

TESE DE DOUTORADO EM CO-TUTELA

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
E
UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI
FACULTÉ DE PHARMACIE
ÉCOLE DOCTORALE 425
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE: DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

NASHIRA CAMPOS VIEIRA

QUINOLEÍNAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO 2 COM POTENCIAL LEISHMANICIDA
SELEÇÃO DE UM COMPOSTO PROMISSOR PARA O DESENVOLVIMENTO CLÍNICO

BRASÍLIA

2008

NASHIRA CAMPOS VIEIRA

QUINOLEÍNAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO 2 COM POTENCIAL LEISHMANICIDA
SELEÇÃO DE UM COMPOSTO PROMISSOR PARA O DESENVOLVIMENTO CLÍNICO

Tese em co-tutela apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília e à l'École Doctorale de l'Université Paris-Sud XI como requisito parcial à obtenção do grau de doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espíndola

Orientador: Prof. Dr. Philippe M. Loiseau

BRASÍLIA

2008

NASHIRA CAMPOS VIEIRA

QUINOLEÍNAS SUBSTITUÍDAS NA POSIÇÃO 2 COM POTENCIAL LEISHMANICIDA
SELEÇÃO DE UM COMPOSTO PROMISSOR PARA O DESENVOLVIMENTO CLÍNICO

Tese em co-tutela aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília e de l'École Doctorale de l'Université Paris-Sud XI pela seguinte banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espíndola / Orientadora – Universidade de Brasília / Brasil

Prof. Dr. Philippe M. Loiseau / Orientador – Université Paris-Sud XI / França

Prof. Dr. Manoel Barral Netto – FIOCRUZ / UFBA / Brasil

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero / Faculdade de Medicina – UnB / Brasil

Dr. Alain Fournet / Institut de Recherche pour le Développement (IRD) / França

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães / Faculdade de Medicina – UnB / Brasil

Dr. Joel Vacus / Drugabilis / França

Brasília, 27 de outubro de 2008

À memória de meus antepassados

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo carinho, dedicação e amor eternos.

À todos os meus amigos de fé, meus irmãos camaradas, da vida pessoal e profissional.

À Laila, por me tornar parte da família e pelo compromisso na luta diária para manter e melhorar nosso laboratório.

Ao Alain Fournet e Philippe Loiseau pela oportunidade de realizar parte da minha pesquisa em um ambiente tão rico em ciência e cultura.

À Pharsight Corporation (Mountain View, California, 94041, USA) pelo acesso ao programa de cálculos farmacocinéticos.

À Capes, pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

*"Uma coletânea de pensamentos deve ser uma farmácia onde se encontrem
remédios para todos os males".*

