halogênio.

Com base em dados experimentais, são sugeridos diferentes mecanismos: na bromociclização, o ataque ao íon bromônio é a etapa determinante da velocidade da reação, enquanto na iodociclização a etapa determinante da velocidade da reação é o ataque do nucleófilo no complexo ligação dupla-iodo.



### 3.13.2.1. Derivados furânicos

O furano é um anel heteroaromático de cinco membros (PAQUETTE, 1987).

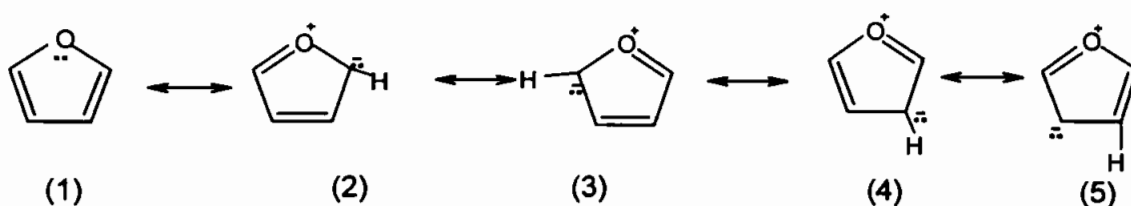


**Figura 16 – Anel furano heteroaromático.**

Do ponto de vista de orbital molecular este anel é um pentágono planar com átomos de carbono de hibridização  $sp^2$ . Cada um dos quatro átomos de carbono tem um elétron no orbital  $p_z$  e o heteroátomo tem dois elétrons  $p$ . Estes orbitais  $p$  se superpõem produzindo nuvens  $\pi$  por cima e abaixo do anel.

Do ponto de vista da camada de valência, esta molécula é considerada como híbrido de ressonância de diversas estruturas o que explica graficamente o resultado da deslocalização do par de elétrons não compartilhado do heteroátomo, ou seja o grau de carga negativa que tem os carbonos do anel.

A estrutura de ressonância para o furano, figura 17 estrutura 1 contribui mais, já que não existe separação de carga, como outras estruturas de ressonância como 2 e 3 mais predominante que 2 e 4 devido à menor separação de carga entre elas e ou cromóforo está conjugado em contraposição com a conjugação das fórmulas 4 e 5.



**Figura 17 - Estruturas de ressonância para o furano.**

Os furanos apresentam reação violenta com ácidos fortes e por reação de hidrólise cuidadosa, em ácidos minerais diluídos, podem produzir compostos 1,4-dicarbonílicos com bom rendimento (KOIZUM *et al.*, 1937/1938).

A presença de substituinte que atraem elétrons no núcleo furânico, diminui a basicidade do heterociclo. Este fato demonstra estabilidade frente a ácidos inorgânicos (YOUNG *et al.*, 1943).

Em 1832, Dobereiner divulgou que no processo de destilação de açúcar, acabou por encontrar o furfural que é reconhecido como antecedente do grupo dos derivados do nitrofurano (TAVARES, 1996).

As pesquisas continuaram e em 1930, Gilman e Wright apresentam os primeiros nitrofuranos mas, só em 1944 suas propriedades antimicrobianas foram relacionadas por Dodd e Stilman através de 42 derivados nitrofurânicos.

Assim, atualmente, podemos dizer que os nitrofuranos ou derivados do 5-nitrofurfural possuem um agrupamento nitro na posição 5 do anel do furano, são antibacterianos eficientes e atuam contra certos protozoários e fungos.

O detalhamento dos derivados do nitrofurano revelam:

- ação bacteriostática sobre germes gram-positivos e gram-negativos, graças à inibição da acetilcoenzima A do ciclo de Krebs, bloqueando o metabolismo glicídico;
- são inibidores de desidrogenases e outras enzimas relacionadas ao metabolismo aeróbico e anaeróbico da glicose;
- alteram a síntese de ARN mensageiros, uma vez que, agem sobre a síntese das proteínas;
- agem como bactericidas, quando em concentrações elevadas, possivelmente por impor modificações no ADN;

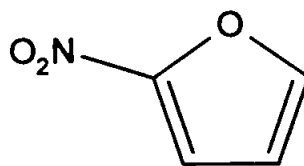
É importante salientar que alguns derivados de nitrofuranos agem contra certos protozoários do tipo *Trypanosoma* nas variedades *T. cruzi*,

*T. gambiense* e *T. rhodesiense*; contra, os também protozoários, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*; e contra fungos como a *Candida albicans*. A nitrofurazona e a nifurtimox, é usada contra a tripanossomíase africana.

Outra aplicação de nitrofurano é a contra a doença de Chagas, que ficou conhecida através de Packehanian, em 1957.

Em razão dos nitrofurânicos serem fármacos com alta toxicidade ao homem, causando polineurites e alterações hematológicas, seu emprego terapêutico tem sido prejudicado. Esta situação é agravada devido ao aparecimento de agentes mais ativos e do fato de que os nitrofurânicos são inibidores da espermatogênese no homem devido a mudanças que provocam no ADN.

Outros nitrofuranos com ação antiinfeciosa são: nitrofural, furazolidona, nitrofurantoina, nifurtimox, nitrofurfuril, nifuroxima, furaltadona, levofuraltadona, nifuratel, furium e nifurazida (Fig. 19)



**Figura 18 – Anel nitrofurano.**

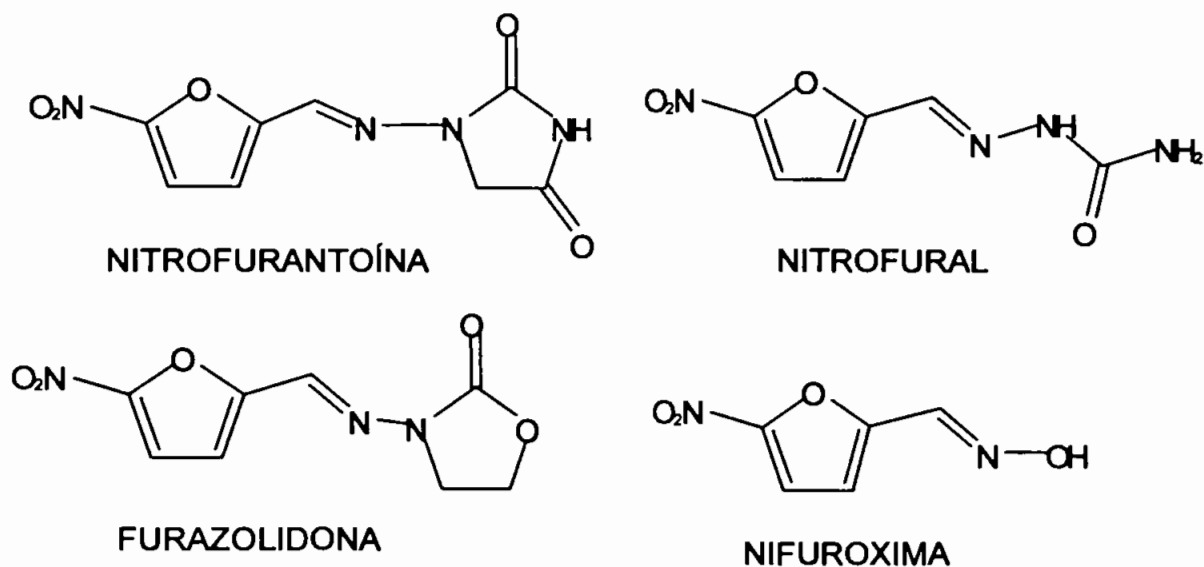
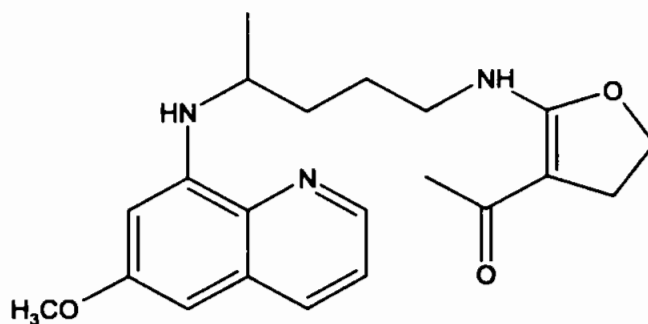


Figura 19 – Composto nitrofuranos.

Além das propriedades já mencionadas, o anel furânico está presente em compostos sintéticos, ativos contra a malária, nos quais os compostos apresentam o núcleo básico quinolínico com modificações na cadeia lateral contendo entre elas derivados no anel furânico.



CDRI 80/53

### 3.13.2.2. Derivados Quinolínicos

O núcleo quinolínicos é a base de uma série de medicamentos antimaláricos sintéticos e está presente também em vários produtos naturais biologicamente ativos. Trata-se de importante heterocíclico bicíclico de seis membros contendo um nitrogênio fundido a um anel benzênico (BRUCE-CHWATT, 1986).

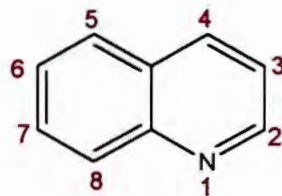


Figura 20 – Núcleo básico quinolínicos.

A fusão de um anel benzênico e um núcleo de piridina resulta em molécula bicíclica sem carga. É um heterocíclico básico semelhante à piridina frente a ataques químicos mas existem diferenças em sua reatividade.

A quinolina é um sistema de dez elétrons  $\pi$  aromáticos, deslocalizados semelhante ao naftaleno. O caráter de ligação dupla é mais forte nas posições 1,2-,3,4-, 5,6 e 7,8 que nas outras ligações.

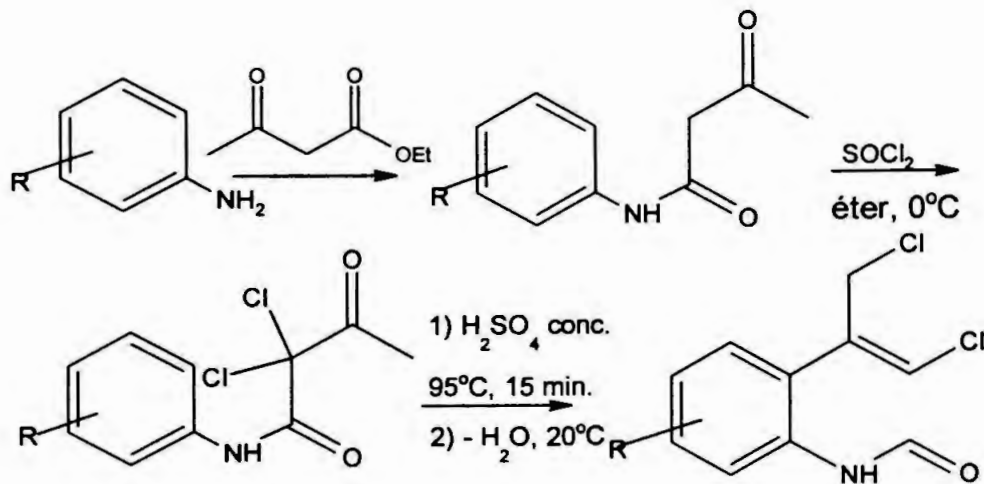
A literatura descreve diversos métodos de síntese de quinolinas, sendo os mais comuns: reações de Conrad-Limpach, pela condensação de anilina com um composto  $\beta$ -dicarbonílico, modificação de Knorr, pela ciclização de uma amida intermediária, obtida pela reação de um

$\beta$ -cetoéster e uma amina aromática e método de Gould-Jacobs, pela reação de um malonato derivado e uma amina aromática (GEORGE, REYNOLDS *et al.*, 1955).

As principais rotas sintéticas de hidroxiquinolína até então descritas, apresentam um mesmo tipo de estratégia, ou seja a partir de derivados de anilinas e compostos carbonílicos.

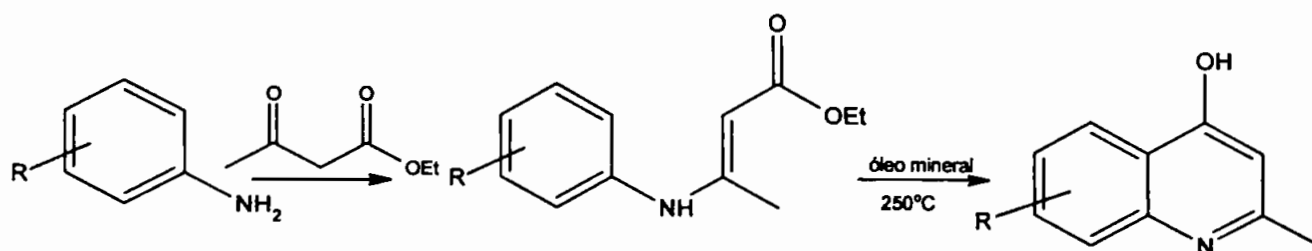
### Síntese de KNORR (KNORR, 1988)

Reação entre uma amina aromática e um  $\beta$ -cetoéster sendo uma amida como intermediário de reação.

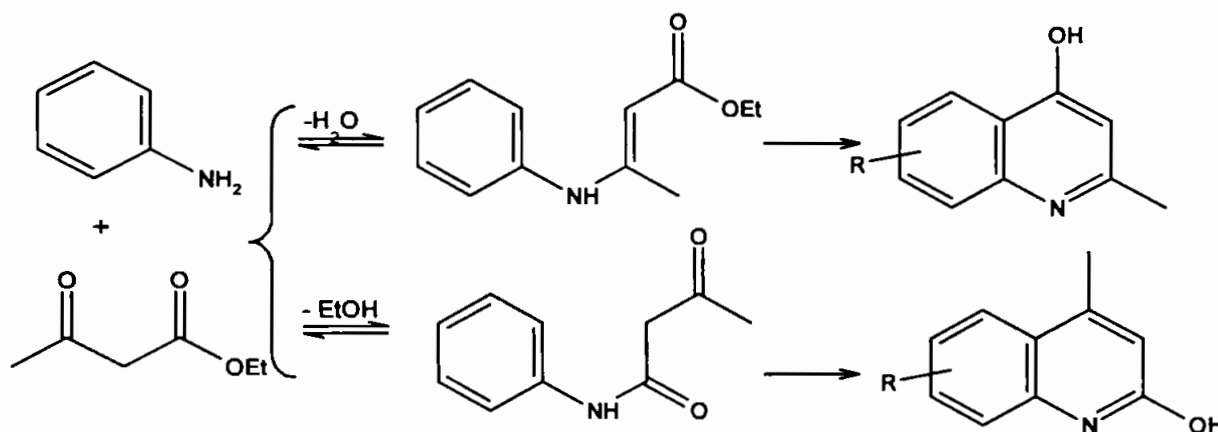


### Síntese de CONRAD-LIMPACH (CONRAD-LIMPACH, 1891)

Pela modificação da síntese de Knorr, um  $\beta$ -enaminoéster cicliza formando a 4-hidroxiquinolína.

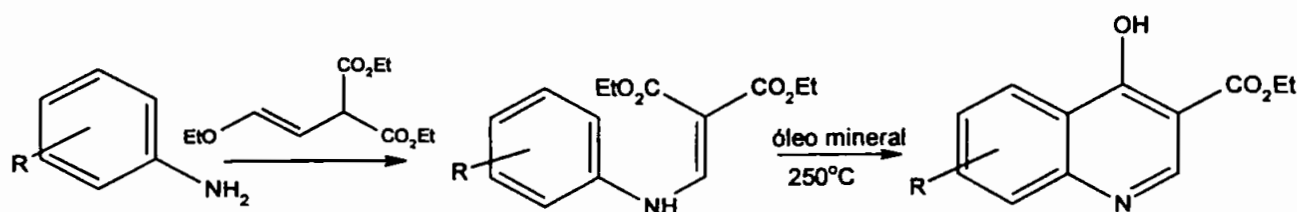


A desvantagem desta reação é que uma mistura de 2-hidroxiquinolina e 4-hidroxiquinolina pode ser obtida.



### Síntese de GOULD-JACOBS (GOULD-JACOBS, 1939)

Reação entre um derivado de malonato e uma amina aromática, levando a uma quinolina com um grupo carboxila na posição 3.





## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais**

#### **Reagentes e solventes usados na síntese**

- acetato de etila p.a. (Merck)
- acetoacetato de etila p.a. (Merck)
- álcool etílico absoluto p.a (Merck)
- álcool isopropílico p.a (Merck)
- álcool metílico p.a. (Synth)
- alumina neutra p.a. (Merck)
- anilina p.a. (Analítica)
- água destilada
- água Milli-Q
- bicarbonato de sódio p.a. (Synth)
- brometo de alila p.a. (Aldrich)
- carbonato de sódio p.a. (Sinética Química Ltda)
- clorofórmio deuterado- $\text{CDCl}_3$  (Isotec)
- clorofórmio p.a. (Merck)
- cromatofolhas Al TLC, Sílica-gel 60 F254 (Merck)
- diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) (Aldrich)
- dimetilsulfóxido deuterado-DMSO- $\text{d}_6$  (Isotec)
- diclorometano p.a. (Merck)
- hexano p.a. (Merck)
- hidróxido de sódio p.a (Synth)
- iodo p.a. (Merck)
- parafina
- sódio metálico
- sílica-gel 60 F254, tamanho de partícula 0,063-0,2000 mm p.a. (Merck)

- sulfato de sódio anidro (Nuclear)
- tetraidrofurano p.a.(THF) (Merck )
- tolueno p.a. (Synth)

Quando necessário, os reagentes e solventes foram purificados segundo literatura (PERRIN *et al*; 1980).

### **Reagentes e solventes usados no ensaio biológico**

- solução tampão fosfato – salina (PBS)
- meio de cultura RPMI-1640 completo (Sigma Aldrich)
- solução corante Giemsa
- metanol

Todas as substâncias e demais reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise sendo a água purificada em sistema Milli-Q, apresentando resistividade de 18M $\Omega$ .

Para ensaios *in vivo* foram utilizados animais de laboratório camundongos C57BL/6j ou BALB/C.

### **Equipamentos e acessórios**

Além dos aparelhos e vidrarias empregados usualmente no laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

**Para síntese e análise**

- aparelho para determinação de pontos de fusão Microquímica, modelo MQAPF 301
- rotaevaporador R-114 BUCHI
- cromatógrafo gasoso HP 6890 com coluna de metilsilicone de 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro.
- bomba de alto vácuo modelo E2M5 EDWARDS
- lâmpada de radiação ultravioleta 254/365 nm; SPETROLINE modelo ENF-260C para revelação de cromatograma
- espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz Bruker modelo Advance DPX-300
- aparelho analisador elementar Perkin-Elmer-Elemental Analyzer 2400 CHN(Instituto de Química)
- aparelho de espectrometria de absorção no infravermelho (IV), FTIR-Bomem, modelo MB-120
- espectrômetro de massas HP GCMS-QP 5050 A (Shimadzu)(Instituto de Química)
- estufa para secagem FANEM modelo No.510390
- balança analítica Apollo Mettler AE 163
- balança semi-analítica Marte AS5500C
- destilador Permution

**Para ensaio biológico e acessórios**

- fluxo laminar (Trox)
  - microscópio invertido(Olympus)
  - autoclave (Olidex CZ)
  - banho-maria (Fabbe-Primar)
  - estufa incubadora CO<sub>2</sub> (Instrucom)
  - coulter counter (Becton)
-

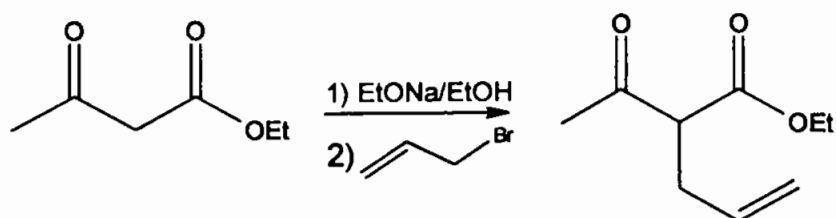
- placa de 96 poços ou well (Corning)
- gaiolas de plástico
- pipetador eppendorf e multicanal (Sigma Aldrich)
- lâmina para microscopia (Bioglas)
- câmara Newbauer (Labor Optik).
- dessecador (Industria Brasileira)

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Métodos de Síntese

#### 4.2.1.1. Alquenação do acetoacetato de etila

A partir da reação entre acetoaceto de etila e o brometo de alila obtém-se o composto 2-alil-acetoacetato de etila por meio da alquilação no C2 do acetoacetato de etila, após tratamento com etóxido de sódio. O agente alquilante é o brometo de alila (MARVEL *et al.*, 1948).

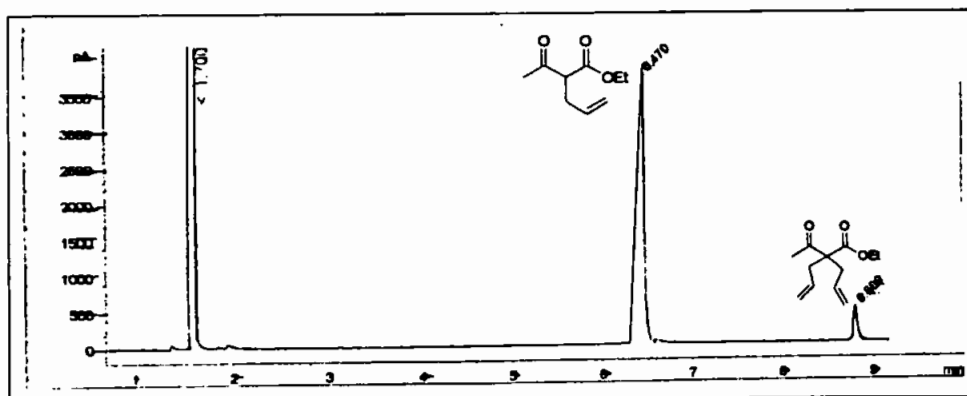


### Procedimento

Em balão de 250 mL de duas bocas, munido de condensador de refluxo e tubo secante contendo 150 mL de etanol absoluto, com agitação magnética

eficiente, adicionou-se sódio metálico recém-cortado (0,3 mmol; 6,90 g). Após o sódio ter sido completamente consumido, adicionou-se acetoacetato de etila (360 mmol; 46,80 g). Agitou-se a mistura em refluxo e adicionou-se brometo de alila (330 mmol; 39,92 g). A mistura reacional foi mantida sob refluxo durante 10 horas, até que o pH da mistura se mostrasse neutro. O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia gasosa. Resfriou-se a mistura reacional e o brometo de sódio formado precipitou completamente. Filtrou-se e lavou-se com etanol absoluto várias vezes. Concentrou-se e o resíduo obtido foi destilado sob pressão reduzida, obtendo-se um líquido incolor.

Ponto de ebulição de 154 °C/120 mmHg. Obteve-se rendimento de 75%. O composto obtido foi analisado por RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C.

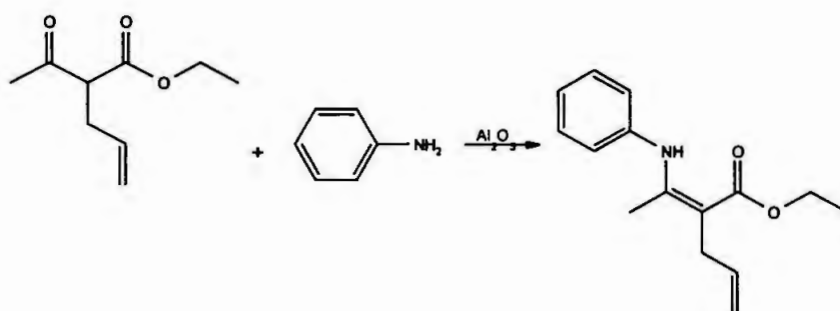


**Cromatograma da reação do acetoacetato de etila e brometo de alila em meio homogêneo, produzindo  $\beta$ -dicarbonílico 2-alilacetato de etila**

#### 4.2.1.2. Formação de $\beta$ -enaminoéster

##### Preparação da enamina

Reagiu-se o  $\beta$ -dicarbonílico alquenilado obtido anteriormente com anilina, usando como suporte sólido alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), excelente método de obtenção de enaminas (BRAIBANTE *et al.*, 1990; BRANDT *et al.*, 1991; FERRAZ *et al.*, 1995).



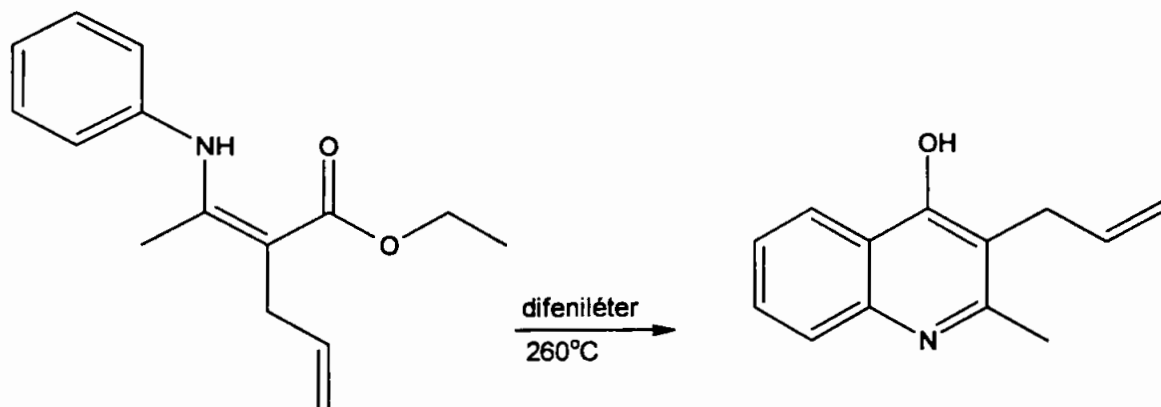
##### Procedimento

Em balão de 250 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram colocados  $\beta$ -dicarbonílico (50 mmol, 8,5 g) e anilina (100 mmol; 9,31g). Adicionaram-se 20 g de alumina neutra previamente seca em estufa. Agitou-se a suspensão resultante à temperatura de  $90^\circ\text{C}$  durante 24 horas, acompanhando-se a reação por cromatografia gasosa. A seguir, extraiu-se a mistura, filtrou-se e lavou-se com hexano. Concentrou-se o resíduo obtido o qual foi destilado sob pressão reduzida, p.e.  $65^\circ\text{C}/8\text{ mmHg}$ . Obteve-se um óleo amarelo claro com rendimento de 82%.

### 4.2.1.3. Formação do núcleo quinolínico

#### Preparação da 2-metil-3-aliil-4-hidroxiquinolina

O acetoacetato de etila  $\alpha$ -alquilado foi transformado no  $\beta$ -enaminoéster, o qual sofreu ciclização térmica, usando difeniléter como solvente (REYNOLDS *et al.*, 1955). Foi utilizado o método de



Conrad-Limpach, ciclização térmica de  $\beta$ -enaminoésteres.

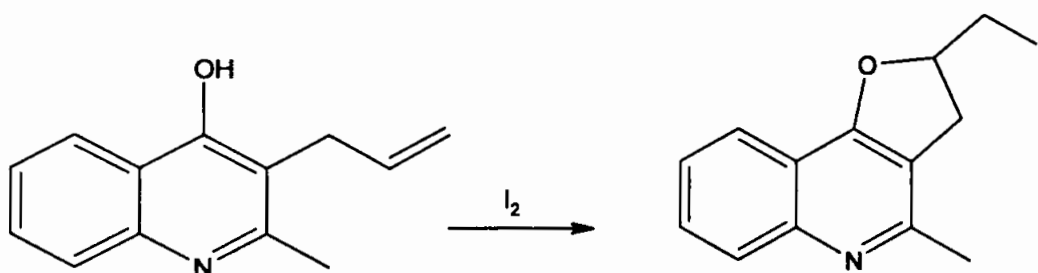
#### Procedimento:

Colocaram-se 18 mL de difeniléter em balão de 50 mL, de três bocas, munido de condensador de refluxo, funil de adição e termômetro, e a temperatura foi elevada a 250 °C. Adicionou-se (30 mmol; 6,16 g) da enamina contida no funil de adição previamente preparado. Depois de uma hora e meia de reação à temperatura de 250 °C, esfriou-se a mistura à temperatura ambiente e um sólido perolado e brilhante foi separado por filtração. Filtrou-se o sólido formado e lavou-se várias vezes com hexano.

Acompanhou-se a reação por cromatografia gasosa. O rendimento obtido foi de 80% e ponto de fusão de 265-266 °C.

#### **4.2.1.4. Preparação do derivado de diidrofurano**

O derivado quinolínico obtido foi ciclizado em presença de iodo, carbonato de sódio e diclorometano como solvente.



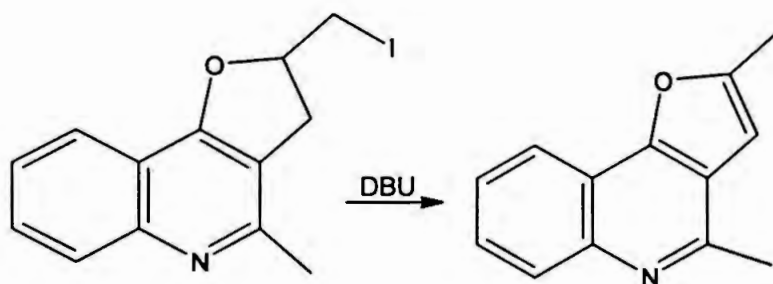
#### **Procedimento da ciclização**

Em balão de 50 mL foram colocados 4-hidroxiquinolina preparada na etapa anterior (1 mmol; 0,199 g) e 25 mL de diclorometano. Após total dissolução, adicionou-se iodo (1,1 mmol; 0,280 g) e carbonato de sódio (1,1 mmol; 0,117g). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 20 horas. O composto obtido é sólido, untuoso, marrom escuro. O rendimento foi de 63,2% e ponto de fusão de 132 °C – 134 °C.



#### 4.2.1.5. Preparação do composto furanoquinolínico

O diidrofurano obtido anteriormente foi submetido à eliminação redutiva com DBU, formando o anel furânico com a eliminação do iodo.



#### Procedimento

Em balão de 15 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, adicionaram-se diidrofurano (1,56 mmol; 0,51g), 10 mL de tolueno e DBU (2 mmol; 0,30 g). A mistura foi mantida sob refluxo e agitação durante 17 horas. A mistura foi filtrada e concentrada e o produto purificado em coluna de sílica-gel, usando como eluente hexano/acetato de etila na relação 3:1. Obteve-se um composto sólido untuoso, marrom escuro, com rendimento de 82% e ponto de fusão de 50 °C– 60 °C.

#### **4.2.2. Métodos Analíticos**

##### **Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Utilizaram-se cromatofolhas Al TLC, sílica-gel 60 F254 (Merck) para o acompanhamento das reações. A revelação das placas foi feita por lâmpada de ultravioleta (UV) e iodo.

##### **Cromatografia em coluna (CC)**

Utilizaram-se colunas de 37x5 cm e 20x3 cm e sílica-gel 60 (Merck) para a separação e purificação dos produtos obtidos.

##### **Cromatografia gasosa (CG)**

Foi utilizado um equipamento HP 6890, com coluna de metilsilicone com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno; N<sub>2</sub>(g) como fase móvel e um detetor de ionização de chama (FID), temperatura inicial de 100 °C e volumes de injeção de 2 µl. A cromatografia em fase gasosa foi usada para acompanhar o progresso das reações, bem como na verificação da pureza dos compostos.

##### **Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H) e carbono treze (<sup>13</sup>C) e DEPT foram obtidos pelo Aparelho Bruker DPX-300, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO-d<sub>6</sub>) e clorofórmio deuterados (CDCl<sub>3</sub>) como solventes.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão registrados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), aplicado como padrão interno (0 ppm).

As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como singleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qui), sexteto (sex), multiplete (m), sinal largo (sl). A quantidade de hidrogênio é obtida pela integral e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

### **Ponto de fusão**

Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho BÜCHI, e Microquímica, modelo MQAPF 301, sem correção.

### **Espectrometria no infravermelho (IV)**

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro BOMEN-FTIR-MB120, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  usando pastilha de KBr, NaCl e amostra previamente seca.

### **Análise Elementar**

As determinações de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em analisador elementar Perkin Elmer-Elemental Analyzer 2400 CHN.

## **Espectroscopia de massas**

Os espectros de massa por impacto de elétrons foram obtidos em aparelho Perkin Elmer, HP, GCMS – QP 5050 A (Shimadzu), tipo do espectro de massas quadruplo, DIP (Direct Insert Probe), realizados pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

### **4.2.3. Avaliação da atividade biológica contra malária**

#### **4.2.3.1. Ensaio biológico *in vivo***

O modelo que está sendo utilizado foi baseado na malária de camundongos, causado pelo *Plasmodium berghei*. Trata-se de um modelo de fácil manuseio e observação, sendo utilizados critérios tanto de queda de parasitemia quanto de eliminação de mortalidade.

O teste biológico do composto sintetizado 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina foi efetuado em base logarítmica variada, permitindo a utilização de menor número de animais, de acordo com as normas éticas aceitáveis para este tipo de análise (FESTING., 1994)

## **Plasmódio**

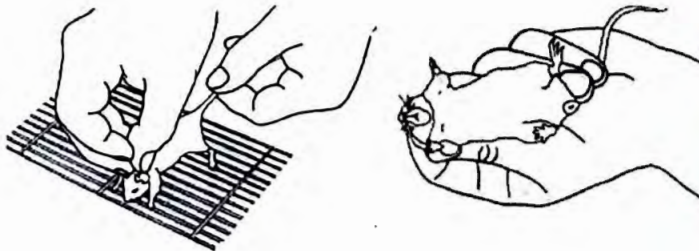
Utilizou-se *Plasmodium berghei* cepa ANKA, cedido pelo Prof. Dr. David Walliker, da Universidade de Edimburgo. Este foi mantido em nitrogênio líquido e congelado após expansão inicial em camundongos, no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

## Infecção dos animais

Para a identificação antimalárica dos compostos sintetizados, foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6j e Balb/C, fêmeas pesando entre 20-25 g. Os animais foram infectados por via intraperitoneal. Os roedores foram mantidos em ambiente ventilado, à temperatura ambiente (SVENDSEN, 1994), em gaiolas plásticas e meios absorventes estéreis, recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

A manipulação e manuseio dos animais, seguiram os princípios de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação animal e as regras de cuidados de animais de laboratório (NIH publ. No 86-23, revisado em 1985).

O inóculo experimental foi obtido após descongelamento do estabulato à 37 °C e inoculação do mesmo em camundongos isogênicos C57B1/6j, por via intraperitoneal com  $10^6$  formas eritrocíticas, obtidas de camundongo previamente infectado, durante a fase de ascensão da parasitemia, para diminuir eventual contaminação com gametócitos. O sangue foi retirado por punção cardíaca, diluído adequadamente em solução de NaCl a 0,9%, estéril.



**Manuseio correto dos camundongos e recipiente apropriado**

### **Avaliação da parasitemia**

A parasitemia e a concentração de hemácias foram previamente determinadas por microscopia em esfregaço com sangue caudal dos animais, fixadas com metanol por 3 minutos e corada pelo Giemsa em tampão de fosfato (PBS), pH 7,2, 0,15M, por 15 minutos. Depois foram lavadas com água corrente e a contagem de hemácias totais realizada em câmara de Neuburæ, sendo determinada a porcentagem de hemácias parasitadas em 500-5000 eritrócitos, utilizando-se amostragem de, pelo menos, 10 campos em parasitemias baixas ou até >100 hemácias parasitadas, o que diminui o erro experimental de medidas. A parasitemia foi acompanhada por esfregaços de sangue caudal 3 vezes por semana, sendo que neste inóculo, a malária foi uniformemente letal após 16 dias.

### **Administração dos compostos sintetizados, preparação das caixas e dose**

A dosagem inicial (10 mg/kg) é distribuída em grupos de 4 animais, submetidos a esquemas com diferentes concentrações, injetados por via intraperitoneal (10 mg, 2,5 mg, 0,62 mg e 0,16 mg).

Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas :

- 4 camundongos controle;
  - 4 camundongos infectados + composto sintetizado 10 mg;
  - 4 camundongos infectados + composto sintetizado 2,5mg ;
  - 4 camundongos infectados + composto sintetizado 0.62 mg ;
  - 4 camundongos infectados + composto sintetizado 0,16 mg.
-

Outro grupo experimental não infectado recebeu só composto sintetizado:

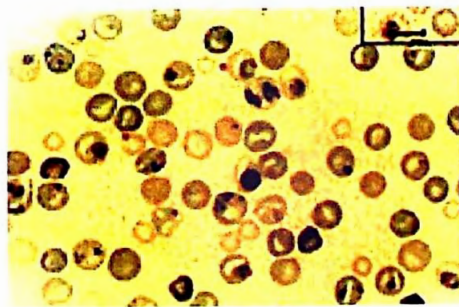
- 3 camundongos que receberam 10 mg do composto sintetizado;
- 3 camundongos que receberam 2,5 mg do composto sintetizado;
- 3 camundongos que receberam 0,62 mg do composto sintetizado;
- 3 camundongos que receberam 0,16 mg do composto sintetizado.

### **Avaliação da eficácia dos produtos sintetizados**

Durante todo o experimento foram feitas leituras da parasitemia de cada grupo de camundongos, até o 16º dia da infecção. Acompanharam-se a morbidade e a mortalidade de cada animal, baseadas em ensaios clínicos, com aparecimento de apatia, prostração e pêlos arrepiados.

### **Contagem de células nos ensaios biológicos**

As leituras da parasitemia foram obtidas por observação direta em microscópio Olympus, realizado com lente de imersão (em óleo) e as contagens em aparelho Coulter Counter.



***P. berghei***



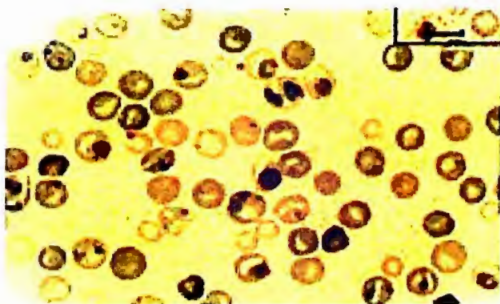
## Análise dos dados

Os resultados obtidos nos grupos experimentais foram confrontados com os dados relativos aos animais controle.

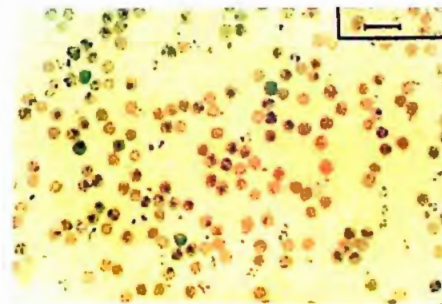
Todos os dados foram analisados em modelo sigmoidal dose-resposta, utilizando pacote estatístico GraphPad Prisma, com adição de dois pontos virtuais acima e abaixo da dose máxima e mínima utilizadas, para permitir um cálculo artificial de intervalo de confiança de 95% da dose eficaz observada. Após esta determinação, novo experimento utilizando base logarítmica menor, ao redor da dose observada foi determinada para aumento da precisão da medida.

### 4.2.3.2. Ensaio biológico *in vitro*

Os parasitas, como fonte de infecção, foram provenientes de duas linhagens de plasmódios de roedores, *Plasmodium chabaudi*, cepa CR (malária não-letal) e *Plasmodium berghei*, cepa ANKA (malária letal). Estas cepas vêm sendo mantidas como estabilatos, em nitrogênio líquido, no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, sendo aplicado em novos animais livres de infecção por *Eperythrozoon coccoids* (Andrade Jr. et al, 1986).



*P. berghei*



*P. chabaudi*



Na fase de ascensão da parasitemia, o sangue foi retirado por punção cardíaca, colhido e diluído adequadamente em solução de citrato de sódio sobre Ficoo Hypaque. A mistura foi centrifugada a 24° C, 1500 rpm, durante 15 minutos, e a camada leucocitária foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e desprezada. As hemácias foram lavadas várias vezes com meio incompleto empregando o mesmo volume que sangue até não ficarem leucócitos.

A seguir os 0,5 mL das hemácias foram suspensas em 4,5 mL do meio completo MTT para um volume de 5mL.

#### **Avaliação da parasitemia**

A parasitemia e a concentração de hemácias foram previamente determinados por microscopia em esfregaço com sangue caudal dos animais, seguido de fixação com metanol durante 3 minutos e corado pelo Giemsa em 1% em tampão de fosfato (PBS) pH 7.2, 0.15M. Após 15 minutos, foram lavadas com água corrente, foram secadas a temperatura ambiente e observadas ao microscópio (100X) para contagem da parasitemia, realizada na câmara de Neubauer, sendo determinada a porcentagem de hemácias parasitadas em 500-5000 eritrócitos. Foram empregadas amostragem em 4 campos de parasitemia, tendo uma porcentagem inicial de parasitemia de 8% para *Plasmodium chabaudi* e 8,23% para *Plasmodium berghei*.

---

### **Preparação da placa e compostos sintetizados**

A placa foi preparada com 25 mL de meio completo RPMI 1640, contendo 250 $\mu$ g/mL de MTT e o produto dissolvido na concentração 5mg/mL.

Posteriormente preparou-se a solução mãe dos compostos sintetizados em meio RPMI com MTT, 75mg/mL de etanol e colocou-se 1 $\mu$ L deste em 1 $\mu$ L de MTT. Depois foram colocados 100 $\mu$ L de MTT em cada poço e 100 $\mu$ L de solução mãe por coluna. Esta foi homogeneizada e sucessivamente para o restante dos poços.

### **Preparação da cultura**

Após retirado o líquido sobrenadante, ressuspenderam-se as hemácias infectadas com 5 mL de RPMI 1640 completo. Colocou-se na placa Petri corning de 96 poços 50mL de solução de MTT por poço usando ponteiros de Eppendorf com pipeta multicanal. A placa foi colocada em dissecador com uma vela de parafina, que foi acesa para a obtenção de baixa tensão de oxigênio. Tapou-se o dissecador quase por completo, fechou-se o recipiente quando a chama estava se extinguindo e, posteriormente foi incubado a 37°C durante 18 horas na incubadora.

Retirou-se o dissecador da incubadora e retirou-se a placa do recipiente em fluxo laminar, adicionando-se 50 $\mu$ L por poço de solução SDS-HCl (10%, 0,01M). Agitou-se levemente. Após 1 hora na geladeira, com agitação constante, a placa foi novamente centrifugada a 1500 rpm, 24°C, durante 15 minutos e lavado com meio RPMI 1640 completo. Separaram-se

---

100 µL da sobrenadante. Em seguida foi realizada a leitura da D.O. em 540nm e 620nm em aparelho Elisa Heyder (TADA *et al*, 1986).

## **Protocolo MTT**

### **Avaliação da Atividade Antimalárica: Teste de Viabilidade Celular- MTT**

A avaliação da atividade dos compostos sintetizados, foi verificados através da incubação de hemácias infectadas com *P.berghei* e *P. chaboudi* em modelos experimentais, utilizando-se camundongos C57Bl/6j. As hemácias foram obtidas após centrifugação do soro dos camundongos, contadas em hemocitômetro de Neubauer, e ajustado o hematócrito para 5% de parasitemia, utilizando-se hemácias saudáveis.

Em seguida, adicionou-se às placas os compostos sintetizados e previamente diluídos em DMSO, os quais foram novamente diluídos no meio de cultura RPMI 1640 em diluição seriada. Em seguida, adicionou-se as hemácias parasitadas ( $1 \times 10^7$ /mL) com um volume final de 100µl/poço. As placas foram incubadas em estufa à 37° C com 5%CO<sub>2</sub> por um período 24 horas. A viabilidade dos parasitas foi verificada através do método de MTT (TADA *et al*, 1986).

O MTT (3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio; azul de tiazol) é um cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo de mitocôndrias. Devido às desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto formazari. Assim, através da leitura da densidade óptica (D.O.) em 570nm, é possível quantificar as células viáveis do sistema utilizado. O MTT, na forma de pó amarelo fino, foi dissolvido em

solução salina, na concentração de 5mg/mL, e posteriormente filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ m (SIGMA, 2000).

O MTT foi aplicado (100 $\mu$ l/poço) e após 4 horas em estufa 37 $^{\circ}$ C a placa foi novamente centrifugada a 1500rpm por 15 minutos. O subproduto formado, formazan, foi extraído das mitocôndrias pela adição de 100 $\mu$ l/poço de SDS-HCl 10% - 0,01M, por um período de 18 horas em estufa a 25 $^{\circ}$ C. Em seguida, foi realizada a leitura da D.O. em 570nm em espectrofotômetro LABSYSTEMS MULTISKAN MS.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1- Síntese e identificação dos compostos

#### 5.1.1. Análise Elementar

A Tabela II apresenta os percentuais de cada elemento na fórmula molecular dos furanoquinolínicos.

**TABELA II– Dados obtidos pela análise elementar do derivado furanoquinolínico**

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular	Elementos	Valor calculado (%)	Valor experimental (%)
2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> NO	199,25	Carbono Hidrogênio Nitrogênio	78,36 6,58 7,03	78,46 6,45 7,06
2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano[3,2-c]quinolina	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> NO I	325,14	Carbono Hidrogênio Nitrogênio	48,02 3,72 4,31	48,02 3,69 4,26
2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO	197,23	Carbono Hidrogênio Nitrogênio	79,17 5,62 7,10	76,50 5,92 7,65

### 5.1.2. Análise espectrométrica do derivado $\beta$ -dicarbonílico

Os números presentes nas estruturas a seguir foram colocados de acordo com o sistema International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), com a finalidade de separar ou discriminar os sinais  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Os dados das análises espectrométricas encontram-se nas Figuras 21, 22, 23 e Tabela III.

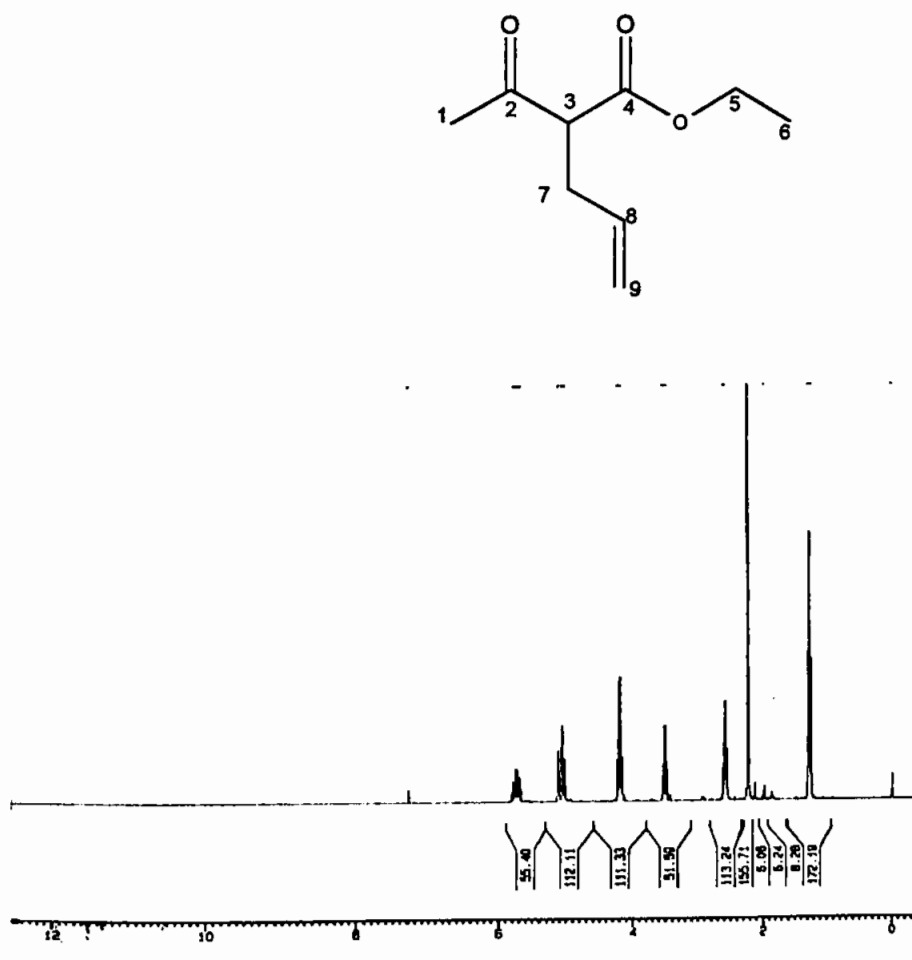


Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do  $\beta$ -dicarbonílico (300 MHz, solvente:  $\text{CDCl}_3$ ).