Voltaire

RESUMO

Um estudo etnofarmacológico realizado com as plantas tradicionalmente usadas na Bolívia para curar lesões da leishmaniose cutânea conduziu à descoberta da espécie *Galipea longiflora*. As purificações bioguiadas a partir da casca do caule, da casca da raiz e das folhas do arbusto conduziram ao isolamento de uma nova família de alcalóides, as quinoleínas substituídas sobre o carbono da posição 2. Algumas destas substâncias eram inéditas e foram chamadas chimaninas em homenagem aos índios Chimanos. Dos doze alcalóides testados em camundongos infectados por *L. amazonensis* ou *L. venezuelensis*, a 2-n-propilquinoleína e as chimaninas B e D se revelaram tão ou mais ativas que o medicamento de referência, o Glucantime®. Estes resultados interessantes foram patenteados pelo Institut de Recherche pour le Développement (IRD) juntamente com os colaboradores bolivianos. A partir de 1994, estes compostos começaram a ser sintetizados em laboratório e foram testados sobre diversos microrganismos. As quinoleínas que apresentaram os melhores resultados em estudos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniose: 2-n-propilquinoleína (composto 1), 2-(2 metoxietenil) quinoleína (composto 2) e 2-(2-hidroxi-prop-2-enil) quinoleína (composto 3), foram escolhidas para este trabalho de tese que teve o objetivo de selecionar o composto mais promissor para o desenvolvimento clínico. O estudo de ação *in vitro* sobre promastigotas de *Leishmania donovani* mostrou que o composto 1 apresenta fraca atividade com $IC_{50} > 100 \mu M$ sobre todas as cepas. Os compostos 2 e 3, ao contrário, apresentaram boa atividade com concentrações inibitórias mais baixas que a sitamaquina, uma 8-aminoquinoleína, sobre todas as cepas testadas. No estudo de interação *in vitro* não houve sinergismo das associações estudadas. O composto 1 foi o mais estável no ensaio de estabilidade química e o composto 2, o menos estável, demonstrando a formação de vários produtos de degradação. O estudo de toxicidade aguda com os compostos 1 e 2 mostrou sinais reversíveis sobre o comportamento dos animais nas doses mais elevadas. Porém, nada foi observado nos grupos tratados com 100 mg/kg e 10 mg/kg. Não houve diferenças significativas nos resultados das análises bioquímicas. Após estes ensaios, o desenvolvimento do composto 1 foi priorizado e, para solucionar problemas de solubilidade e volatilidade desta molécula, uma nova formulação foi sintetizada. Então, a biodisponibilidade do composto 1 foi avaliada após administração intravenosa mostrando um decaimento biexponencial rápido com meia-vida de distribuição de 4,6 min e meia-vida de eliminação de 58,7 min. Os resultados dos testes de atividade *in vitro* e biodisponibilidade sugerem que o composto 1 é uma pró-droga. Com base no histórico das quinoleínas e nos resultados obtidos neste trabalho, o composto 1 foi selecionado como a molécula mais promissora para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: quinoleínas, *Galipea longiflora*, leishmaniose

ABSTRACT

An ethnopharmacological study carried out with some medicinal plants used to treat cutaneous leishmaniasis conducted to the discover of *Galipea longiflora*. Bioguided studies of the root barks, stem barks, and leaves conducted to the isolation of a new family of alkaloids, the 2-substituted quinolines. Some of these substances were unpublished and were called chimanines in honor of the Chimano Indians. From the twelve alkaloids tested in mice infected by *L. amazonensis* or *L. venezuelensis*, the 2-n-propylquinoline and chimanines B and D were revealed more or as active as the reference medicine, Glucantime®. These interesting results were patented by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) together with colombian coworkers. Since 1994, these compounds are synthesized in laboratory and are tested on several microorganisms. The most active quinolines in *in vitro* and *in vivo* studies of leishmaniasis: 2-n-propylquinoline (compound 1), 2-(2-methoxyethenyl)quinoline (compound 2) and 2-(2-hydroxyprop-2-enyl)quinoline (compound 3) were chosen for this thesis. In the present study, further experiments were performed in order to choose the most promising compound as a potential drug candidate for the development of a new oral therapy. Compound 1 exhibited a weak IC₅₀ value in the *in vitro* activity test. Compounds 2 and 3 were more active than sitamaquine, a 8-aminoquinoline, against all tested strains. *In vitro* interactions showed no synergism for compound 1 combined with the other compounds or reference drugs. Compound 1 was the most stable molecule in various solutions whereas compound 2, the most unstable, displayed new peaks in chromatograms ascribable to degradation products. Reversible side effects were observed after oral administration of compounds 1 and 2 at 1000 mg/kg but nothing was detected at 100 mg/kg and 10 mg/kg. Biochemical data did not show any significant modification. After these previous results, compound 1's development was focused and, in order to solve solubility and volatility problems, a new formulation salt has been created. A bioavailability study of intravenously administered compound 1 showed that concentrations of the compound 1 in plasma declined rapidly in a bi-exponential manner. Distribution half-life and elimination half-life were 4,6 min and 58,7 min, respectively. *In vitro* activity and pharmacokinetic results indicate that compound 1 could act as a prodrug. The results from this and previous studies allow to conclude that compound 1, the first 2-substituted quinoline isolated from *Galipea longiflora*, is presently the most promising molecule from this series for further preclinical development work.

Key words: quinolines, *Galipea longiflora*, leishmaniasis

RÉSUMÉ

Les leishmanioses sont des affections cutanées ou viscérales dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* et transmises par la piqûre de certaines espèces de phlébotomes du genre *Lutzomyia* dans le Nouveau monde et *Phlebotomus* dans l'Ancien monde. Les leishmanioses sont présentes dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays. La prévalence globale de cette maladie est estimée à 12 millions de personnes touchées dans le monde, avec 2 millions de cas nouveaux chaque année. Un autre facteur important est venu s'ajouter; la leishmaniose viscérale figure dans les maladies opportunistes chez les malades touchés par le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Comme beaucoup de maladies dans les pays en voie de développement, il manque de médicaments efficaces et accessibles et le parasite ou les insectes vecteurs deviennent de plus en plus résistants aux molécules anti-parasitaires existantes. Les traitements employés contre les leishmanioses font appel à des produits généralement assez toxiques comme des dérivés antimoniés (Glucantime® ou Pentostam®), l'amphotéricine B ou la pentamidine. Ces médicaments sont peu maniables; ils doivent être administrés par voie injectable et ils présentent des effets secondaires importants qui nécessitent souvent une hospitalisation et l'attention d'un personnel compétent pour effectuer les perfusions. La miltéfosine, première molécule active par voie orale, génère des résistances in vitro chez les parasites. La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire.

Les plantes représentent des sources importantes de nouveaux composés et sont généralement utilisées par les populations qui vivent dans les zones d'endémies lointaines des centres de santé. Des études ethnopharmacologiques ont été entreprises dans ce sens par des chercheurs de l'IRD en Amérique du Sud. Ces derniers, en collaboration avec des chercheurs du CNRS et de l'université Paris-Sud, ont ainsi découvert et étudié des alcaloïdes de la famille chimique des quinoléines, dotés de propriétés antiparasitaires. Ces molécules, obtenues par synthèse chimique, sont des analogues de quinoléines isolées initialement d'une plante bolivienne, *Galipea longiflora* (Rutaceae). Parmi ces molécules, certaines se sont révélées particulièrement actives contre les parasites du genre *Leishmania*, présentant

une efficacité égale ou supérieure à celle du médicament de référence pour traiter les leishmanioses, le glucantime®. Les trois quinoléines les plus prometteuses, la 2-n-propylquinoléine (composé 1), la 2-(2-méthoxyéthényl)quinoléine (composé 2) et la 2-(2-hydroxyprop-2-enyl)quinoléine (composé 3) ont été choisies pour ce travail de thèse. L'objectif a été de comparer ces molécules afin de sélectionner l'un d'eux pour un pré-développement clinique.

L'activité antileishmanienne *in vitro* sur les formes promastigotes sauvages et chimiorésistantes de *Leishmania donovani* a montré que le composé 1 est peu actif *in vitro* ($CI_{50} > 100 \mu M$) quelque soient les souches. Les composés 2 et 3, par contre, ont présenté des CI_{50} *in vitro* plus basses que celle du produit de référence, la sitamaquine, une amino-8-quinoléine, sur toutes les souches étudiées. Ils sont également plus actifs que la miltéfosine sur la lignée HePC-résistante.

L'étude d'association de chacun des trois composés avec des antileishmaniens de référence a été réalisée *in vitro* afin de rechercher une synergie d'action mais les associations n'ont montré qu'un effet additif.

Un essai de stabilité chimique des quinoléines a été réalisé dans différentes solvants et conditions de température et de luminosité. Chacun des composés a ainsi été étudié dans le méthanol, le diméthylsulfoxyde, le PBS à pH 7, l'acide camphosulfonique à pH 2 ou un mélange de carboxyméthylcellulose/tween 80 à 4°C, à température ambiante sous influence de la lumière ou à température ambiante à l'obscurité pendant 9 jours. Le composé le plus stable dans ces conditions a été le composé 1. Le composé 2 s'est avéré le moins stable et les chromatogrammes ont montré l'existence de produits de dégradation.