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H do derivado β-dicarbonílico**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>	<b>J(Hz)</b>
TMS	0	-
CDCl <sub>3</sub>	7,26	-
H <sub>2</sub> O	1,54	-
H-6 (t, 3H)	1,27	7,10
H-7 (m, 2H)	2,55-2,59	7,10
H-1 (s, 3H)	2,21	-
H-3 (t, 1H)	3,50	7,10
H-5 (q, 2H)	4,18	7,10
H-9 (m, 2H)	5,01-5,11	-
H-8 (m, 1H)	5,65-5,77	-

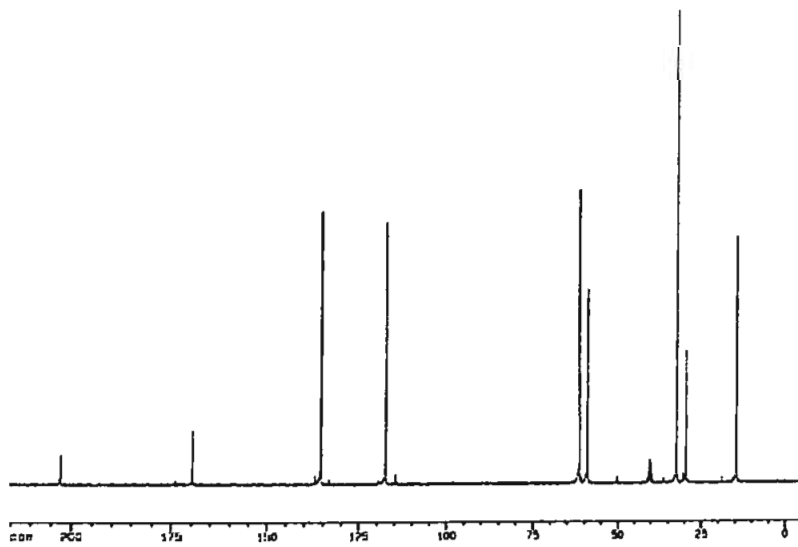
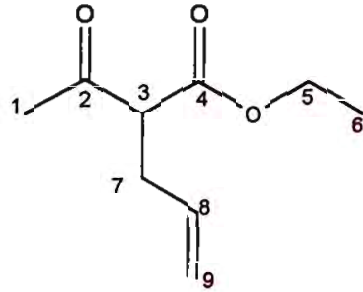
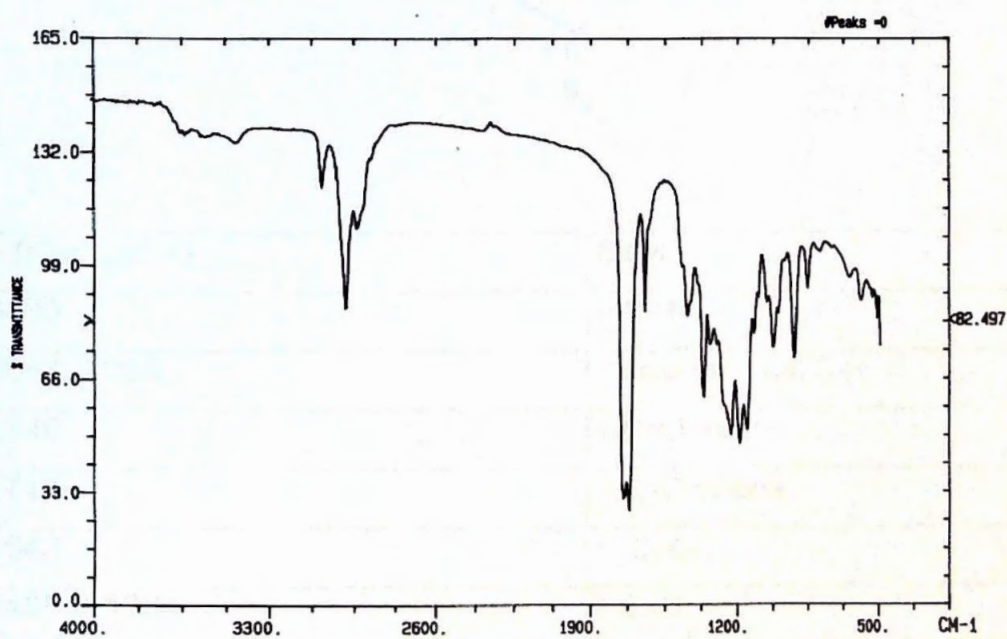
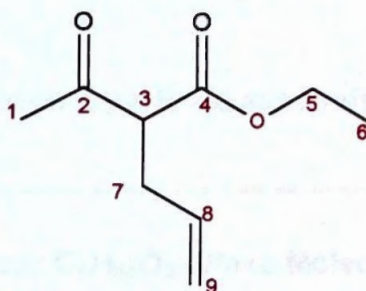


Figura 22 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do β-dicarbonílico (75 MHz, solvente:CDCl<sub>3</sub>)



**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C do derivado β-dicarbonílico**

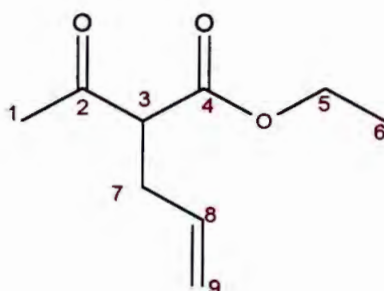
<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>
CDCl <sub>3</sub>	77,03
C-6	14,46
C-7	32,38
C-1	29,40
C-3	58,95
C-5	61,17
C-9	117,40
C-8	135,51
C-4	169,59
C-2	202,67



**Figura 23 - Espectro IV do derivado  $\beta$ -dicarbonílico, em Pastilha de NaCl**

**Tabela III – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para  $\beta$ -dicarbonílico**

**Fórmula Empírica:  $C_9H_{14}O_3$  - Peso Molecular: 170,06 g/mol**



$\nu$ (KBr, $cm^{-1}$ )	Sinal
3080	$\nu$ C-H
2984, 2935	$\nu$ assim e $\nu$ sim C-H
1740	$\nu$ C=O éster
1718	$\nu$ C=O cetona
1642	$\nu$ C=C
1435 e 1364	$\delta$ C- H
1235	$\nu$ assim C-O-C
1021	$\nu$ assim C-O-C

$\nu$  = estiramento ou deformação axial

$\delta$  = deformação ou deformação angular

### 5.1.3. Análise espectrométrica da $\beta$ -enamina

Os dados das análises espectrométricas encontram-se nas Figuras 24, 25, 26 e Tabela IV.

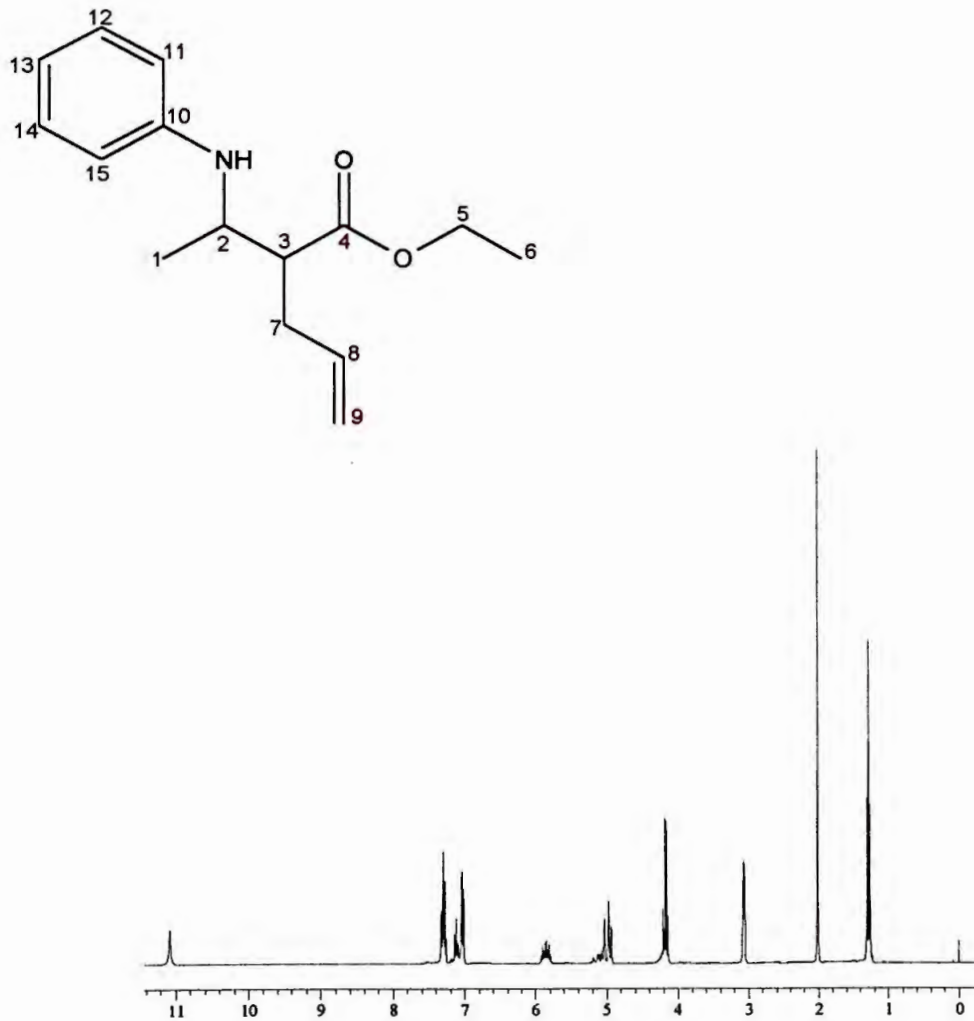


Figura 24 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -enamina.

(300 MHz, solvente:  $\text{CDCl}_3$ )

Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H da β-enamina

Grupo	δppm	J(Hz)
TMS	0	-
CHCL <sub>3</sub>	7,26	-
H <sub>2</sub> O	1,54	-
H-1 (s, 3H)	2,01	-
H-5 (q, 2H)	4,17	7,10
H-6 (t, 3H)	1,28	7,10
H-7 (d, 1H)	3,06	5,82
H-8 (m, 1H)	5,79-5,92	-
H-9 (m, 1H)	4,93-5,18	-
H-11 e H15(d, 1H)	7,05	9,50
H-12 e H14 (t, 1H)	7,15	7,64
H-13 (t, 1H)	7,30	7,64
H- NH (s, 1H)	11,07	-

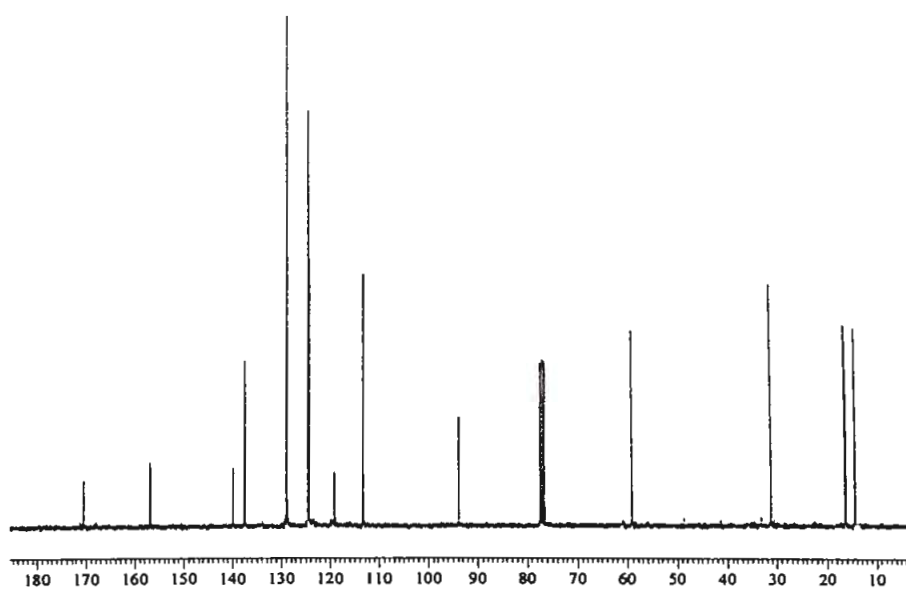
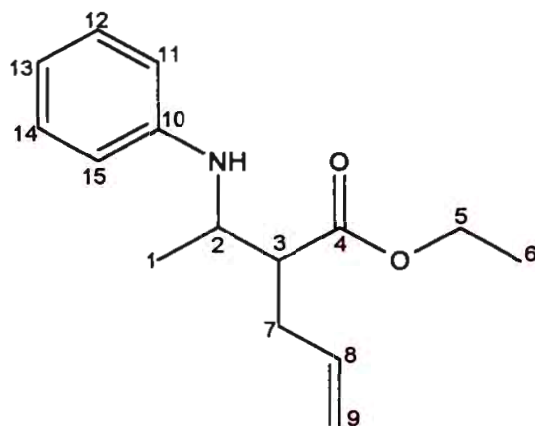


Figura 25 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -enamina (75 MHz, solvente:  $\text{CDCl}_3$ )

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C da β-enamina**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>
CDCl <sub>3</sub>	77,03
C-6	14,48
C-1	16,40
C-7	31,35
C-5	59,14
C-3	93,79
C-8	113,30
C-13	124,36
C-11 e C- 15	124,57
C-12 e C-14	128,87
C-9	137,54
C-10	139,85
C-2	156,89
C-4	170,54

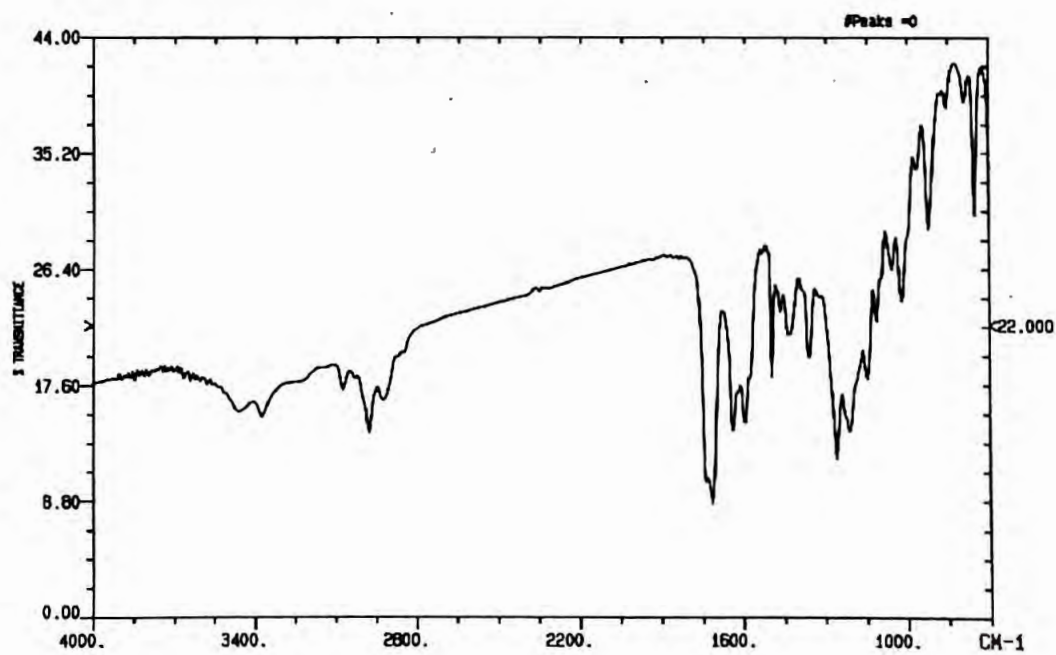
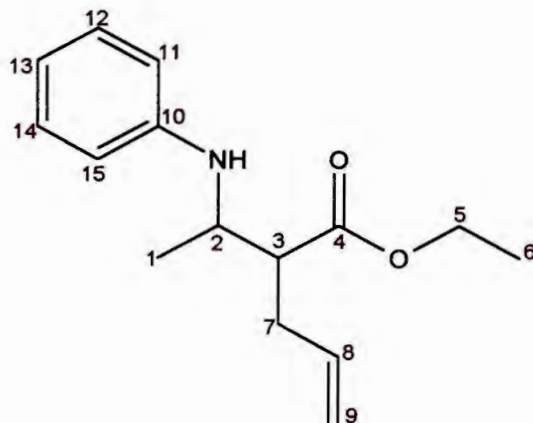
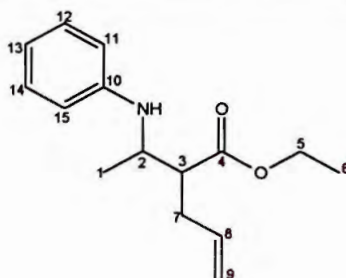


Figura 26 - Espectro IV da  $\beta$ -enamina, em pastilha de NaCl.



**Tabela IV – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para  $\beta$ -enamina**

**Fórmula Empírica: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> - Peso Molecular: 245,32 g/mol**



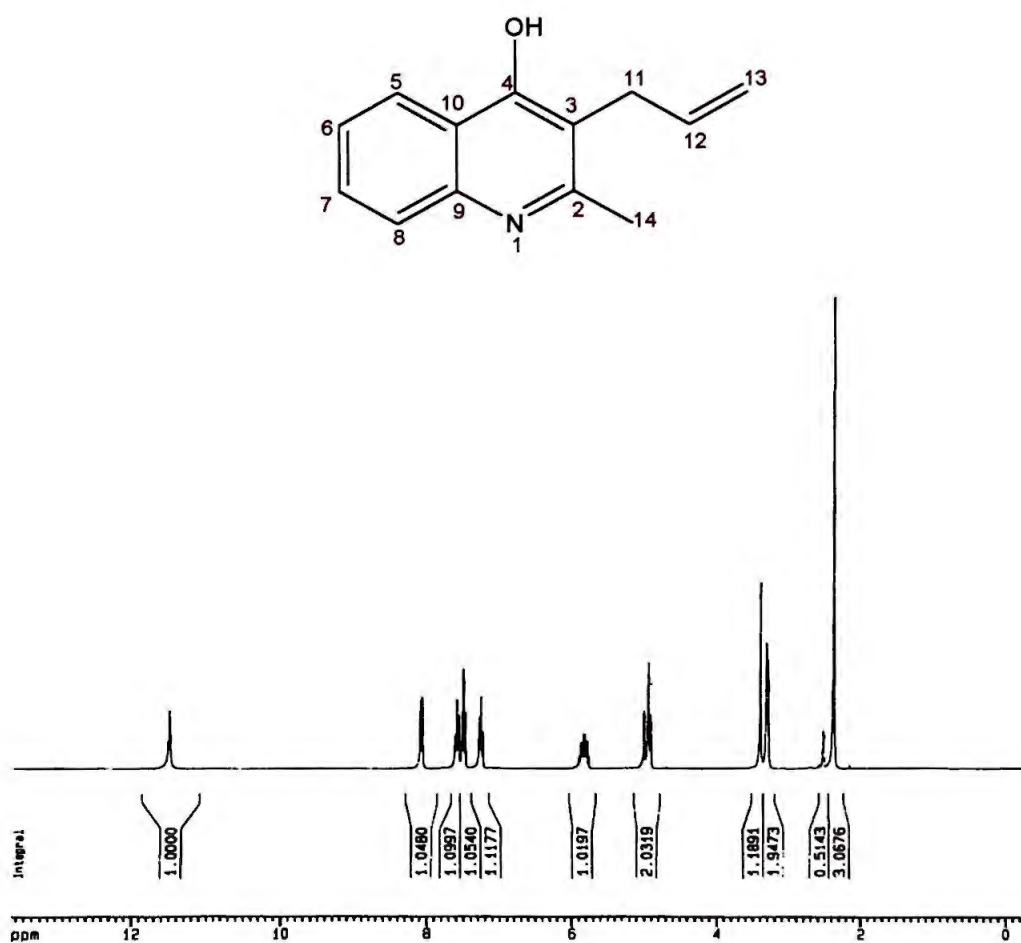
$\nu$ (KBr, cm <sup>-1</sup> )	Sinal
3460	$\nu$ N-H
3078	$\nu$ Ar-H
2982	$\nu$ assim C-H
2829	$\nu$ sim C-H
1726	$\nu$ C=O éster
1642	$\nu$ C=C
1598	$\nu$ C=C
1467 e 1363	$\delta$ C- H
1264	$\nu$ C-N
1216	$\nu$ C-O-C
752	$\delta$ C- H fora do plano

$\nu$  = estiramento ou deformação axial

$\delta$  = deformação ou deformação angular

#### 5.1.4. Análise espectrométrica da 2-metil-3-aliil-4-hidroxiquinolina

Os dados das análises espectrométricas encontram-se nas Figuras 27 (27 a, b, c, d, a 28 e na Tabela V)



**Figura 27 - Espectro de <sup>1</sup>H RMN da 2-metil-3-aliil-4-hidroxiquinolina (300 MHz, solvente: DMSO-d<sub>6</sub>).**

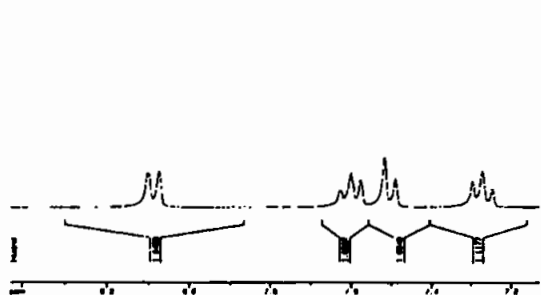


Figura 27a ampliado

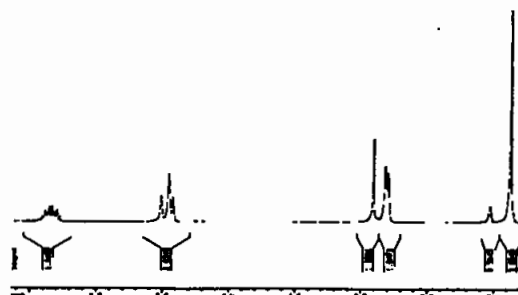


Figura 27b ampliado



Figura 27c irradiação

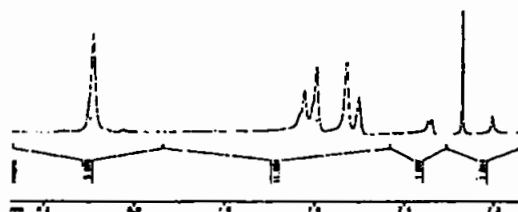
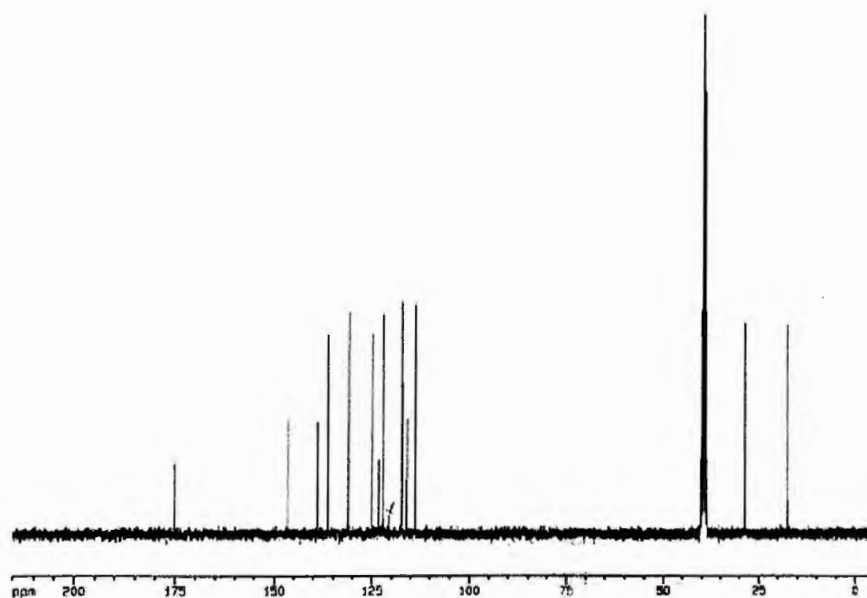
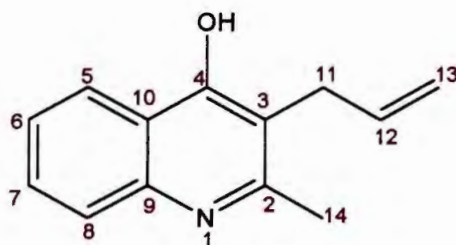


Figura 27d irradiação

Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina

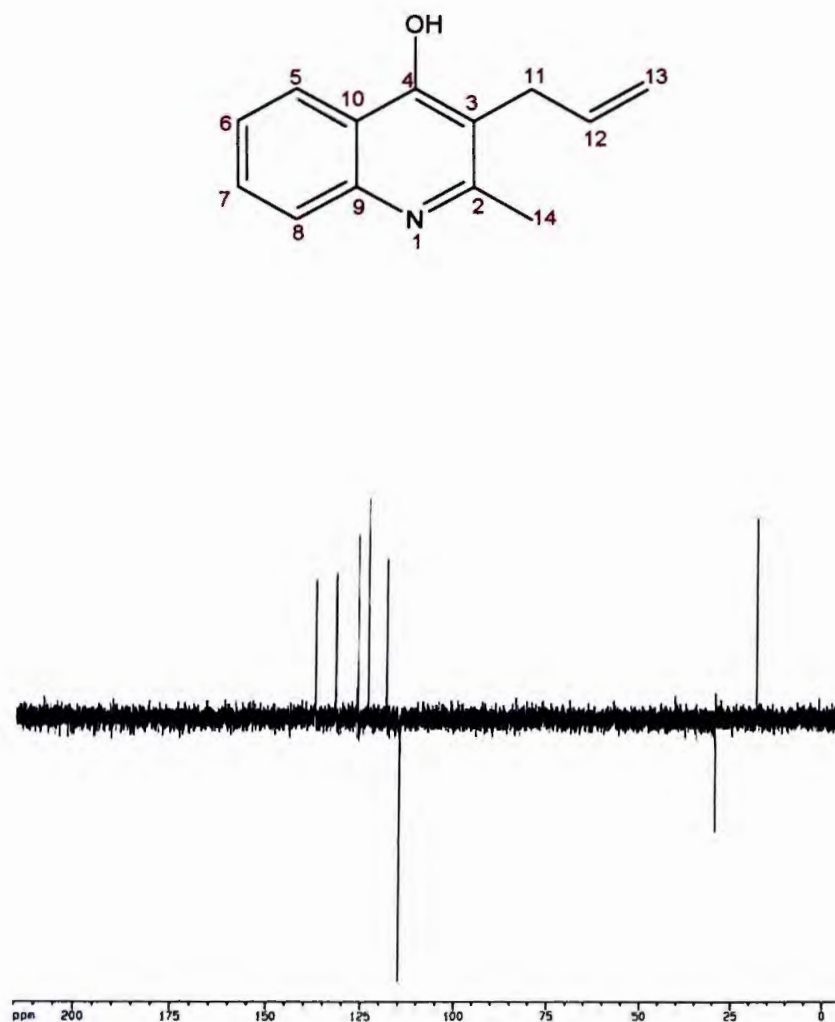
Grupo	δppm	J(Hz)
TMS	0	-
DMSO-d <sub>6</sub>	2,52	-
H <sub>2</sub> O	3,38	-
OH (s, 1H, (4))	11,50	-
H-5 (d, 1H)	8,08	8,10
H-7 (t, 1H)	7,60	8,10
H-8 (d, 1H)	7,50	8,10
H-6 (t, 1H)	7,27	8,10
H-12 (m, 1H)	5,77-5,93	-
H-13 trans (d, 1H)	4,98	17,00
H-13 cis (d, 1H)	4,94	9,90
H-11 (d, 1H)	3,30	5,94
H-14 (s, 3H)	2,38	-



**Figura 28 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  RMN da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina (75 MHz, solvente: DMSO-d6)**

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C da 2-metil-3-ailil-4-hidroxiquinolina**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>
DMSO-d <sub>6</sub>	39,426
C-4	175,42
C-2	147,00
C-9	139,41
C-12	136,66
C-7	131,23
C-5	125,34
C-10	123,61
C-6	122,64
C-8	117,73
C-3	116,64
C-13	114,28
C-11	28,90
C-14	17,62



**Figura 29 - Espectro DEPT - 135 da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina (75 MHz, solvente: DMSO-d6)**

Sinais de carbono primários (CH<sub>3</sub>) e terciários (CH) positivos e secundários (CH<sub>2</sub>) negativos.

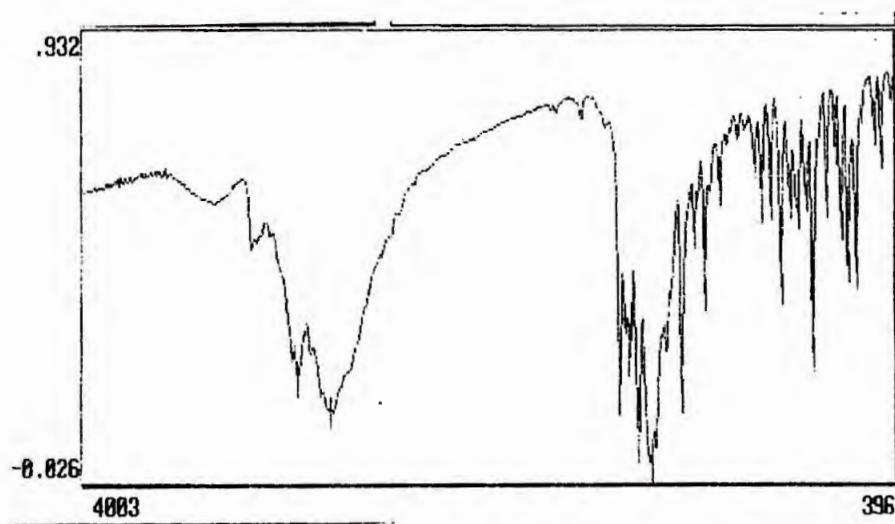
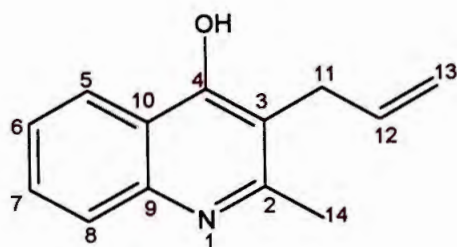
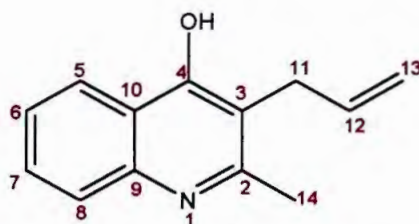


Figura 30 - Espectro IV da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina, em KBr

**Tabela V - Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para 2-metil-3-ailil-4-hidroxiquinolina**

**Fórmula Empírica: C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO - Peso Molecular: 199 g/mol**

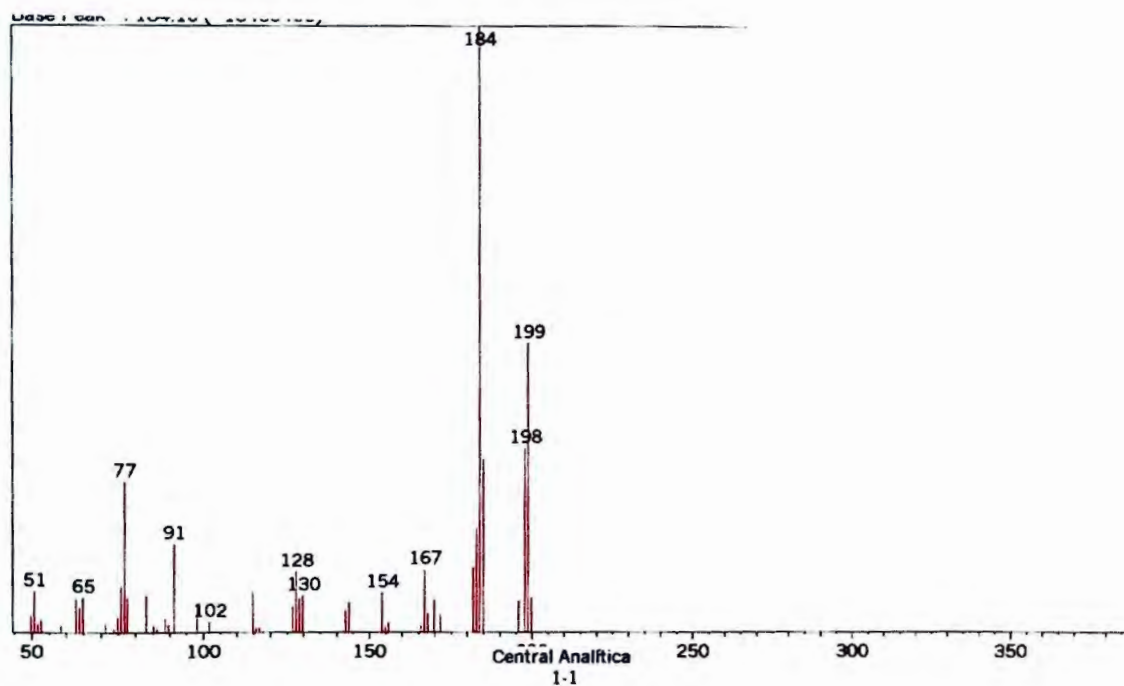
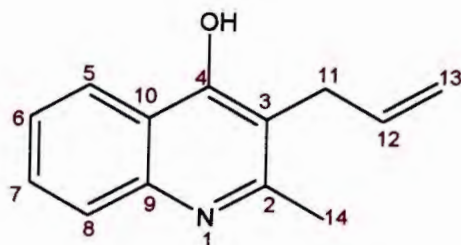


v (KBr, cm-1)	sinal
3448	v (OH, banda larga)
3274	v (Ar-H)
3066	v (Ar-H)
2928	v (assim. CH <sub>3</sub> , v sim CH <sub>3</sub> , v assim CH <sub>2</sub> , v sim CH <sub>2</sub> ).
1638	v (C=N) e v C=C
1592 e 1552	v (C=C)
1488	δ sim CH <sub>2</sub> e δ assim CH <sub>2</sub>
1375	δ sim CH <sub>3</sub>
1350	δ O-H no plano
1253	v (COH)
756	δ Ar -H fora do plano
696	δ OH fora do plano,

v= estiramento ou deformação axial

δ= deformação ou deformação angular



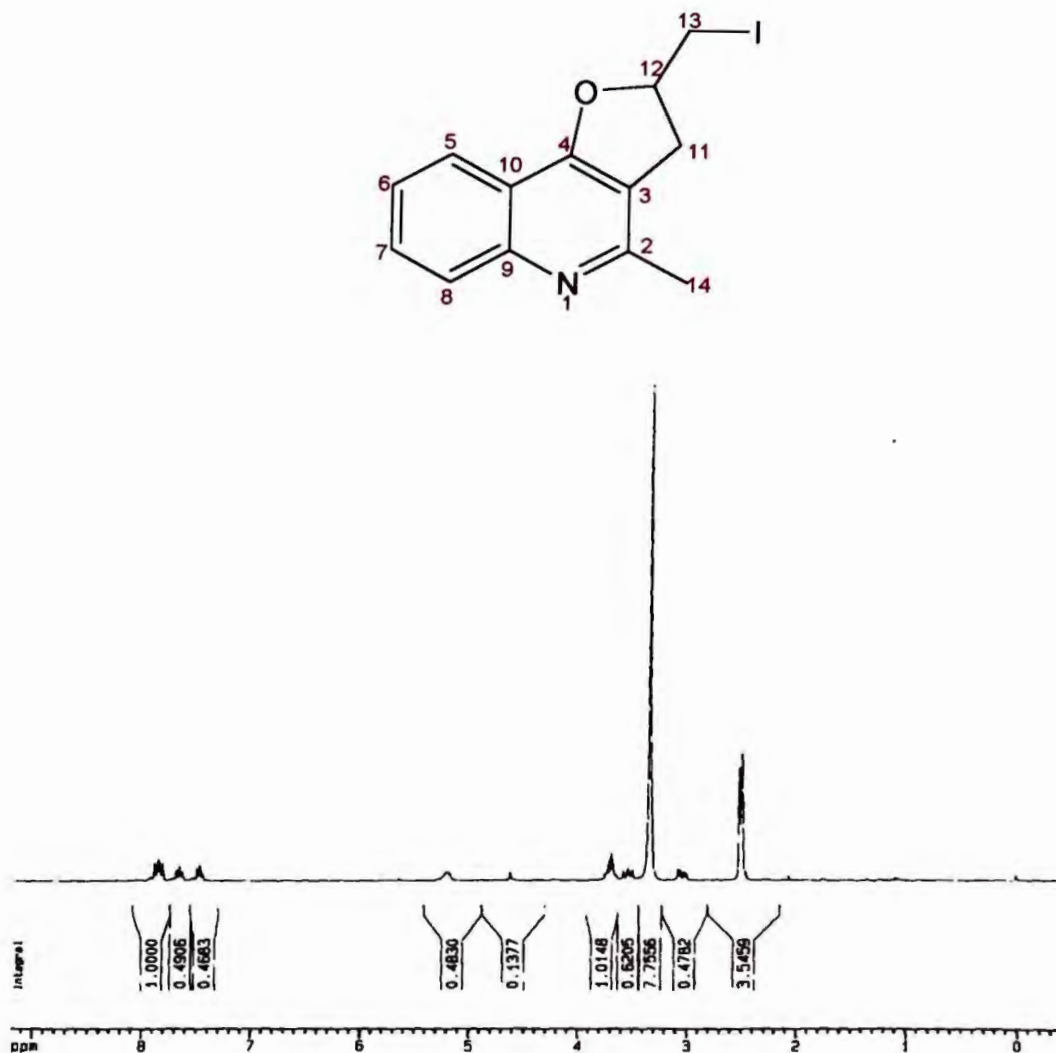


**Figura 31 -Espectro de massas da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina.**

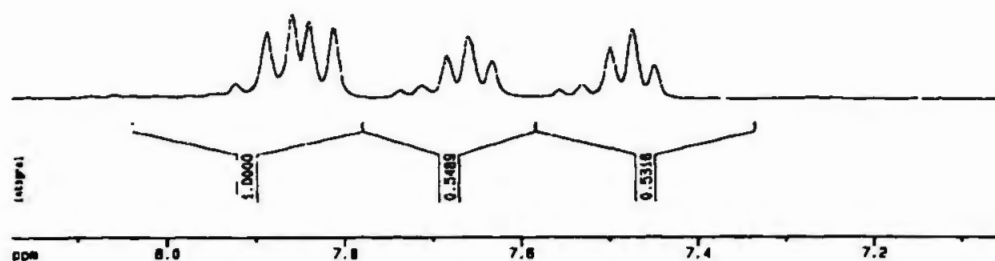
**m/z(int.rel)M<sup>+</sup> 199, (100), 198,184,167,154,91,77,65,51.**

### 5.1.5. Análise espectrométrica do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-dihidrofurano [3,2-c] quinolina

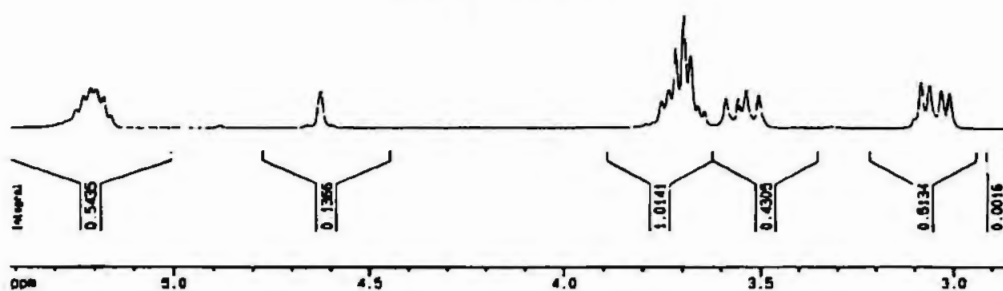
Os dados das análises espectrométricas encontram-se nas Figuras 32 a, 32b a 36 e na Tabela VI.



**Figura 32 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-dihidrofurano [3,2-c] quinolina (300 MHz, solvente:  $\text{DMSO-d}_6$ ).**



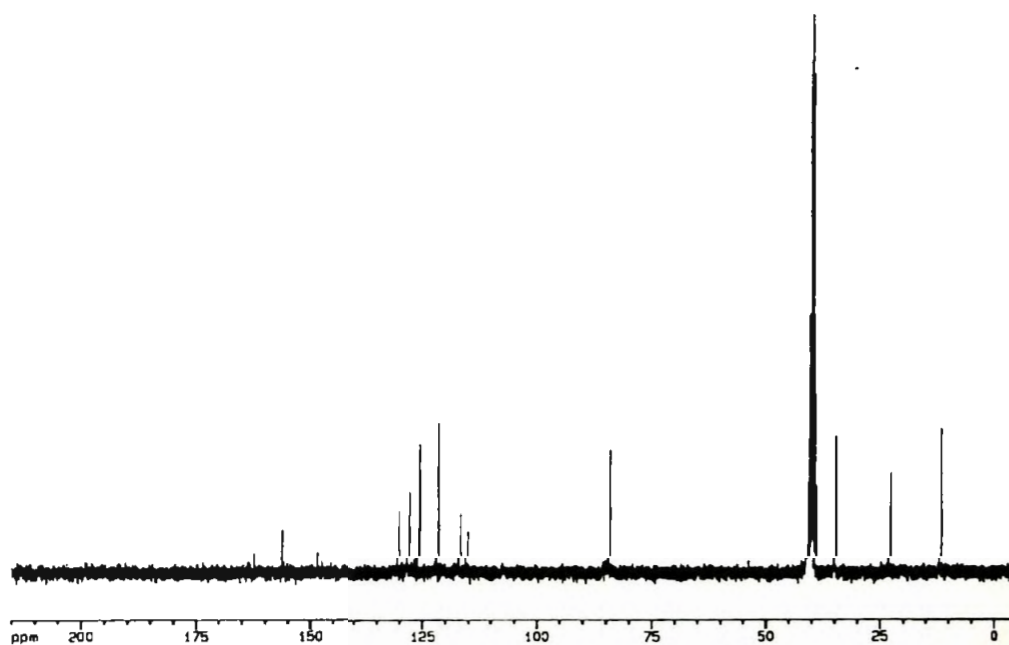
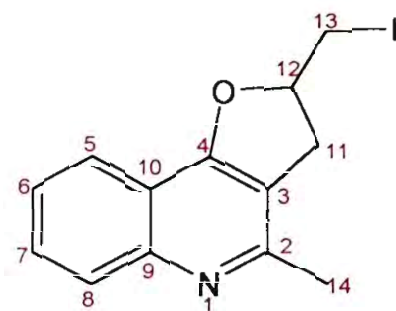
32a ampliado



32b ampliado

Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina

Grupo	$\delta$ ppm	J(Hz)
TMS	0	-
DMSO-d <sub>6</sub>	2,52	-
H <sub>2</sub> O	3,38	-
H-5 (d, 1H)	7,87	8,10
H-8 (d, 1H)	7,83	8,10
H-7 (t, 1H)	7,66	8,10
H-6 (t, 1H)	7,47	8,10
H-12 (m, 1H)	5,18-5,25	-
H-13 ,13' (m, 1H)	3,64-3,76	-
H-11 (dd, 1H)	3,55	9,7 e 15,7
H-11' (dd, 1H)	3,05	6,6 e 15,7
H-14 (s, 3H)	2,53	-



**Figura 33 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina (75 MHz, solvente: DMSO-d6)**

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-dihidrofurano [3,2-c] quinolina**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>
DMSO-d <sub>6</sub>	39,426
C-4	162,45
C-2	156,27
C-9	148,40
C-7 ou C-8	130,57
C-8 ou C-7	128,34
C-5	126,05
C-6	121,94
C-10 ou C-3	117,18
C-3 ou C-10	115,70
C-12	84,44
C-11	35,16
C-14	23,11
C-13	12,049

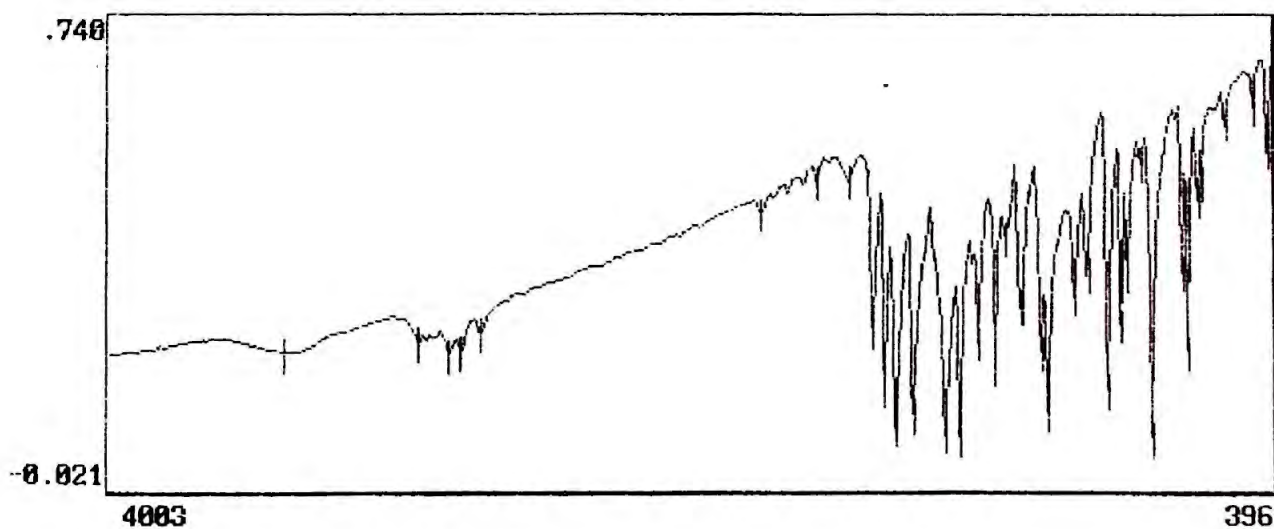
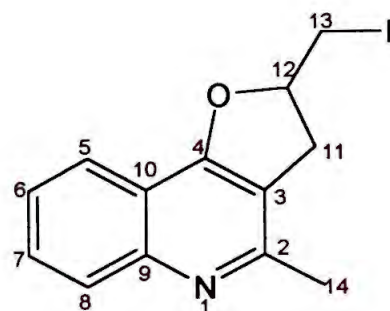
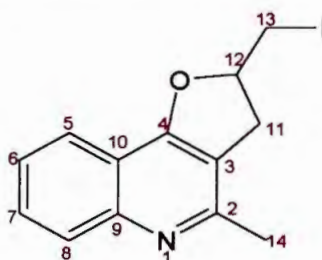


Figura 34 - Espectro IV do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c]quinolina , em pastilhas de KBr.

**Tabela VI – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para o derivado 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina**

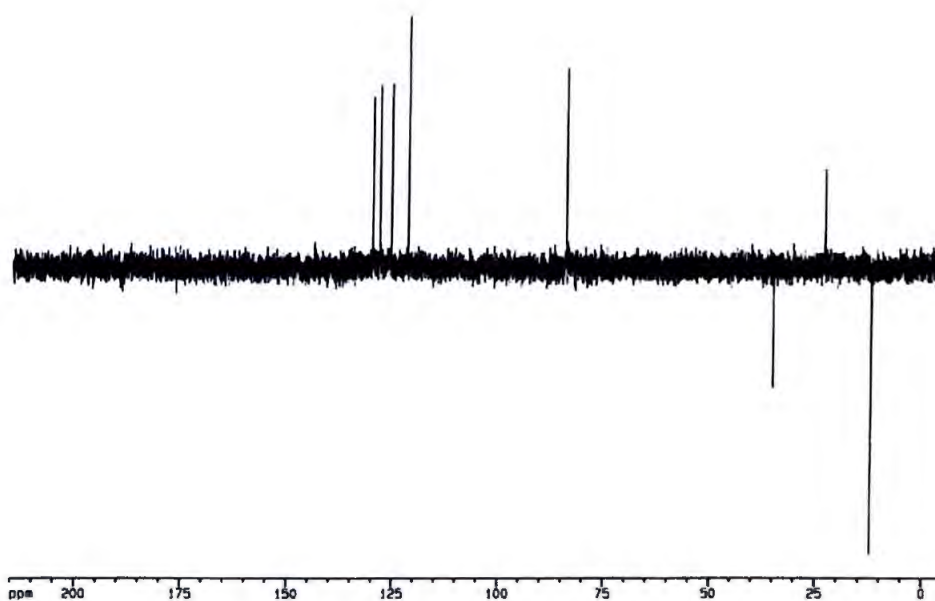
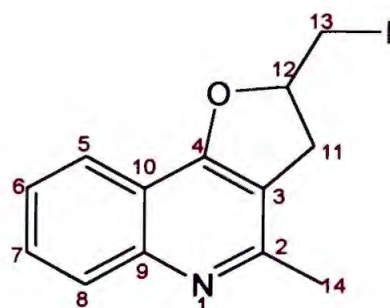
**Fórmula Empírica: C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>NOI - Peso Molecular: 325 g/mol**



v (KBr, cm <sup>-1</sup> )	Sinal
3050	v Ar-H
2963,2911	v assim.CH <sub>2</sub>
2859	v sim CH <sub>2</sub>
1644	v C=N e v C=C
1592,1550,1505	v C=C
1418	δ CH <sub>2</sub>
1331	v assim C-O-C
1158	v CH <sub>2</sub> -I
1089	v sim C-O-C
777	δ Ar-H fora do plano

v = estiramento ou deformação axial

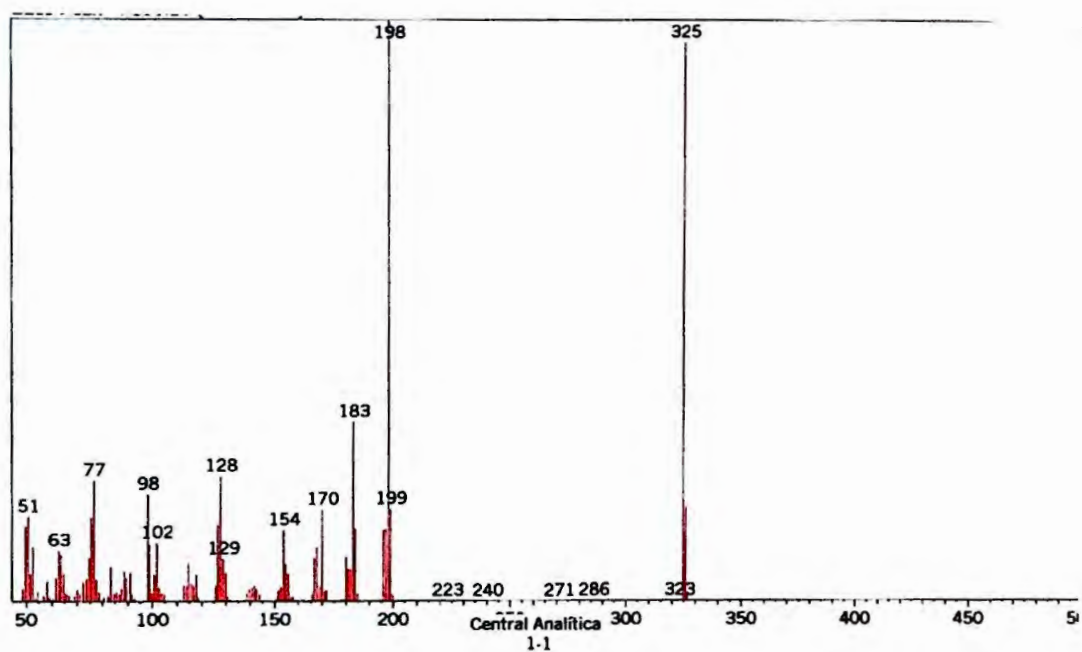
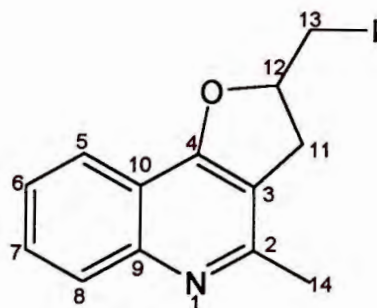
δ = deformação ou deformação angular



**Figura 35 - DEPT 135 ° do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina (75 MHz, solvente: DMSO-d6)**

Sinais de carbono primários (CH<sub>3</sub>) e terciários (CH) positivos, secundários(CH<sub>2</sub>) negativos.



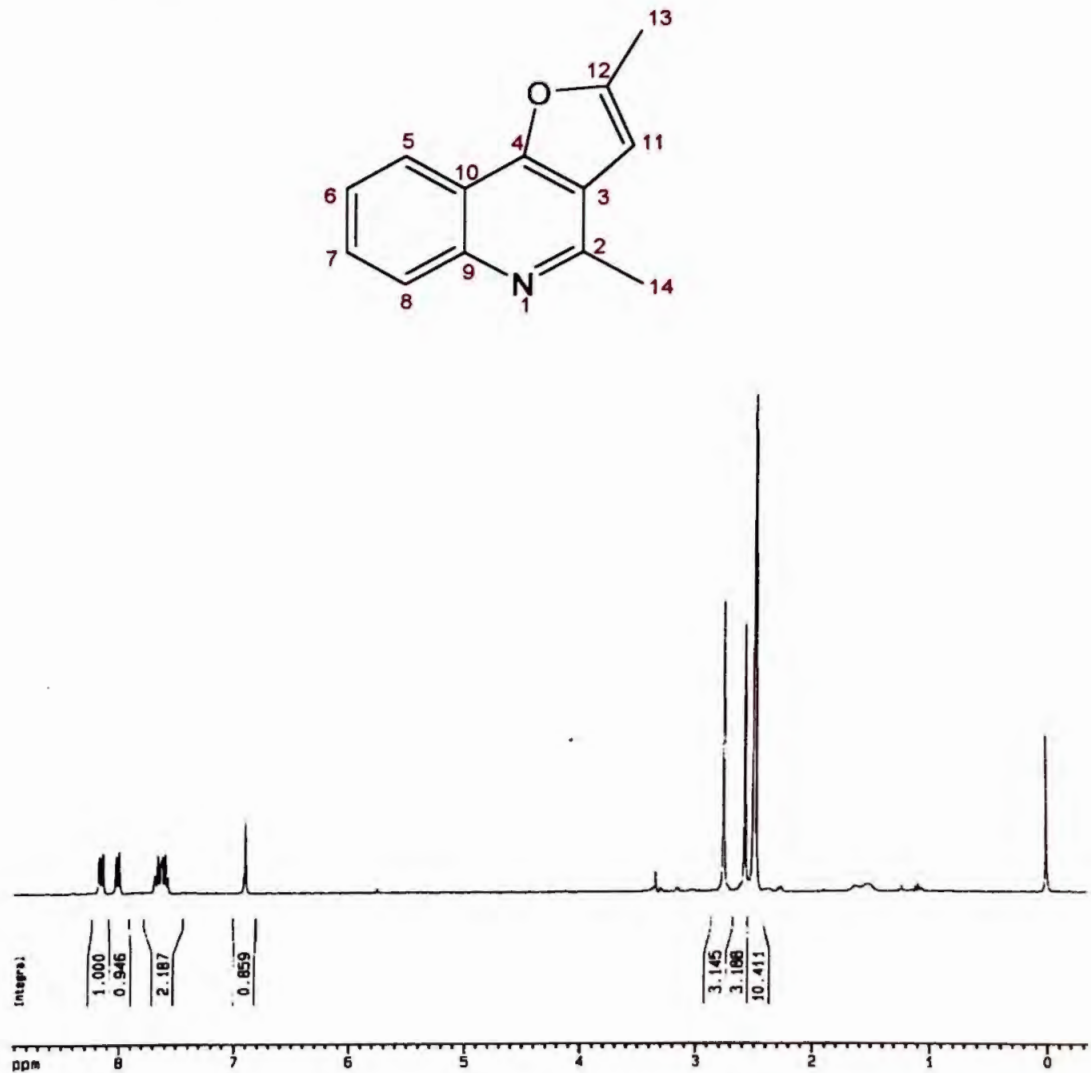


**Figura 36 - Espectro de massas do 2-(iodometil)-4-metil-2,3-dihidrofurano [3,2-c] quinolina**

**m/z(int.rel)M<sup>+</sup> 325(100), 199, 198, 83,128,98, 77,63, 51.**

### 5.1.6. Análise espectrométrica da 2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina

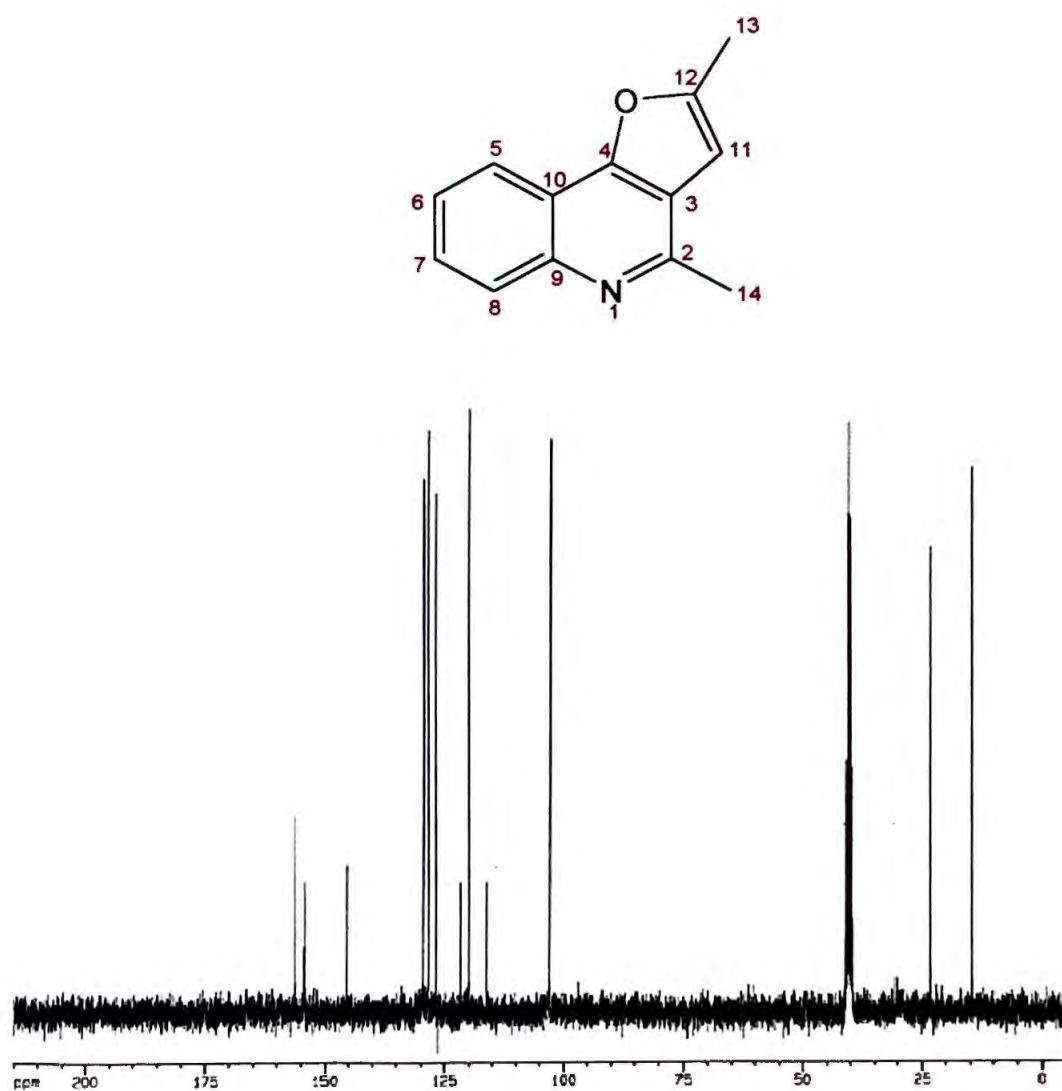
Os dados das análises espectrométricas encontram-se nas Figuras 37 a 41 e na Tabela VII.



**Figura 37 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do 2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina (300 MHz, solvente: DMSO-d<sub>6</sub>).**

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>1</sup>H do 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>	<b>J(Hz)</b>
TMS	0	-
DMSO-d <sub>6</sub>	2,52	-
H <sub>2</sub> O	3,38	-
H-5 (d, 1H)	8,16	7,9
H-8 (d, 1H)	8,02	7,9
H-7 (t, 1H)	7,67	7,9
H-6 (t, 1H)	7,61	7,9
H-11 (s, )	6,91	-
H-13 (s, )	2,77	-
H-14 (s, )	2,58	-



**Figura 38 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina (75 MHz, solvente: DMSO- $\text{d}_6$ )**

**Atribuição dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C do 2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina**

<b>Grupo</b>	<b>δppm</b>
DMSO-d <sub>6</sub>	39,426
C-4	156,28
C-2 ou C-12	154,11
C-12 ou C-2	154,36
C-9	145,31
C-7 ou C-8	129,52
C-8 ou C-7	128,50
C-5	126,85
C-6	120,05
C-10 ou C-3	116,21
C-3 ou C-10	121,85
C-14	23,23
C-13	14,15

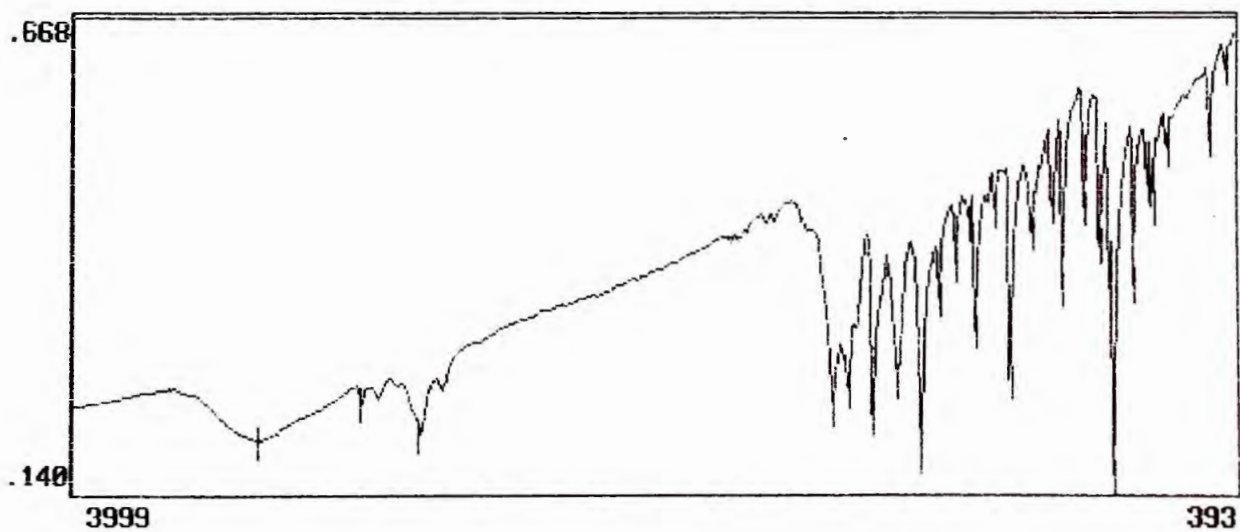
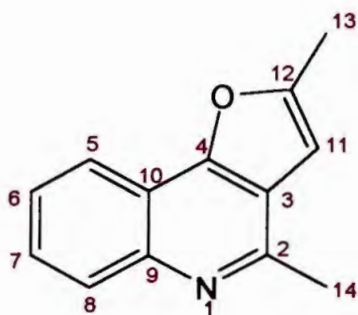
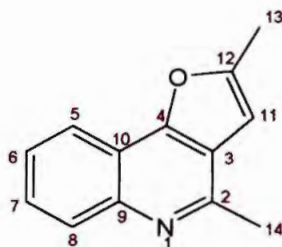


Figura 39 - Espectro IV do 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina em pastilhas de KBr

**Tabela VII – Dados obtidos a partir da espectrofotometria no IV para o  
2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina**

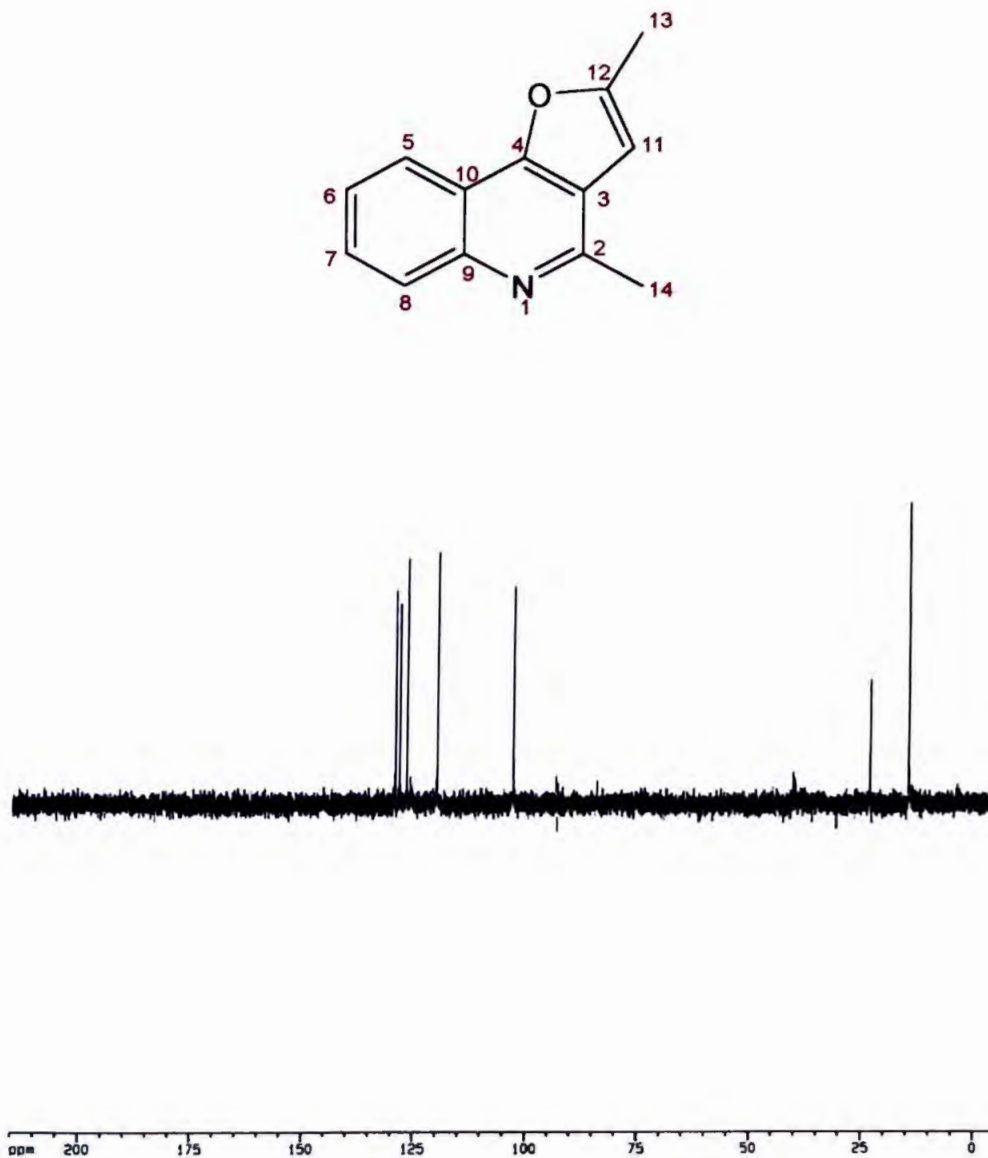
**Fórmula Empírica: C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO Massa Molecular: 197,24 g/mol**



$\nu$ (KBr) $\text{cm}^{-1}$	Sinal
3096,3045	$\nu$ Ar-H
2924	$\nu$ assim. CH <sub>3</sub> e $\nu$ ass CH <sub>2</sub>
2855	$\nu$ assim CH <sub>3</sub> , $\nu$ sim CH <sub>2</sub>
1658	$\nu$ C=N e $\nu$ C=C
1589,1520	$\nu$ C=C
1438	$\delta$ CH <sub>2</sub> , $\delta$ ass CH <sub>3</sub>
1364	$\delta$ sim CH <sub>3</sub>
1250	$\nu$ assim C-O-C
1086	$\nu$ sim C-O-C
774	$\delta$ Ar-H fora do plano

$\nu$  = estiramento ou deformação axial

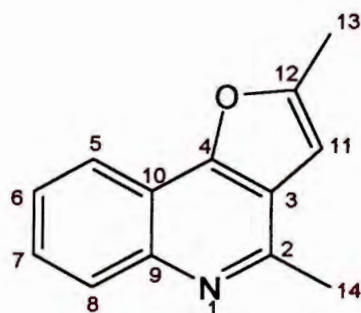
$\delta$  = deformação ou deformação angular



**Figura 40 - DEPT 135° do 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina. (75 MHz, solvente: DMSO-d<sub>6</sub>)**

Sinais de carbono primários (CH<sub>3</sub>) e terciários (CH) positivos.





Scan # : 348  
 Mass Peak # : 141 Ret. Time : 3.392  
 Base Peak : 197.20 ( 307718)

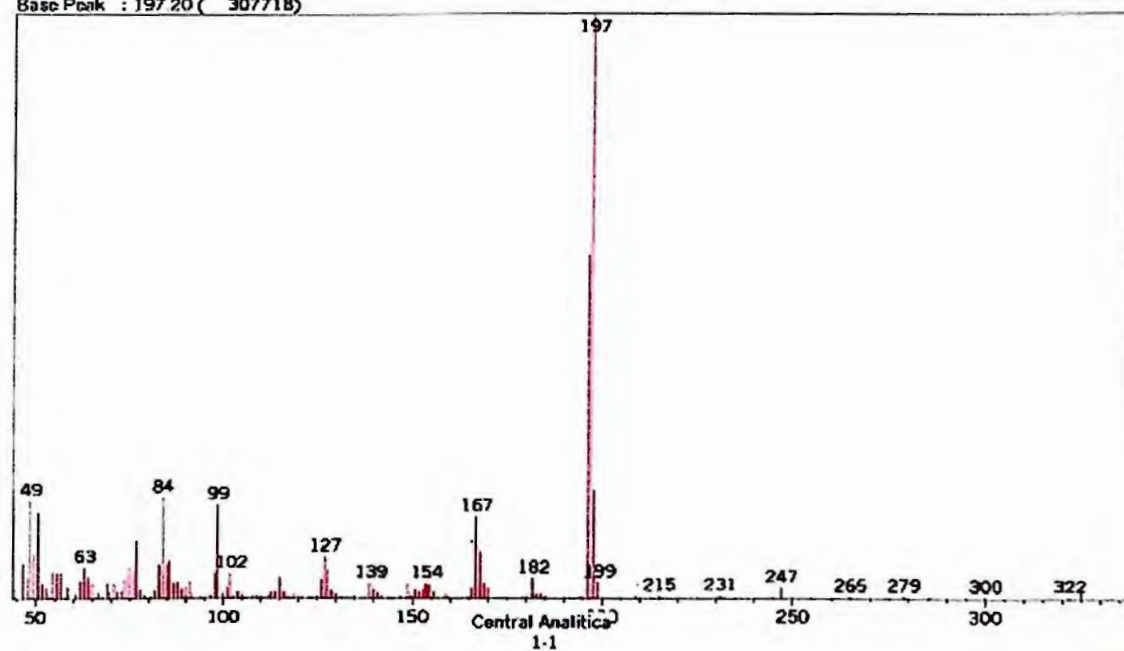


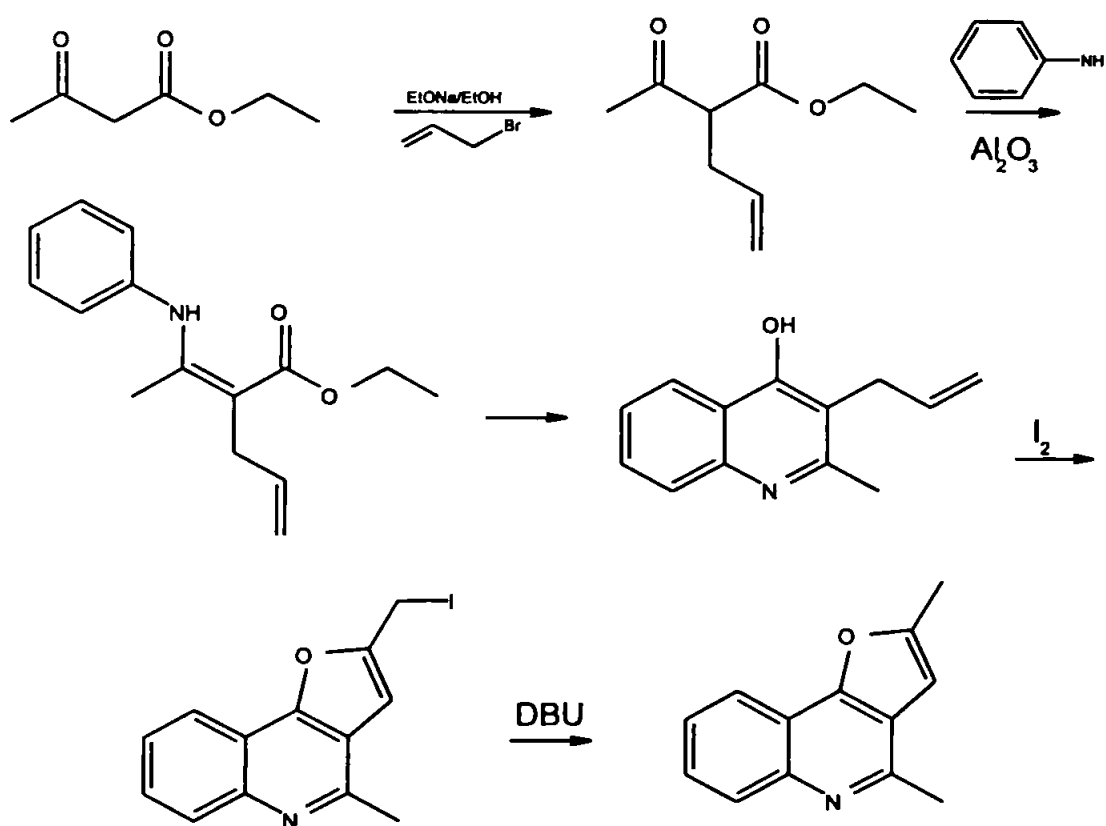
Figura 41 - Espectro de massas do 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina.

$m/z(\text{int. rel}) M^+$  197(100), 199, 182, 167, 154, 127, 99, 84, 77, 63, 49.

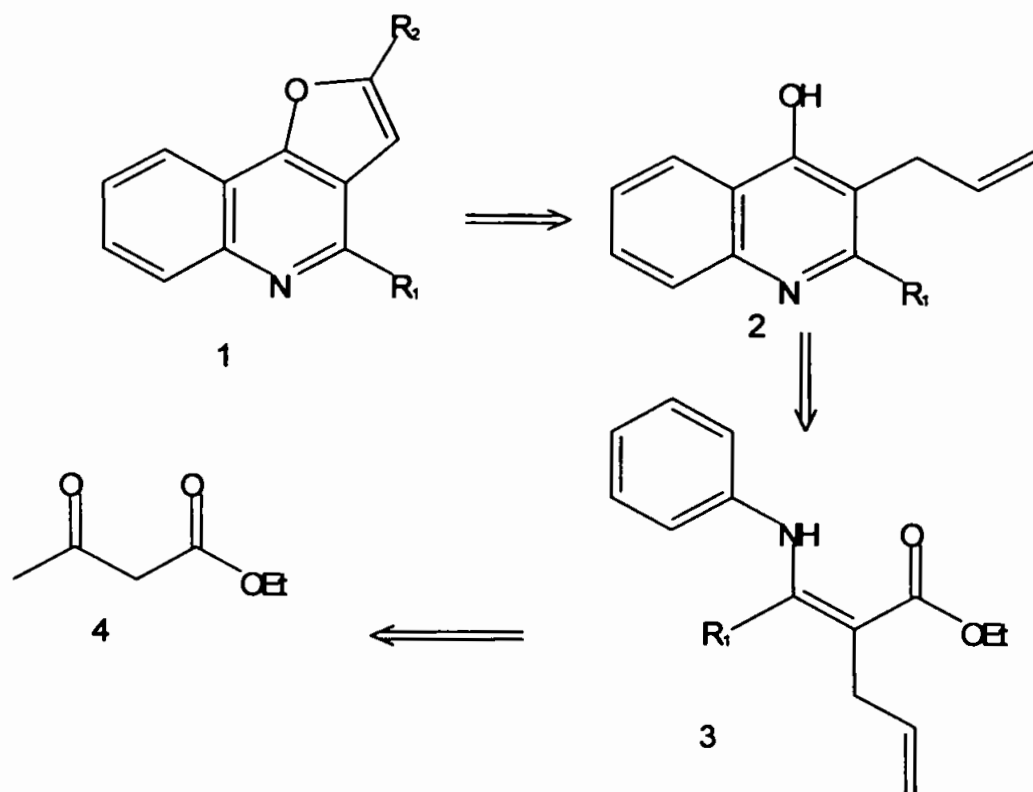
## 6 – DISCUSSÃO

## 6.1- Síntese e Identificação

## Esquema geral da síntese do composto furanoquinolinico

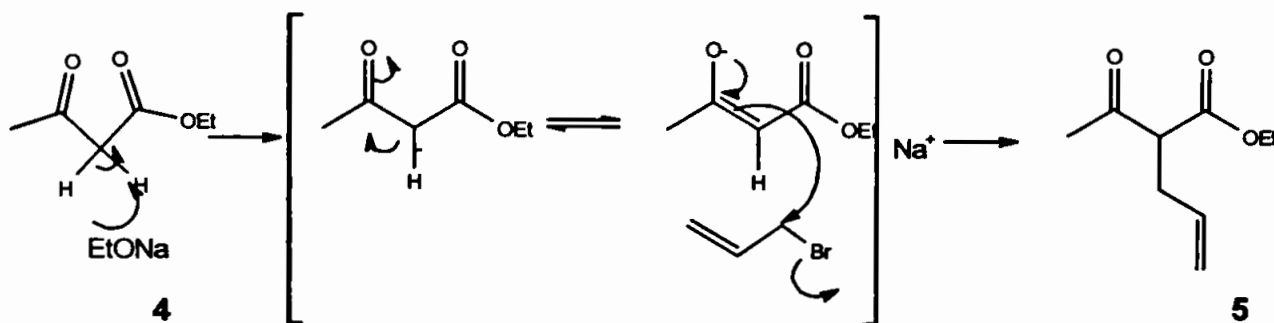


Analisando o esquema abaixo podemos ver que o produto sintetizado 1 poderia derivar da quinolina 2 por meio de uma ciclização e posterior eliminação do eletrófilo, neste caso iodo. Por sua vez, o intermediário 2 seria proveniente da enamina 3, que finalmente poderia provir de derivados do acetoacetato de etila 4.



### $\beta$ -dicarbonílico

Como já visto anteriormente, nossa estratégia baseia-se na utilização do acetoacetato de etila como matéria-prima, reagente de baixo custo e de fácil acesso. Dessa maneira, preparamos inicialmente o 2-alil-acetoacetato de etila **5**, por meio da alquilação no C2 do acetoacetato de etila **4**, após tratamento com etóxido de sódio utilizando como agente alquilante o brometo de alila (MARVEL *et al.*, 1948).

**Mecanismo da reação.**

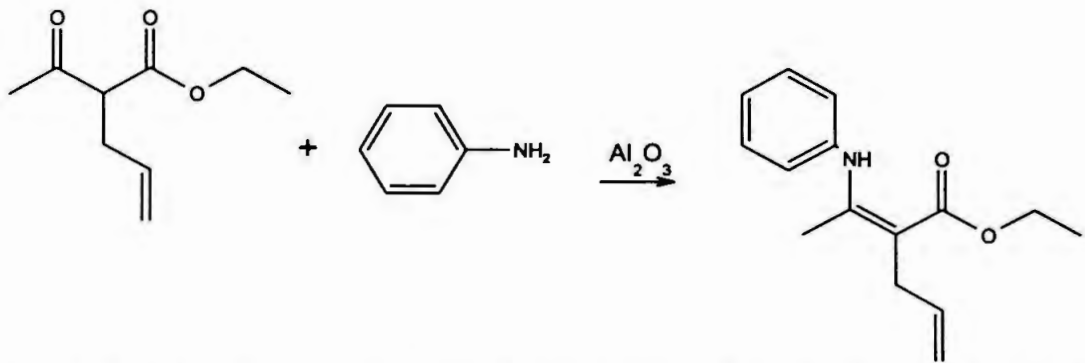
O átomo de oxigênio do grupo etóxido carrega uma carga negativa e abstrai o hidrogênio na posição  $\alpha$  (mais ácido) do acetato de etila. O hidrogênio sai na forma de próton (+H) e, portanto, sobra um par de elétrons não compartilhado no acetoacetato (carbânion). Este, atuando como nucleófilo, ataca o carbono alílico formando um produto monoalquilado.

A confirmação da estrutura do composto obtido foi observada por meio do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O tripleto em 3,5 ppm indica acoplamento com  $\text{CH}_2$  do grupo alila. Em 2,5-2,6 ppm temos um multipletto referente ao  $\text{CH}_2$  alílico e os sinais da ligação dupla em 4,9-5,1 e 5,5-5,8 ppm respectivamente. Os sinais de  $^{13}\text{C}$  para o grupo alila encontram-se em 29,40 ppm ( $\text{CH}_2$ ), 117,4 ( $=\text{CH}_2$ ) e 135,51 ( $=\text{CH}$ ), respectivamente.

No espectro do IV aparecem absorções referentes a estiramento  $\text{C}=\text{O}$  da carbonila e do éster respectivamente em  $1718\text{ cm}^{-1}$  e  $1740\text{ cm}^{-1}$ .

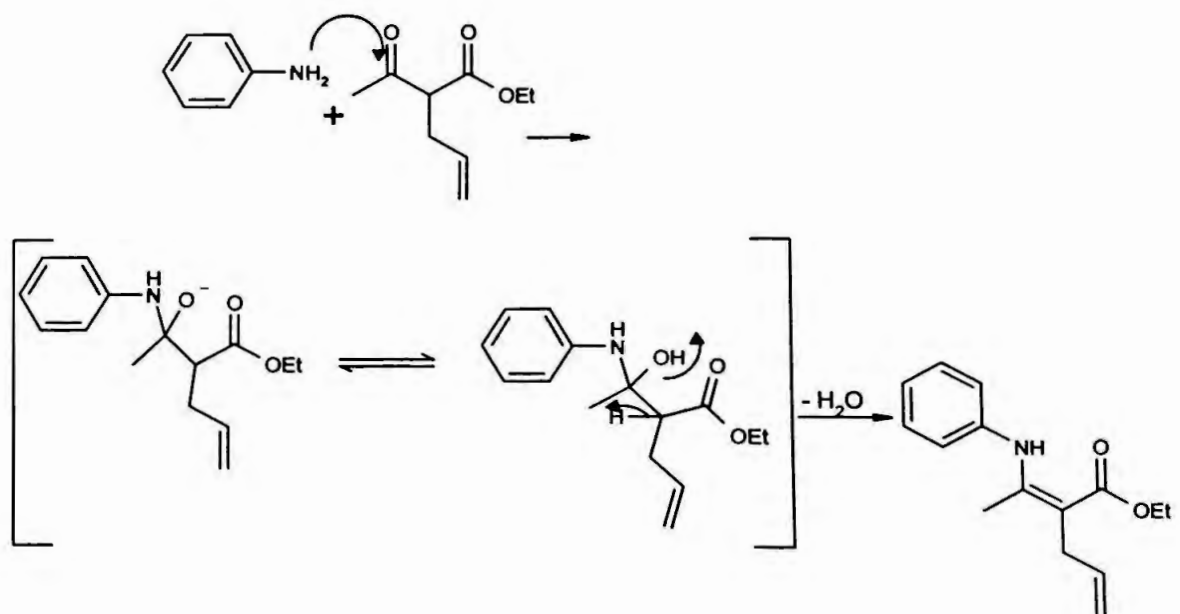
A absorção referente ao estiramento da ligação vinílica ( $\nu\text{ C}=\text{C}$ ) aparece em  $1642\text{ cm}^{-1}$ , enquanto a absorção  $\text{C}-\text{H}$  ligado ao grupo vinílico, em  $3080\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento assimétrico e simétrico dos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  aparecem em  $2984$  e  $2935\text{ cm}^{-1}$ , ao passo que a deformação em  $1435$  e  $1364\text{ cm}^{-1}$ .

**$\beta$ -enaminoéster**



Em nosso estudo, seguiu-se a metodologia de Braibante (1990), em que se descreve a obtenção de  $\beta$ -enaminonas, com altos rendimentos e em condições brandas, utilizando-se alumina neutra  $\text{Al}_3\text{O}_3$ , como suportes sólidos e em meio homogêneo (BRANDT, *et al.*, 1991; FERRAZ, *et al.*, 1995).

**Mecanismo da reação**



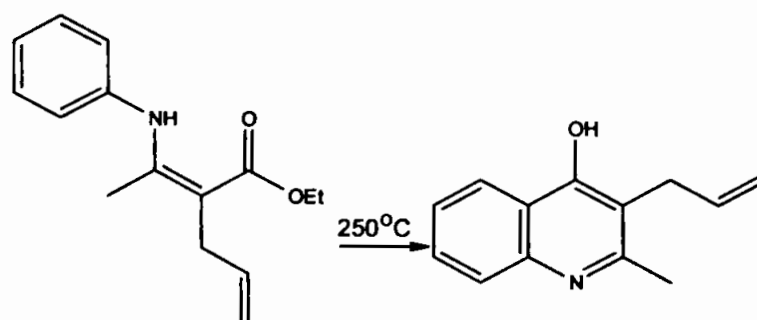
A carbonila cetônica do acetoacetato de etila  $\alpha$  alquilado sofre ataque nucleofílico do nitrogênio da anilina, a qual adicionou-se a carbonila, com posterior eliminação de uma molécula de água, gerando a enamina.

A estrutura da  $\beta$ -enamina obtida foi confirmada por espectrofotometria de IV, pela banda em 3460 e 3378  $\text{cm}^{-1}$  referente ao NH e em 3078  $\text{cm}^{-1}$  referente ao anel aromático. As atribuições 2982 e 2829  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H do alcano ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ). As bandas 1642  $\text{cm}^{-1}$  e 1598  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações de estiramento da ligação vinílica. A banda 1726  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento C-O do éster e o estiramento da ligação C-N com banda em 1264  $\text{cm}^{-1}$ .

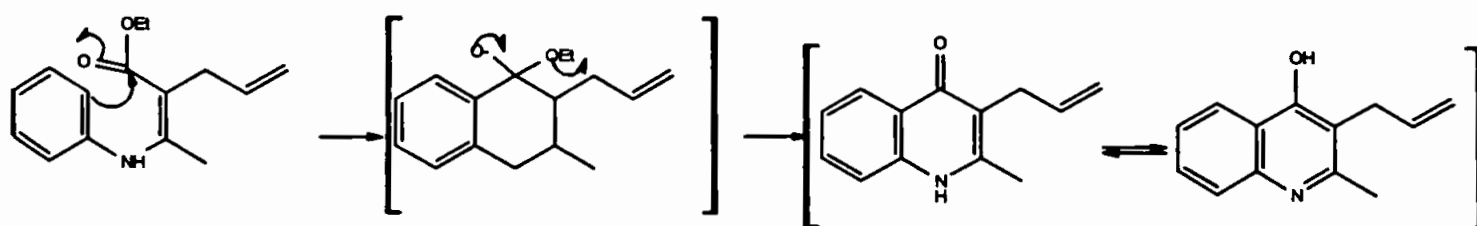
Por outro lado, o estiramento da ligação C=O do éster ocorre acima de 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Por RMN de  $^1\text{H}$ , observamos o desaparecimento do triplete em 3,50 ppm, indicando sua transformação em carbono quaternário. Além, disso temos os sinais na região entre 7 e 8 ppm referentes ao anel aromático. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observamos desaparecimento do carbono C-3 em 58,95 ppm e o surgimento do mesmo em 93,9 ppm, referente ao C-3. Ainda observamos o desaparecimento do C da cetona do substrato, em 202 ppm, e o surgimento do sinal referente a enamina em 156,90 ppm. Além disso, temos os sinais referentes ao anel aromático.

## **2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina**

Para a formação do anel quinolínico foi usado a método de Conrad-Limpach ou seja, ciclização térmica (aquecimento a 250 °C) sendo a reação mais geral na preparação das quinolinas, partindo de aminas aromáticas e  $\beta$ -cetoésteres.



### Mecanismo da reação



O oxigênio da carbonila atrai os elétrons da ligação carbonílica, deixando o carbono suscetível ao ataque por um nucleófilo, elétrons  $\pi$  de um dos carbonos do anel aromático. Há perda de um próton ligado ao nitrogênio da anilina e ocorre eliminação de etanol.

A obtenção do anel quinolínico foi confirmada por espectrometria de massas,  $M^+=199$ . Por espectroscopia no infravermelho observamos uma banda larga em  $3448\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo hidroxila (OH), atribui-se às vibrações de estiramento e  $1350\text{ cm}^{-1}$  são às vibrações de deformação no plano, e ainda o sinal em  $1638\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C=N e C=C. Por RMN de hidrogênio, temos um singlete em 11,50 ppm correspondente ao OH. Observamos o desaparecimento dos sinais referentes ao grupo

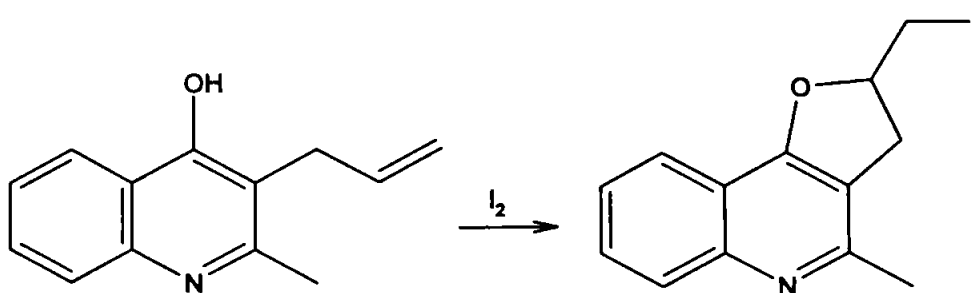
etoxila, em 1,2 e 4,1 ppm e seus correspondentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , em 13 e 60 ppm, respectivamente. Observamos também mudanças nos sinais na região correspondente a anéis aromáticos, tanto no espectro de  $^1\text{H}$  quanto de  $^{13}\text{C}$ .

Para atribuir os sinais dos hidrogênios dos carbonos 6 e 7 que absorvem na forma de tripleto figura 27a ampliado, foi feita uma dupla irradiação do hidrogênio do carbono 5. Devido à influência do grupo hidroxila, o H5 é o hidrogênio aromático observado na forma de dubleto em campo mais baixo (8,08 ppm), apresentado em forma de singleto na figura 27c. Após a dupla irradiação, o sinal que absorve na forma de tripleto em 7,27 ppm transformou-se em dubleto na mesma figura anteriormente mencionada. Nesta forma, este sinal foi atribuído para o hidrogênio do carbono 6 e o sinal na forma de tripleto em 7,59 ppm para hidrogênio do carbono 7, observando-se os sinais na forma de singleto na figura 27d após as duas irradiações.

Depois de fazer às atribuições dos hidrogênios, foram confirmados os átomos de carbono da estrutura com espectro HMQC.

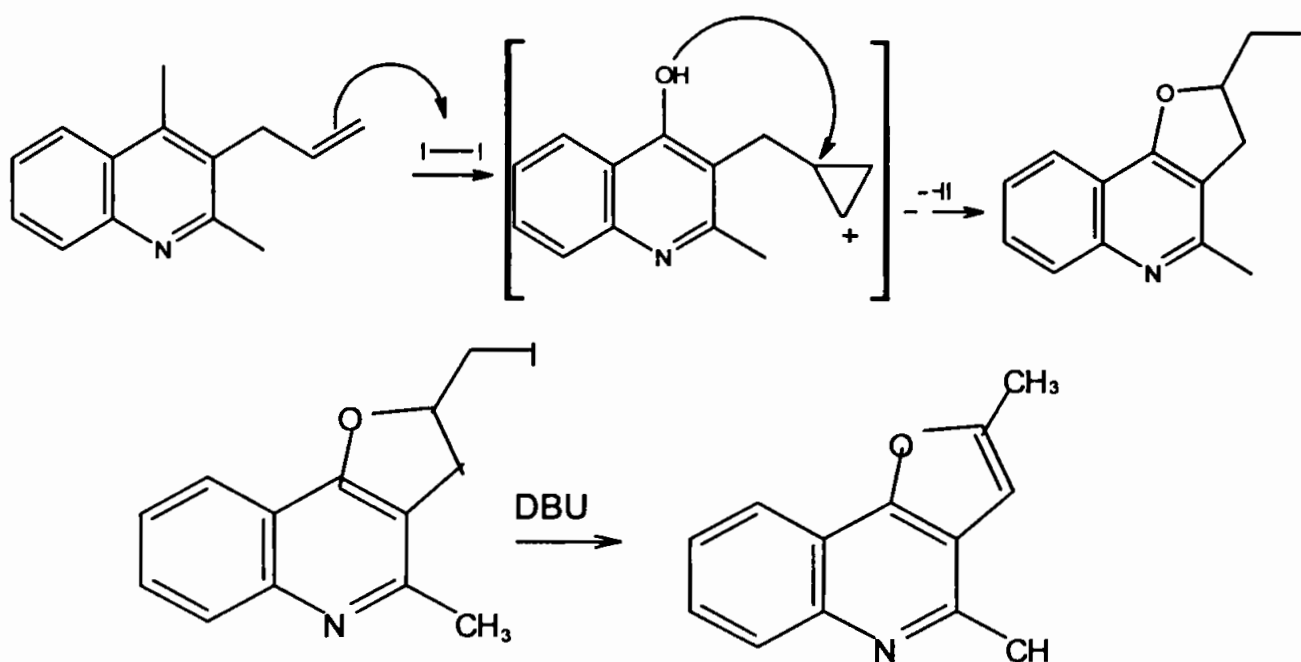
### 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina

O derivado quinolínicó foi então ciclizado com iodo eletrófilo.





## Mecanismo da reação



3

Os elétrons  $\pi$  da ligação dupla atacam o iodo, sendo que este se adiciona à mesma formando um intermediário iodônio, que sofre ataque nucleofílico intramolecular pela hidroxila ligada ao anel quinolínico, formando-se assim o diidrofurano.

A obtenção do produto foi confirmada por análise elementar, além de massas, IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

No espectro de massas, a estrutura do produto é confirmada pelo íon molecular,  $M^+ = 325$  e o principal fragmento, com massas 198, indicando a perda de iodo. No infravermelho temos a confirmação principalmente pela banda em  $1158\text{ cm}^{-1}$  da ligação  $\text{CH}_2-\text{I}$  e  $1089\text{ cm}^{-1}$  da ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ .

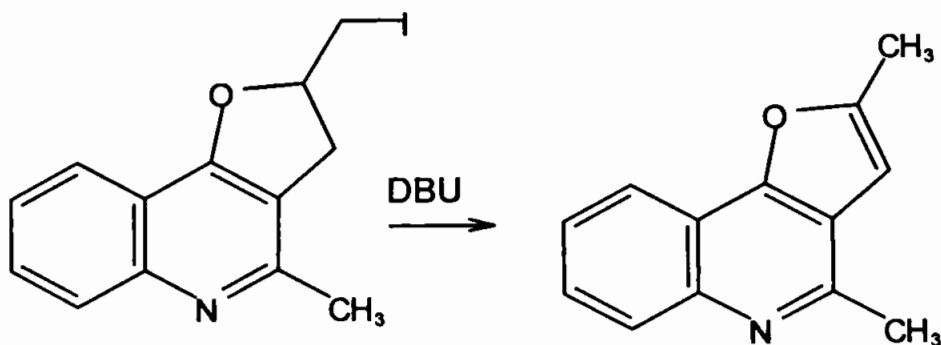
No espectro de RMN de hidrogênio, temos um multiplete em 5,18 – 5,25 ppm correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. O multiplete em 3,64 – 3,76 ppm refere-se aos hidrogênios do carbono ligado ao iodo. Além disso temos o deslocamento dos sinais dos hidrogênios H11 e H11' ligados ao carbono do anel diidrofurânico, para 3,55 e 3,05 ppm, respectivamente.

É possível observar modificações na região dos aromáticos, tanto no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  quanto de  $^{13}\text{C}$ . As principais modificações no espectro de RMN de carbono treze e que ajudam a confirmar a estrutura do produto, são os sinais em 12,04 ppm, referentes ao carbono ligado ao iodo (C13) e 84,44 ppm, correspondente ao carbono aromático. Além disso, o DEPT 135 ajuda a confirmar os sinais referentes aos carbonos secundários ( $\text{CH}_2$ ) e terciários ( $\text{CH}$ ).

### 2,4-dimetilfurano[3,2-c]quinolina

Por eliminação redutiva com uma base adequada leva ao produto final.

O diidrofurano em presença de DBU sofre eliminação redutiva formando-se assim a furanoquinolina.



A estrutura da furanoquinolina foi confirmada por análise elementar e dos seguintes métodos analíticos.

Por espectroscopia de massas, temos o íon molecular,  $M^+=197$ , correspondente à massa molecular do produto.

Por espectroscopia de IV, observamos a ausência da banda em  $1158\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à ligação C – I.

Por espectro de RMN de hidrogênio, observamos o desaparecimento dos sinais em 3,64 – 3,76 ppm, referentes ao  $\text{CH}_2$  ligado ao iodo, em 3,55 e 3,05 ppm, dos hidrogênios H11 e H11' do anel diidrofurânico, e 5,18 – 5,25 ppm referente ao hidrogênio do carbono carbinólico. Além disso, temos o surgimento de uma metila em 2,77 ppm, confirmando a eliminação do iodo e aromatização do anel diidrofurânico, levando ao furano. Temos ainda modificações na região de aromáticos tanto no espectro de RMN de hidrogênio quanto de carbono treze. No espectro de carbono treze, além do desaparecimento dos sinais de carbono ligados aos hidrogênios acima mencionados, temos o surgimento de novos sinais na região dos aromáticos e uma metila em 14,15 ppm.

O DEPT 135 confirma o desaparecimento dos carbonos secundários ( $\text{CH}_2$ ). Como mostrado na figura 40.

## 7. ENSAIO BIOLÓGICO

### 7.1. Ensaio *in vivo*

Os ensaios biológicos para malária *in vivo* serão repetidos já que foram inconclusivos.

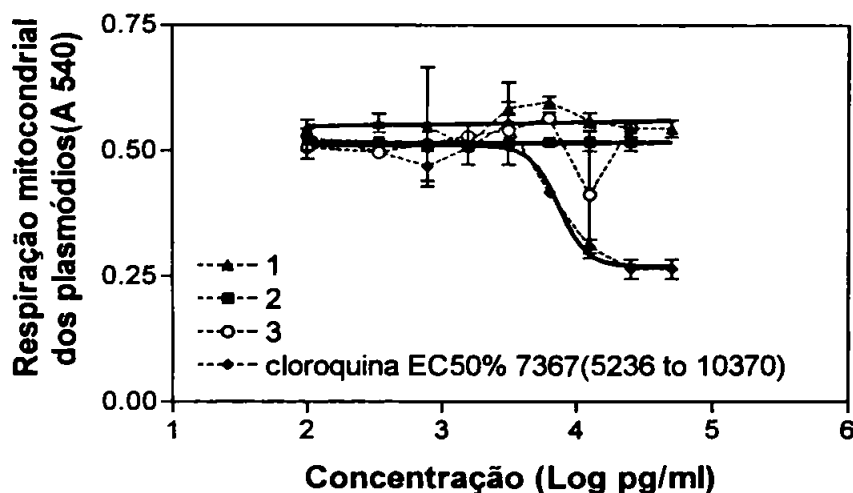
### Ensaio *in vitro*

Atividade antimalárica dos principais compostos testados em malária experimental de roedor por *Plasmodium chabaudi*.

Para determinar a atividade dos principais compostos sintetizados contra parasitas da malária, optamos pelo microteste *in vitro*, utilizando hemácias infectadas por *Plasmodium chabaudi*, determinando-se a viabilidade do parasita através da determinação de sua atividade oxidativa, através de um ensaio colorimétrico, utilizando a oxidação do MTT, conforme descrito em métodos.

Os dados obtidos foram analisados de forma similar ao descrito nos ensaios de células de mamíferos, e podem ser graficamente vistos na figura 42. Nenhum dos compostos sintetizados mostrou atividade significativa neste tipo de ensaio, enquanto que o antimalárico padrão, a cloroquina, mostrou uma curva dose resposta clara e definida, com seus níveis incluídos no gráfico, mostrando uma sensibilidade a este composto, baseados em padrões internacionais.

Os compostos também foram testados *in vitro* contra hemácias infectadas por *Plasmodium berghei* e *in vivo* contra modelos de roedores infectados pelos mesmo plasmódios, mas os resultados foram inconclusivos, sem efeito, provavelmente refletindo os resultados obtidos *in vitro*.



**Figura 42. Determinação da atividade antimalárica dos principais compostos sintetizados.**

Utilizando um microteste *in vitro*, contra hemácias de camundongo infectados pelo *Plasmodium chabaudi*, um plasmódio de roedor com baixa resistência a cloroquina. As linhas sólidas representam curvas estimadas e as linhas interrompidas curvas determinadas. Barras representam o erro padrão da média. A legenda dos compostos é 1: 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina; 2: 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina; 3: 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina.

## 8 – CONCLUSÕES

A rota sintética utilizada na preparação da furanoquinolina mostrou-se eficiente, pois os rendimentos foram satisfatórios.

Os compostos sintetizados  $\beta$ -dicarbonílico,  $\beta$ -enaminoéster, quinolina, diidrofurano e furanoquinolínico foram obtidos com grau de pureza satisfatórios e submetidos a diversas análises para suas respectivas caracterizações e confirmação das estruturas.

Utilizando a mesma rota sintética seria possível obter outros bioisómeros anelares com N, e S. Além do que substituintes no anel aromático, poderão ser obtidos a partir da utilização da anilina com diferentes substituintes em diferentes posições.

Os ensaios de atividade biológica *in vivo* e *in vitro* dos compostos sintetizados foram realizados contra *P. berghei* e *P. chabaudi*.

Serão feitos testes *in vitro* de sensibilidade de cultura de *P. falciparum* com apoio da SUCEN.

Embora não tenha sido objetivo deste trabalho, foram realizados ensaios biológicos contra a toxoplasmose e estes resultaram em negativo.

## 9- PERSPECTIVAS

- 1- Obtenção dos derivados isostéricos do anel furânico.
  - 2- A partir dos precursores furânicos, tiofênicos e pirrólicos, obter agentes potencialmente antimaláricos, respeitando o grupo farmacofórico correspondente. Isto poderá gerar subsídios ao estudo da relação e estrutura-atividade.
  - 3- Estender os ensaios biológicos para a busca de atividade contra outras doenças parasitárias como a leishmaniose, toxoplasmose e tripanosomiase.
  - 4- Já estão sendo realizados ensaios biológicos contra o *T. gondii*, mostrados no anexo I.
-

## **10. ANEXO I**

### **Ensaio biológico contra *Toxoplasma gondii***

#### **Avaliação da atividade biológica contra *Toxoplasma gondii***

Aproveitando-se a metodologia e equipamento disponíveis também foram feitos os ensaios contra *Toxoplasma gondii*.

Os ensaios dos compostos sintetizados estão sendo realizados em parceria com pesquisadores do setor da malária no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em colaboração com Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

#### **Introdução**

A toxoplasmose é uma zoonose mundial causada por protozoário da ordem Coccidia e a única espécie é o *Toxoplasma gondii*. Este parasita data de 1908, descrito por Splendore e Nicolle no Brasil e Manceaux na Tunísia. Existe em diversas formas biologicamente importantes como oocistos, taquízoito e bradizoíto, identificados em diferentes animais, sendo hospedeiros definitivos os felinos, além do próprio homem (PESSÔA & MARTINS, 1988)

O protozoário invade as células do intestino delgado dos felinos onde ocorre o ciclo enteroepitelial, caracterizado por reprodução sexuada do parasita, liberando oocistos nas fezes de felinos, os quais permanecem viáveis no meio ambiente, aproximadamente por um ano, em climas quentes



e úmidos e em climas frios por períodos maiores (FRENKEL *et al.*, 1970; DUBEY, 1996).

Tanto o homem quanto qualquer animal de sangue quente (homeotermos) podem-se contaminar pela ingestão dos oocistos presentes no solo, vegetais e nos tecidos animais infectados.

As vias mais importantes de contaminação humana são consumo de carne com cocção não adequada e ingestão da água contaminada (DUBEY, 1991). Os esporozoítos liberados invadem as células intestinais, transformando-se em taquízoítos, forma assexuada do parasita de proliferação rápida, que, disseminada pela circulação aos outros tecidos, invade as células nucleadas proliferando-se e infectando outras células (FRENKEL *et al.*, 1970).

Outras formas de transmissão ao homem, como a congênita, transfusão sanguínea ou por transplante de órgãos, são eventualidades não muito freqüentes.

As manifestações clínicas incluem infecção adquirida, congênita, coriorretinite e infecção no hospedeiro imunocomprometido.

### **Tratamento**

De modo geral o tratamento da toxoplasmose pelo fato de apresentar manifestações clínicas ou mesmo sendo assintomática é limitada, pelos fármacos existentes, já que não atuam nos cistos teciduais (bradizoítos), sendo recomendado o tratamento segundo as manifestações clínicas apresentadas.

Em casos de sintomatologia intensa e manifestações clínicas graves é indicado uma associação sulfadiazina + pirimetamina. No caso de apresentarem efeitos colaterais, outras alternativas são esperimicina, clindamicina e a associação sulfametoxazol-trimetoprima.

Em outros casos podem-se utilizar a associação anteriormente mencionada com adição de um corticosteróide (prednisona) e no caso de gestação, suplementada com ácido fólico.

### **Objetivo**

Em vista de ser a toxoplasmose uma doença de preocupação mundial foi de interesse fazer os teste biológicos contra este tipo de doença com os compostos sintetizados: a 4-hidroxiquinolina, diidrofurano e furanoquinolina.

### **Materiais e Métodos**

#### **Ensaio biológico *in vitro* utilizando *Toxoplasma gondii***

#### **Parasitas**

Os parasitas utilizados como fonte de infecção de células LLC-MK2 foram taquízoitos de *Toxoplasma gondii*, cepa virulenta RH, mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical do São Paulo, por meio de passagens sucessivas em camundongo Swiss não isogênicas, através de lavagem peritoneal com solução salina ou salina tamponada com fosfato (PBS) - NaCl 0,15 M/tampão fosfato de sódio

0,01 M com pH 7,2 e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p) em novos animais.

**Protocolo experimental dos ensaios de atividade biológica infectadas com *Toxoplasma gondii*, usando células LLMCK2, RH**

As células LLC-MK2 foram semeadas em placas plásticas de 96 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço e mantidas em cultura em meio RPMI 1640 contendo gentamicina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e 10% soro fetal bovino, em estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , à temperatura de 37 °C por 24 horas. Os compostos sintetizados foram diluídos  $10^4$  na placa de 96 poços em meio de cultura, em quintuplicata, e incubados com as células infectadas ou não, por um período de 24 horas. A avaliação da atividade dos compostos, foi realizada por incorporação celular de cristal de violeta, com a leitura da densidade óptica (D.O.) a 575 nm em leitor de microplacas (LABSYSTEMS MULISKAN MS).

A determinação das Doses Efetivas 50% ( $\text{DE}_{50}$ ) foi obtida no GraphPad Prism, por aplicação do modelo sigmóide dose-resposta.

---

## Resultados.

Atividade in vitro dos principais compostos em Células de mamífero normais ou infectadas pelo *Toxoplasma gondii*.

A determinação da atividade dos principais compostos sintetizados foi determinada em células de mamífero infectadas ou não com *T.gondii*. A determinação foi feita como descrito em Métodos, utilizando microplacas de cultura com determinação da % de sobrevivência da camada celular. Em tempo, o agente parasitário destrói a camada celular e uma sobrevivência das células infectadas representa uma atividade antiparasitária.

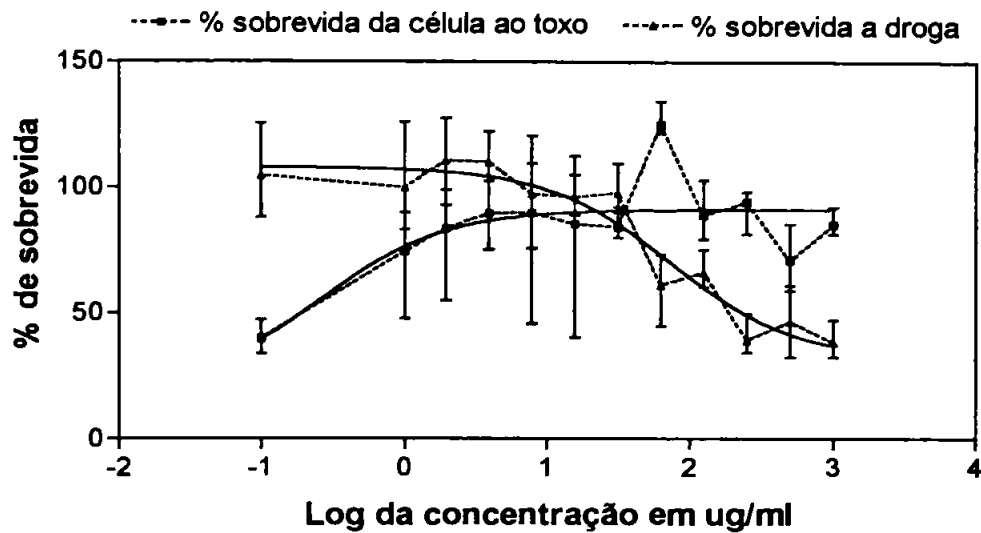
Este modelo permite a determinação matemática, através de modelos sigmóides dose-resposta, a dose ideal que agride as células de mamífero ou o parasita, sendo que os valores determinados para cada um dos principais compostos sintetizados podem ser vistos na Tabela VIII. A comparação entre os valores foi feita utilizando o teste de t de comparação de valores determinados, utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 3.0.

**Tabela VIII. Determinação da atividade tóxica DL 50% dos principais compostos sintetizados envolvidos contra células LLCMK2 normais ou infectadas pelo *Toxoplasma gondii***

Composto sintetizado	contra LLCMK2(ug/ml) (IC 95%)	contra <i>Toxoplasma gondii</i> (ug/ml) (IC 95%)	Significância
2-metil-3-alil-4-hidroquinolina	74,76 (31.24 to 178.9)	0,2642 (0.03549 a 1.966)	P<0.00001
2-(iodometil)-4-metil-2,3,-diidrofurano [3,2-c] quinolina	19,64 (4.907 a 78.60)	10,27 (4.130 a 25.55)	NS
2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina	39,74 (14.78 to 106.8)	18,70 (8.048 to 43.45)	NS

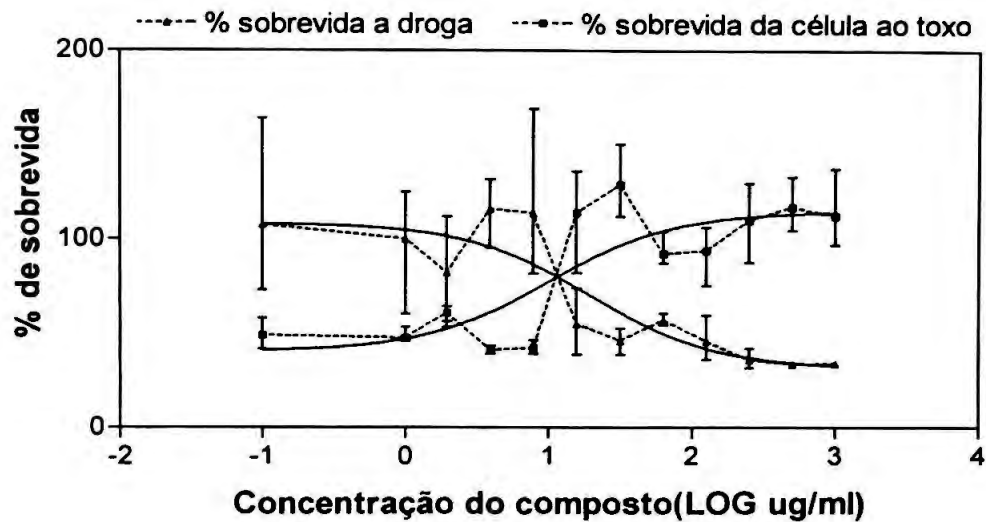
Como pode ser observado, somente existiram diferenças entre a toxicidade para a célula de mamífero e o parasita para um dos compostos sintetizados, a saber a 2-metil-3-alil-4 hidroxiquinolina, que apresentou uma atividade anti-parasitária cerca de 280 vezes maior que sua toxicidade. Os demais compostos testados apresentaram valores semelhantes de toxicidade para o parasita e a célula hospedeira. Para melhor apresentação dos resultados, mostramos as curvas de determinação da DL 50% contra células LLC MK2 normais ou infectadas pelo *T. gondii*, individualmente para cada composto.

Assim na fig. 43 é apresentado a evolução da sobrevida celular de células LLC-MK2 infectadas ou não pelo *T.gondii* contra concentrações progressivas de 2-metil-3-alil-4 hidroxiquinolina, onde pode ser evidenciada a área achurada onde o composto é tóxico apenas para o parasita. Na figura 44 mostramos os resultados gráficos obtidos com o composto 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina, e na figura 45 os resultados obtidos no mesmo sistema com o composto 2,4-dimetilfurano[3,2-c] quinolina.



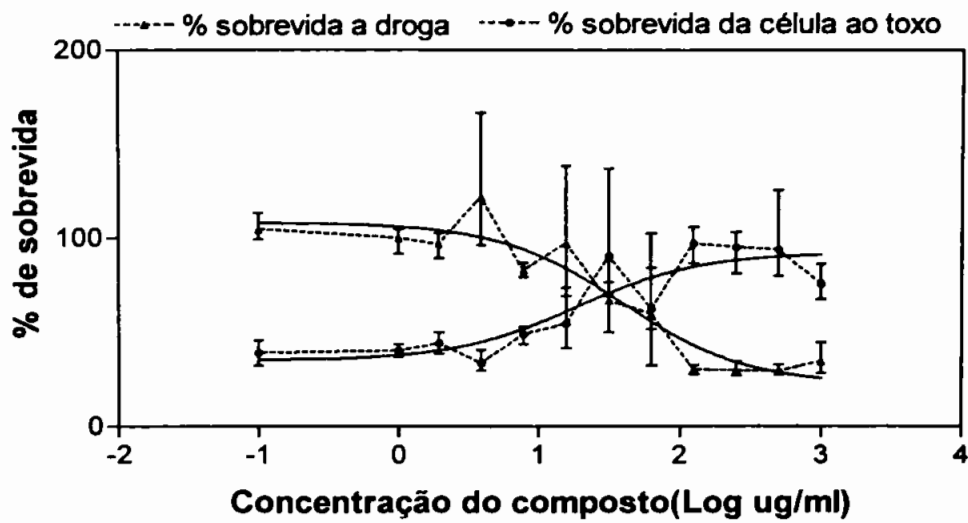
**Figura 43. Determinação da DL 50% de 2-metil-3-alil-4 hidroxiquinolina em relação a células LLCMK2 normais ou infectadas pela cepa RH de *T. gondii*, como descrito em Métodos.**

As linhas interrompidas representam curvas determinadas e as linhas sólidas as curvas estimadas no modelo sigmoidal dose resposta. Uma eventual área de ação diferencial contra o *T. gondii* é mostrada em área ressaltada.



**Figura 44.** Determinação da DL 50% do composto 2-(iodometil)-4-metil-2,3-diidrofurano [3,2-c] quinolina em relação a células LLCMK2 normais ou infectadas pela cepa RH de *T. gondii*, como descrito em Métodos.

As linhas interrompidas representam curvas determinadas e as linhas sólidas as curvas estimadas no modelo sigmoidal dose resposta. Uma eventual área de ação diferencial contra o *T. gondii* é mostrada em área ressaltada.



**Figura 45.** Determinação da DL 50% do composto 2,4-dimetilfurano [3,2-c] quinolina em relação a células LLCMK2 normais ou infectadas pela cepa RH de *T. gondii*, como descrito em Métodos.

As linhas interrompidas representam curvas determinadas e as linhas sólidas as curvas estimadas no modelo sigmoidal dose resposta. Uma eventual área de ação diferencial contra o *T. gondii* é mostrada em área ressaltada.



## DISCUSSÃO

### **Ação dos principais compostos sintetizados contra parasitas.**

Nossos dados de ensaios *in vitro* mostraram claramente que um dos compostos, a 2-metil-3-alil-4 hidroxiquinolina, apresenta uma clara atividade contra *Toxoplasma gondii*, mas que a inserção do grupo furânico no composto resulta em perda desta atividade, mostrando a importância do sítio de inserção do anel furânico no comportamento biológico da molécula.

A toxoplasmose é uma doença amplamente disseminada em nosso meio, com mais de 60% da população adulta infectada no Brasil e cerca de 80000 casos de doença ocular só em São Paulo. Obviamente a pesquisa de novos fármacos para este agente, usualmente tratado com pirimetamina, que apresenta toxicidade hematológica significativa, é um passo subsequente no desenvolvimento destes compostos.

Novas alterações moleculares devem ser incluídas nestas moléculas, de forma a permitir que a interação com sistemas biológicos do parasita volte a ocorrer. Claramente a inserção do anel furânico mostrou a importância daquela parte da molécula na atividade biológica, que pode ser mediada por vários fatores, mas sugere-se que as futuras alterações destes grupos procurem alcançar a manutenção da capacidade de protonação da molécula, que é uma das características que permite a sua concentração em vacúolos ácidos como os que os parasitas intracelulares habitam.

O achado de que o composto 2-metil-3-alil-4 hidroxiquinolina não tem ação contra plasmódio *in vitro* foi surpreendente, mas pode ser devido às nossas condições de ensaio, já que os testes realizados são apenas de triagem dos compostos e não foram testadas todas as variantes do sistema, como solubilidade do composto ou protonação, o que pode dificultar a captação do

mesmo pelas hemácias parasitadas, o que pode ser modificado pela forma de administração ou preparação do composto.

Apesar disso, os compostos principais desenvolvidos são promissores como moléculas intermediárias de síntese de compostos que atinjam os objetivos propostos, mas a captação da tecnologia de triagem e desenvolvimento de compostos sintetizados foi importante e demonstrou pelo menos uma atividade desejável. Evidentemente, dentro do prazo limitado de um projeto de Mestrado os ensaios realizados são apenas indicadores de metas futuras de desenvolvimento de compostos sintetizados.

---

**<sup>1</sup>11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

ADAM, W., BALCI, M. Photooxygenation of 1,3,5-cycloheptatriene: isolation and characterization of endoperoxides. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.101, p.7537-7541, 1979.

A-KARIM, A., FAROUK, A., MAHMOUD, H.K. **Drug use and abuse and the pharmacist's role during the 1988 disaster in Sudan. Int. Pharm. J.**, The Hague, v.5, n.2, p.62-66, 1991.

ALECRIM, M.G.C. Estudo da resistência do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas *in vivo* e *in vitro* na Amazônia. Brasília, 1981. 116p. (Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências da Saúde - UnB).

ALMEIDA NETTO, J.C., OLIVEIRA, G.S.C., SAMPAIO, J.A.A. Resistência do *P. falciparum* à associação sulfamídicos-antifólicos na região Centro-Oeste do Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v.1, p.383-393, 1972.

ANDRADE Jr, H.F., LAURENTI, M.D., GOTO, H., DUARTE, S., **Malaria experimental: Contaminação de cepas e animais de biotério por *Eperythrozoon coccoides*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, São Paulo, v.28, p.246-252, 1986.**

ANTONIELETTI, R., CECCHINE, C., CIANI, B., MAGNANTI, S. Iodoenolcyclization. III. A general approach to tetrasubstituted furans from Z-Alkenyl-1,3-dicarbonyl compounds. **Tetrahedron Lett.**, Amsterdam, v.36, n.49, p.9019-9022, 1995.

---

<sup>1</sup> Nota: As referências bibliográficas seguem a norma da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), NBR 6023/2000.

- ANTONIELETTI, R., BONADIES, F., SCETTRI, A. A convenient approach to furan derivatives by I<sub>2</sub>-induced cyclisation of 2-alkenyl substituted 1,3-dicarbonyl compounds. **Tetrahedron Lett.**, Amsterdam, v.29, n.39, p.4967-4990, 1988.
- AZARRO, M., GERIBALDI, S., VIDEU, B. Use of boron trifluoride etherate in the preparation of 2 amino-1-alkenil ketones from β-diketones and low-boiling amines. **Synthesis**, Stuttgart, p.880-881, 1981.
- BADER, A. R., VOGEL, H. A. Transesterification. II. Esters of strong organic acids. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.74, p.3992-3993, 1952.
- BALDWIN, J.E. Rules for ring closure. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, London, v.18, p734, 1976.
- BALDWIN, S.W., McIVER, J.M. Stereoselective synthesis of -methyl nonactate. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.52, p.320-322, 1987.
- BARALDI, P.G., SIMOINI, D., MANFREDINI, P. The improved preparation of enamines from 1,3-diketones and ammonium acetate or amine acetates. **Synthesis**, Stuttgart, p.902-903, 1983.
- BARNETT, W.E., SOHN, W.H. β-Lactones as kinetic products in the iodolactonization reaction. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, London, p.472, 1972.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. A origem dos fármacos. In: \_\_\_\_\_. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** Porto Alegre: Artemed, 2001. cap.2, p.53-81.

- BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligentes. In: \_\_\_\_\_. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artemed, 2001. cap.3, p.83-124.
- BARRETO, J.B. Malaria. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de higiene**. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1956. v.2, cap.40, p.683-761.
- BARROSO, W.J. Aspectos epidemiológicos da malária no Rio de Janeiro. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v.28, p.81, 1999.
- BARTLETT, P.A. Olefin cyclization process that form carbon-heteroatomo bonds. **Asymmetric Synth.**, Orlando, v.3, p.411, 1984.
- BARTLETT, P.A., MYERSON, J. Stereoselective epoxidation of acyclic olefinic carboxylic acids via iodolactonization. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.100, n.12, p.3950-3952, 1978.
- BARTOLI, G., CIMARELLI, C., MARCANTONI, E., PALMIERI, G., PETRINI, M. Chemo- and diastereoselective reduction of  $\beta$ -enamino esters; a convenient synthesis of both *cis*- and *trans*- $\gamma$ -amino alcohols and  $\beta$ -amino esters. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.59, p.5328-5335, 1994.
- BERGER A. Protection against malaria. **BMJ**, London, v.317, n.28, p.1508, 1998.
- BERGMAN, J., ENGMAN, L. Oxidative cyclization of some  $\gamma$ - and  $\delta$ -hidroxy olefins induced by tellurium dioxide. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.103, p.5196-5200, 1981.
-

BERLINDER, R.W., EARLE Jr., D.P., TAGGART, J.V., ZUBROD, C.G., WELCH, W.J., CONAN, N.J., BAUMAN, E., SCUDDER, S.T., SHANNON, J.A. Studies on the chemotherapy of the human malarías. VI. The physiological disposition, antimalarial activity and toxicity of several derivatives of 4-aminoquinoline. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.27, p.98-107, 1948.

BHAREL, S., GULATI, A., ABDIN, M.Z., SRIVASTAVA, P.S., JAIN, S.K. Structure, biosynthesis and functions of artemisinin. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.67, n.5, p.387-411, 1996.

BOULOS, M., DI SANTI, S.M., BARATA, L.C.B., SEGURADO, A.C.C., DUTRA, A.P., NEVES, V.L.F.C. Some aspects of treatment, prophylaxis and chemoresistance of *Plasmodium falciparum* malaria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.8, p.225-257, 1986.

BRAIBANTE, M.E.F., BRAIBANTE, H.T.S., SALVATORE, S.J.S.A. Síntese de enamino compostos utilizando suportes sólidos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.13, p.67-71, 1990.

BRAM, G., DECOTS, G. Alkylation of anions on solid inorganic supports: na interpretation of the function of the supports. **Tetrahedron Lett.**, Amsterdam, v.21, p.5011-5014, 1980.

BRANDT, C.A., COMASSETO, J.V., Ferraz, H.M.C. Ciclofuncionalizações envolvendo reagentes de enxofre, selênio e telúrio. **Quim. Nova**, São Paulo, v.14, n.3, p.165-174, 1991.

- BRANDT, C.A., COMASSETO, J.V., *et al.* A novel approach to pyroles by iodocyclization of 2-alkenyl enamines. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 14, Caxambu, 1991. **Resumos**. Caxambu: SBQ, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Gerência Técnica Malária. **Registro de casos de malária (1960-1999)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. s.p. [Folheto].
- BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Públicas. **Manual de terapêutica de malária**. Brasília: SUCAM, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. **Avaliação epidemiológica da malária, segundo o local de diagnóstico (1988-1999)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. s.p. [Folheto].
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Campanha de Erradicação da Malária. **Registros estatísticos (1960-1970)**. Brasília: Ministério da Saúde, 1970. s.p. [Folheto].
- BRAZ, R.M. Métodos de avaliação dos fatores de risco na transmissão da malária fora da Região Amazônica, visando à implantação de medidas de controle. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v.28, p.6, 1999.
- BROOKS, M.H., MALLOY, J.P., BARTELLONI, P.J., SHEEHY, T.W., BARRY, K.G. Quinine, pyrimethamine and sulphorthodomethoxine: clinical response, plasma levels and urinary excretion during the initial attack of naturally acquired *falciparum malaria*. **Clin. Pharmacol. Ther.**, Saint Louis, v.10, p.85-91, 1969.

- BRUCE-CHWATT, L.J., ed. **Chemotherapy of malaria**. 2.ed. Geneva: World Health Organization, 1986. 288p. (Monograph series (World Health Organization), n.27).
- BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential malariology**. 2.ed. New York: Heinemann Medical Books, 1985. p.12-259.
- BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D.H. Furans and related compounds, quinolines and isoquinolines, pyridines, quinolines and isoquinolines, pyrroles and indoles. In: \_\_\_\_\_. **Mass spectrometry of organic compounds**. San Francisco: Holden-Day, 1967. cap.20,22,23, p.566-624. (Holden-Day series in physical techniques in chemistry).
- BURDON, J., MCLOUGHLIN, V.C.R. The sodium-promoted claisen ester condensations of ethyl perfluoroalkanecarboxylates. **Tetrahedron**, Amsterdam, v.20, p.2163-2166, 1964.
- BURGER, A. Isosterism and bioisosterism in drug design. **Prog. Drug. Res.**, Basel, v.37, p.287-371, 1991.
- CARDILLO, G., ORENA, M., SANDRI, S. Stereocontrolled reactions through heterocyclic intermediates. **Pure Appl. Chem.**, Research Triangle Park, v.60, n.11, p.1679-1688, 1988.
- CARDILLO, G., ORENA, M. Stereocontrolled cyclofunctionalizations of double bonds through heterocyclic intermediates. **Tetrahedron**, Amsterdam, v.46, p.3321, 1990.
- CAREY, F.A., SUNDBERG, R.J. **Advanced organic chemistry**. 3.ed. New York: Plenum Press, 1990. 422p.



- CASTEEL, D.A. Antimalarial agents. In: WOLFF, M.E., ed. **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**. 5.ed. New York: John Wiley, 1997. v.5, cap.59, p.1-53.
- CHAMBERLIN, A.R., MULHOLLAND, R.L., KAHN, S.D., HEHRE, W.J. Modeling chemical reactivity. 7. The effect of a change in rate-limiting step on the stereoselectivity of electrophilic addition to allylic alcohols and related chiral alkenes. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.109, p.672, 1987.
- CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. cap.16, p.139-155.
- CLIVE, D.L.J., CHITATTU, G., CURTIS, N., KIEL, W.A, WONG, C.K. Cyclofunctionalization of ortho-alkenylphenols: a new method for introducing the benzeneseleno-group. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, London, v.725, p.3894-3897, 1977.
- COATNEY, G.R. Relapsi in malaria: an enigma. **J. Parasitol.**, Saint Lawrence, v.62, n.3, p.3-9, 1976.
- CONRAD, M., LIMPACH. Synthese von chinolin-derivaten mittelst acetessigester. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, Berlin, v.24, p.2990, 1891.
- CUMMING, J., PLOYPRADITH, P., POSNER, G. Antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu) and related trioxanes: mechanism (s) of action. **Adv. Pharmacol.**, San Diego, v.37, p.253-297, 1997.

- DA SILVA, J.R., LOPES, P.F.A., FERREIRA, L.F., MORTEO, R., NAVEIRA, J.B. Resistência do *P. falciparum* à ação da cloroquina. **Hospital**, Rio de Janeiro, v.60, p.658-667, 1968.
- DAVEY, D.G. Chemotherapy of malaria. Part I. Biological basis of testing methods. In: SCHNITZER, R.J., HAWKING, F., eds. **Experimental chemotherapy**. New York: Academic Press, 1963. v.1, p.487-511.
- DEANE, D.M. Malaria studies and control in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.38, p.223-230, 1988.
- DESJARDINS, R.E., CANFIELD, C.J., HAYNES, J.D., CHULAY, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.16, p.710-718, 1979a.
- DESJARDINS, R.E., PAMPLIN, C.L., VON BREDOW, J., BARRY, K.G., CANFIELD, C.J. Kinetics of a new antimalarial, mefloquine. **Clin. Pharmacol. Ther.**, Saint Louis, v.26, p.372-379, 1979b.
- DI SANTI, S.M., BOULOS, M. Protozoários: malária. In: CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap.16, p.139-155.
- DI SANTI, S.M., NEVES, V.L.F.C., BOULOS, M., DUTRA, A.P., RAMOS, A.M.S.V., SANTOS, M., BARATA, L.C.B. Avaliação da resposta do *Plasmodium falciparum* a cloroquina, quinino e mefloquina. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.30, p.47-152, 1988.

- DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.64, p.65-70, 1996.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis: an overview. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, suppl., p.88-92, 1991. [Review].
- DURAND, R., LE BRAS, J. Plasmodium falciparum: point mutations of pcftr and chloroquine susceptibility. **Ann. Pharm. Fr.**, Vineuil, v.59, n.5, p.312-318, 2001. Disponível em: <http://www.publimed.com>. Acesso em: 21 fev. 2002.
- DURRHEIM, D.N. Prophylaxis against malaria. **BMJ**, London, v.318, n.24, p.1139-1140, 1999. Disponível em: <http://www.bmj.com/cgi/content/full>. Acesso em: 03 Out. 2000.
- DUTRA, A.P., GUTIERREZ, E.B., BARATA, L.C.B. **Malária: situação atual, diagnóstico, tratamento e controle**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias, 1988. 31p.
- EBERLIN, M.N. Estudo das reações de X diazocetonas com enaminonas: realidade e utilidades sintéticas, novo método de síntese de pirrois. Campinas, 1988. 181p. (Tese de doutorado - UNICAMP). 1988.
- ELDERFIELD, R.C., *et al.* Alkylaminoalkyl derivative of 8-aminoquinoline. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.68, p.1524-1529, 1946.
- EVANS, W.C., TREASE, G.E., **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W.B. Saunders, 1996. p.428-433. (Trease and Evans' Pharmacognosy).
-

FALCO, E.A., GOODWIN, L.G., HITCHINGS, G.H., ROLLO, I.M., RUSSELL, P.B. 2:4-diaminopyrimidines: a new series of antimalarials. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, London, v.6, p.185-200, 1951.

FELDMAN, H.A. Toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.279, p.1370-1375, p.1431-1437, 1968.

FERONE, R., BURCHALL, J.J., HITCHINGS, G.H. *Plasmodium berghei* dohydrofolate: isolation, properties and inhibition by antifolates. **Mol. Pharmacol.**, Bethesda, v.5, p.49-59, 1969.

FERRAZ, H.M.C., COMASSETO, J.V., DE BORBA, E.B., BRANDT, C.A. Telurociclofuncionalização de compostos 2-alquenil-1,3-dicarbonílicos. **Quim. Nova**, São Paulo, v.15, n.4, p.298-301, 1992.

FERRAZ, H.M.C, PAYRET-ARRUA, M.E., OLIVEIRA, E.O., BRANDT, C.A. A new and efficient approach to cyclic  $\alpha$ -amino-ketones by iodine-promote cyclization". **J. Org. Chem.**, Columbus, v.60, n.22, p.7357-7359, 1995.

FERRAZ, H.M.C., SANO, M.K., SCALFO, A.C. Tellenium and iodine promoted cyclofunctionilization of alkenyl substituted  $\beta$ -keto estero. **Letter**, New York, n.5, p.567-568, 1999.

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

FERREIRA, E.I. Antimaláricos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.117, p.1163-1172.

- FERREIRA, E.I. Malária. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.763-785.
- FESTING, M.F. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. **Lab. Anim.**, London, v.28, n.3, p.212-221, 1994.
- FESTING, M.F.W. Introduction to laboratory animal genetics. In: POOLE, T. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. London: Longman Scientific, 1987. p.58-84.
- FISHWICK, J., MACLEAN, W.G., EDWARDS, G., WARD, S.A. The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture. **Chem.-Biol. Interact.**, Amsterdam, v.96, n.3, p.263-271, 1995.
- FOGH, S., SCHAPIRA, A., BYGBJERG, I.C., JEPSEN, S., MORDHORST, C.H., KUIJLEN, K., RAVN, P., RØNN, A., GØTZSCHE, P.C. Malaria chemoprophylaxis in travelers to east Africa: a comparative prospective study of chloroquineplus proguanil with chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine. **BMJ**, London, v.296, p.820-822, 1988.
- FONSECA, F. Plasmódio de primata do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.2, p.543-551, 1951.
- FONTES, C.J.F., DUARTZ, E.C. Associação entre a produção de ouro e o índice parasitário anual de malária em Mato Grosso. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v.28, p.79, 1999.

- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* en cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, Washington, v.1670, p.893-896, 1970.
- FRISCHE, T.R., SMITH, J.W. Parasitologia médica In: HENRY, J.B., ed. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19.ed. São Paulo: Manole., cap.53, p.1289-1296, 1999.
- FUJITA, M., EGAWA, H., CHIBA, K., MATSUMOTO, J. One-step furan ring formation: synthesis of furo[3,2-*h*]quinolines[1]. **J. Heterocycl. Chem.**, Odessa, v.34, n.6, p.1731-1735, 1997.
- GEENWOOD, D. Historical perspective, conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.36, n.5, p.857-872, 1995.
- GINSBURG, H. KRUGLIAK, M. Quinoline-containing antimalarials-mode of action, drug resistance and its reversal: an update with unresolved puzzles. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.43, n.1, p.63-70, 1992.
- GOLDMAN, A . Current views on malaria prophylaxis. Disponível em: <http://pol-it.org//malaria.html>. Acesso em: 3/10/2000.
- GONDER, R., BERENGERG-GROSSLER, R. Untersuchugen ueber Malária plasmodien der Affen. **Malaria Int. Arch.**, Leipzig, v.1, p.47-56, 1908.
- GORDON, E.M., WILLIAMS, M. Drug discovery: an overview. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., eds. **A textbook of drug design and development**. 2.ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1996. p.1-34.

GOULD Jr., R.G., JACOBS, W.A., The synthesis of certain substituted quinolines and 5,6-benzoquinolines. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.61, p.2890-2895, 1939.

GREENHILL, J.V. Enaminones. **Chem. Soc. Rev.**, Letchworth, v.6, n.1, p.277-294, 1977.

GREENWOOD, D. Historical perspective conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.36, n.5, p.857-872, 1995.

GRIMM, H.G. Structure and size of the non metallic hybrids.2. **Electrochemistry**, Tokyo, v.31, p.474-480, 1925.

GULATI, A., BHAREL. S., SIVRASTAVA, P., ABDIN, M.Z., JAIN, S.K. Experimental studies on Artemisia, a herbal remedy to malaria. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.67, n.5, p.403-409, 1996.

HECK, J.E. Malaria: primary care. **Periódico**.Philadelphia, v.18, n.1, p.195-211, 1991.

HIEN, T., WHITE, N.J. Qinghaosu. **Lancet**, London, v.341, n.6, p.603-608, 1993.

HITCHINGS, G.H., BURCHALL, J.J. Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy. **Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.**, New York, v.27, p.417-468, 1965.

JOULE, J.A., MILLS, K., SMITH, G.F. Quinolines and isoquinolines: reactions and synthesis. In: JOULE, J.A., MILLS, K., SMITH, G.F. **Heterocyclic chemistry**. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1995. p.121-145.

KARBWANG, J., BUNNAG, D., BRECKENRIDGE, A.M., BACK, D.J. The pharmacokinetics of mefloquine when given alone or in combination with sulphadoxine and pyrimethamine in Thai male and female subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.32, p.173-177, 1987.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu – (Artemisinina): na antimalarial drug from China. **Science**, Washington, v.228, p.1049-1055, 1985.

KNORR, L. The microcard reader. **Annalen der Chemie**, v.236, n.709, p.272-378, 1886.

KOIZUMI, M., TITANI, T. Austausch der wassertoffatome zwischen pyrrol und wasser. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.12, n.2, p.107-108, 1937.

KOIZUMI, M., TITANI, T. Über den Austausch der Wassertoffatome zwischen Pyrrol, indol sowie ihren methylderivaten und wasser. I. Austausch der wasserstoatome zwischen Pyrrol und wasser. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.13, n.1, p.85-94, 1938.

KOIZUMI, M., TITANI, T. Über den Austausch der Wassertoffatome zwischen Pyrrol, indol sowie ihren methylderivaten und wasser. IV. Austausch der wasserstoatome zwischen indol und wasser. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.13, n.3, p.307-318, 1938.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988. p.39-83.



KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara 1998/1999**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. p.10.17-10.18.

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

KROGSTAD, D.J., GLUZMAN, I.Y., HERWALDT, B.L., SCHLESINGER, P.H., WELLEMS, T.E. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v.43, n.1, p.57-62, 1992.

KROTOSKI, W.A., KROTOSKI, D.M., GARNHAM, P.C.C., BRAY, R.S., KILLICK-KENDRICK, R., DRAPER, C.C., TARGETT, G.A.T. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages: preliminary note. **BMJ**, London, v.280, p.153-154, 1980.

LANGMUIR, I. Isomorphismo, isosterismo and covalence. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v.41, p.1543-1559, 1919.

LEE, I., ELSOHLY, H., CROOM, E.M., HUFFORD, C.D. Microbial metabolism studies of the antimalarial sesquiterpene Artemisinin. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.52, n.2, p.337-341, 1989.

LEPORT, C. *et al.* Clinical avaliations in toxoplasmosis in AIDS patients. **Am. J. Med.**, Philadelphia, v.84, p.94, 1988.

LINSTEAD, R.P., MAY, C.J. The quantitative estimation of mixtures of isomeric unsaturated compounds. Part II. Iodometric methods. **J. Chem. Soc.**, London, p.2565-2579, 1927.

- LIOTTA, D. **Organoselenium chemistry**. New York: John Wiley, 1987.
- MACCABE, R.E., REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis. In: WARREN, K.S., MAHMOUD, A.A.F., eds. **Tropical and geographical medicine**. New York: MacGraw-Hill, 1984. p.281-292.
- MARCH, J. **Advanced organic chemistry**. 3.ed. New York: John Wiley, 1985. p.796-798.
- MARQUES, A.C. GUTIERREZ, H.C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. In: \_\_\_\_\_. **Trajetória de um sanitarista**. Brasília: Organização Panamericana da Saúde, 1998. p.38-67.
- MARQUES, A.C. Epidemiological data on malaria for all of Brazil in 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.28, p.141-155, 1995.
- MARVEL, C.S., HAGER, F.D. **Org. Synth.**, New York, v.1, p.248, 1948.
- MANSKE, R.H. **The chemistry of quinolines**. National Research Council of Canada, p.113-125, 1941.
- MESHNICK, S.R., TAYLOR, T.E., KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.60, n.2, p.301-315, 1996.
- MOLANDER, A.G., MACKIE, J.A. Stereochemical investigations of samarium(II) iodide-promoted 5-exo and 6-exo ketyl-olefin radical cyclization reactions. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.60, p.872-882, 1995.

- MONS, B., KLASSEN, E., VAN KESSEL, R., NCHINDA, T. Partnership between South and North crystallizes around malaria. **Science**, Washington, v.219, n.23, p.498-499, 1998.
- MORRISON, R.T., BOYD, R.N. **Organic chemistry**. 5. ed. New York: Allyn and Bacon, 1972. 1061p.
- MUKHERJEE, T. Antimalarial herbal drugs: a review. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.62, n.3, p.197-204, 1991.
- NEIVA, A. A formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente a quinina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.2, p.131-140, 1910.
- NICOLAU, K.C., PETASSIS, N.A., Selenium in natural products synthesis. **Cis. Inc.**, Philadelphia. 1984.
- NHI. Ética e legislação. Higiene, desinfecção e esterilização – Deleca, R.R., Damy, S.B., Biossegurança. Definição sanitária de animais de laboratório. Definição genética de animais de laboratório. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 20002.
- NORONHA, E., ALECRIM, M.G., ROMERO, G.A.S., MACÊDO, V. Resistência à malária mefloquina do tipo RIII em crianças com malária *falciparum* em Manaus. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.33, p.201-205, 2000.
- OETTINGEN, W.F. **The therapeutic agents of the quinoline group**. New York: Chemical Catalog, 1933.

- PACHECO, A.D., BARRADAS, L.C., BOULOS, M. **Manual de terapêutica de malária**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias, 1998. 56p.
- PAQUETTE, L.A. Furano, pirrol e tiofeno. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos de química heterocíclica**. Ohio: Limusa, 1987. cap.4 e 5, p.113-187.
- PATANI, G.A., LAVOIE, E. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chem. Rev.**, Columbus, v.96, p.3147-3176, 1996.
- PERRIN, D.D., ARMAREGO, W.L.F., PERRIN, D.R. **Purification of laboratory chemicals**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1980. 568p.
- PÊSSOA, S.B., MARTINS, A.V. **Pessoa parasitologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988. p.253-271.
- PERTILE, E.R., CUNHA, M.L.O.N. Democratização e participação social no processo de descentralização do controle das endemias no Estado do Mato Grosso. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISAS EM MALÁRIA, 7, Rio de Janeiro, 2000.
- PETERS, W. **Chemotherapy and drug resistance in Malaria**. 2.ed. London: Academic Press, 1987. v.1, p.1-65.
- PETERSON, D.S., DI SANTI, S.M., PÓVOA, M., CALVOSA, V.S., ROSÁRIO, V.E., WELLEMS, T.E. Prevalence of the dihidrofolate reductase Asn-108 mutation as the base for pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.45, p.492-497, 1991.

- PINTO, O.S. **Endemias rurais: métodos de trabalho adotados pelo departamento nacional de endemias rurais (DNERu)**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1968. p.210-236.
- POSNER, G.H., OH, C.H., WANG, D., GERENA, L., MILHOUS, W., MESHNICK, R., ASAWAMAHASADKA, W. Mechanism-Based design, synthesis, and *in vitro* antimalarial testing of new 4-methylated trioxanes structurally related to artemisinin: the importance of a carbon-centered radical for antimalarial activity. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.37, p.1256-1258, 1994.
- POSNER, G.H., TAO, X., CUMMING, J.N., KLINEDINST, D., SHAPIRO, T.A. Antimalarially potent, easily prepared, fluorinated endoperoxides. **Tetrahedron Lett.**, Amsterdam, v.37, n.40, p.7225-7228, 1996.
- PRICE, C., ROBERTS, R. The synthesis of 4-hidroxyquinolines. I. Through ethoxymethylenemalonic ester. **Periódico**, v.68, p.1204-1208, 1946.
- RACHOU, R.G. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, p.145-181, 1958.
- REID, A.J.C., WHITTY, C.J.M., AYLES, M.H., JENNINGS, R.M., BOVILL, A.B., FELTON, J.M., BEHRENS, H., BRYCESON, A.D.M., MABEY, D.C.W. Malaria at christmas: risks of prophylaxis versus risks of malaria. **BMJ**, London, v.317, n.28, p.1506-1508, 1998.
- REYNOLDS, G.A., HAUSER, C.R. 2-methyl 4-hydroxyquinoline (4-quinolinol, 2-methyl). **Org. Synth.**, New York, v.3, p.593-594, 1955.

REITZ, A.B., NORTEY, S.O., MARYANOFF, B.E. Stereoselectivity of electrophile-promoted cyclizations of  $\gamma$ -hidroxialkenes: a investigation of carbohydrate-derived and model substrates, **J. Org. Chem.**, Columbus, v.52, p.4191-4202, 1987.

REY, L. **Malária: os plasmódios humanos, a doença, epidemiologia e controle.** In: \_\_\_\_\_. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1992. cap.12/14, p.106-136.

RIETVELD, A. **Frequently-asked questions about malaria.** Disponível em:<http://www.outbreak.org/cgi-eg/dynaserve.exe/Malaria/faq.html>. Acesso em: 3/10/2000.

RODRIGUES, D.C. Casos de malária por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento pela cloroquina. **Arq. Hig. Saude Publica**, São Paulo, v.26, p.231-235, 1961.

SADTLER STANDARD. **NMR  $^{13}\text{C}$ , NMR  $^1\text{H}$  Espectros.** Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1978. 6683M, 4683C, 10200M, 1201C, 6662M, 411C, 5024M, 765C.

SCHLESINGER, P.H. *et al.* Antimalarial agents: mechanism of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.32, n.6, p.793-798, 1988.

SCHMIDT, L.H. Compatibility of relapse pathern of plasmodium cynomolgi infections in rheusers monkeys with continuos cyclical developemnt and hypnazoite concepts of relapse. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.35, n.6, p.1077-1099, 1986.

- SEGURADO, A.A.C., DI SANTI, S.M., SHIROMA, M. *In vivo* and *in vitro* *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine, amodiaquine and quinine in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, São Paulo**, v.39, p.85-89, 1997.
- SEEMAN, J.I. Effect of conformational change on reactivity in organic chemistry.: evaluations, applications, and extensions of Curtin-Hammett/Winstein-Holness Kinetics. **Am. Chem. Soc.**, v.83, n.2, p.83-85, 1983.
- SHAINYANG, B.A., MIRSKOVA, A.N. The carbon-nitrogen triad prototropic tautomerism. **Russ. Chem. Rev.**, Letchworth, v.48, p.106-107, 1979.
- SIGMA. Biochemicals and Reagents for Life Science Research, Molecular Biology. Signal transduction Cell Culture. IMMUNOCHEMICALS. Brasil-USA, 1998.
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. Infrared spectrometry, proton magnetic resonance spectrometry, <sup>13</sup>C NMR spectrometry. In: \_\_\_\_\_. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6.ed. New York: John Wiley, 1998. cap.3/5, p.71-249.
- SMITH, M.B. Synthesis: theory, reactions, and methods. **Organic Synthesis**, New York: Mc Graw-Hill, 1994. p.1334-1338.
- SOLOMONS, T.W. Aromatic compounds. I. The phenomenon of aromaticity; aromatic compounds. II. Reactions of aromatic compounds with electrophiles. In: \_\_\_\_\_. **Organic chemistry**. 5.ed. New York: John Wiley, 1992.

- SOUZA, J.M. Plasmodium falciparum strain resistance to drugs: new drug trails. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.34, suppl.9, p.S10-S15, 1992.
- STELLA, V.J., CHARMAN, W.N.A., NARINGREKAR, V.H. Prodrugs: do they have advantages in clinical practice? **Drugs**, Auckland, v.29, p.445-473, 1985.
- STERNBACH, L.H. The benzodiazepine story. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.22, p.1-8, 1978.
- STICKNEY, D.R., SIMMONS, W.S., DE ANGELIS, R.L., RUNDLES, R.W., NICHOL, C.A. Pharmacokinetics of pyrimethamine (PRM) and 2,4-diamino-5-(3',4'-dichlorophenyl)-6-methylpyrimidine (DMP) relevant to meningeal leukemia. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, Chicago, v.14, p.52, 1973.
- SUKATA, K. The selective Nmonoalkylation of amides with alkyl halides in the presence of alumina and KOH. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v.58, p.838-843, 1985.
- SVENDSEN, P., HAU, J. Environmental impact on animal experiment. In: \_\_\_\_\_. **Handbook of laboratory animal science**. Boca Raton: CRC, 1994. v.1, p.191-220.
- WERNSDORFER, W.H., TRIGG, P.I. **Primaquine: pharmacokinetics, metabolism, toxicity and activity**. New York: John Wiley, 1987. (Proceedings of a Meeting of the Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria).
-



- TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.93, p.157-165, 1986.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. cap.33, p.612-625.
- TERRAZAS, W.C.M., TADEI, W.P., LOPES, N.M., QUEIROZ, C.A.B., OLIVEIRA, A.E.M., FIGUEIREDO, E.O. Fortalecimento da vigilância epidemiológica e redução da malária no Estado do Amazonas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISAS EM MALÁRIA, 7, Rio de Janeiro, 2000. Local de public: 121p.
- THE MERCK INDEX. 12.ed. Whitehouse Station, 1996.
- TRACY, J.W., WEBSTER Jr., L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections - Malaria. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: Macgraw-Hill, 1996. cap.40, p.965-985.
- TRAGER, W., JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, Washington, v.193, p.673-675, 1976.
- TRIGG, P.I., KONDRACHINE, A. Commentary: Malaria control in the 1990s. **Bull. W. H. O.**, Geneva, v.76, n.1, p.11-16, 1998.
- VASCONCELOS, M.A., ROSÁRIO, V.E. Testes de sensibilidade *in vitro* de amostras de *Plasmodium falciparum* da bacia Amazônica. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v.35, p.21-28, 1983.
-

WANDERLEY, D.M.V., SILVA, R.A., ANDRADE, J.C.R. Aspectos epidemiológicos da Malária no Estado de São Paulo. **Rev. Saude Publica**, São Paulo, v.28, p.192-197, 1994.

WERMUTH, C.G. Molecular variations based on isosteric replacements. In: \_\_\_\_\_. **The practice of medicinal chemistry**. San Diego: Academic Press, 1996. cap.13, p.203-238.

WERMUTH, C.G. Ring transformation. In: \_\_\_\_\_. **The practice of medicinal chemistry**. San Diego: Academic Press, 1996. cap.14, p.240-260.

WESCHE, D.L., DECOSTER, M.A., TORTELLA, F.C., BREWER, T.G. Nematotoxicity of artemisinin analog *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.38, p.1813-1819, 1994.

WHITE, N.J. Malária. In: COOK, G.C. **Manson's tropical diseases**. 20.ed. London: WB Saunders, 1996. cap.61, p.1087-1164.

WILCOX Jr, C.F., WILCOX, M.F. **Experimental organic chemistry: a small-scale approach**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1995. p.208-263.

WILLIAMS, H.D., FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 5.ed. Oxford: MacGraw-Hill International. 1997. p.170-224.

WIN, K., THAN, M., THWE, Y. Partnership between South and North crystallizes around malaria. **Bull. W.H.O.**, Geneva, v.70, n.23, p.777-782, 1992.

WISELOGLE, F.Y., ed. **A survey of antimalarial drugs: 1941-1945**. Ann Arbor: J.W. Edwards, 1946.

**WOLFF, M.E. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. 5.ed.**  
New York: John Wiley, 1997. v.5, p.1-53.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION. International travel and health:**  
vaccination requirements and health advice. Geneva: WHO, 2000.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria prevention and control.**  
Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/malaria.html>. Acesso em: 03  
Out. 2000.

**YOUNG, D.M., ALLEN, C.F.H. Org. Synth.,** New York, v.2, p.219, 1943.