L'étude de toxicité aigue a été réalisée sur les composé 1 et 2 chez les souris CD-1 à 1000, 100 et 10 mg/kg. Les composés ont été administrés en dose unique par voie orale et le comportement des animaux a été observé sur 14 jours. Des signes de toxicité comportementale réversible ont été observé après l'administration de 1000 mg/kg des composés mais aucun signe n'a été détecté à 100 et 10 mg/kg. Les analyses biochimiques du sang

prélevé au dernier jour après l'administration, a permis de noter aucune modification significative sur les marqueurs de toxicité hépatique et rénale.

Après les résultats ci-dessus, le développement du composé 1 a été priorisé. Le composé 1 est le composé naturel qui présente une grande facilité de synthèse et est stable dans les milieux évalués. Mais, ce composé est une molécule apolaire basique, volatile et huileuse qui présente des problèmes de solubilité un milieu aqueux. Ainsi, L'étape suivante a consisté à préparer une formulation d'un sel cristallin du composé 1 qui permettent la préparation de comprimés pour l'administration orale. La préparation de cette formulation et sa caractérisation par microscopie optique et diffraction aux rayons X a fait l'objet d'un dépôt de brevet français en avril 2008.

La dernière partie du travail a consisté à étudier la biodisponibilité du composé 1 chez les rats Wistar par voie intraveineuse. Les résultats obtenus après administration intraveineuse chez le rat montrent une décroissance en 2 étapes. La première, très rapide, d'une demi-vie de 4,6 minutes correspond à la distribution, la fixation aux protéines et aux éléments figurés du sang ainsi qu'à la captation tissulaire. La seconde, plus lente, d'une demi-vie de 58,7 minutes correspond à la phase d'élimination. Cependant, le composé reste très actif à la dose administrée, ce qui suggère la présence d'un métabolite actif qui n'a pas encore été identifié.

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse permet de conclure que le composé 1 est actuellement la molécule la plus prometteuse de cette série pour le traitement de la leishmaniose.

Mots clés: quinoléines, *Galipea longiflora*, leishmaniose

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Síntese dos compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	145
Anexo 2 – Curvas de calibração dos compostos 1, 4, 5 e 6.....	162
Anexo 3 – <i>Screening</i> com o Banco de Extratos de Plantas do Cerrado e Toxicidade sobre fibroblastos.....	166
Anexo 4 – Patente.....	178
Anexo 5 – Artigos.....	193

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose.....	02
Figura 2 – Estágios do agente etiológico da leishmaniose.....	05
Figura 3 – Exemplo de flebotomíneo.....	07
Figura 4 – Mapa da distribuição geográfica da leishmaniose cutânea.....	09
Figura 5 – Mapa da distribuição geográfica da leishmaniose visceral.....	09
Figura 6 – Mapa de distribuição global da co-infecção <i>Leishmania</i> / HIV.....	15
Figura 7 – Ciclo de transmissão da leishmaniose.....	17
Figura 8 – Estruturas moleculares dos antimoniais pentavalentes.....	20
Figura 9 – Estrutura molecular da anfotericina B.....	26
Figura 10 – Estrutura molecular da pentamidina.....	27
Figura 11 – Estrutura molecular da miltefosina.....	31
Figura 12 – Estrutura molecular da sitamaquina.....	35
Figura 13 – Estrutura molecular da paromomicina.....	37
Figura 14 – Estrutura molecular do imiquimod.....	38
Figura 15 – <i>Galipea longiflora</i> Krause.....	46
Figura 16 – Mapa da localização da espécie <i>Galipea longiflora</i> Krause.....	47
Figura 17 – Anel quinoléico com as posições indicadas.....	47
Figura 18 – Quinoleínas substituídas na posição 2: composto 1 (2-n-propilquinoleína), composto 2 (2 – (2 metoxietenil) quinoleína) e composto 3 (2-(2-hidroxi-prop-2-enil) quinoleína).....	50
Figura 19 – Reação de síntese do sal canfosulfônico do composto 1.....	67
Figura 20 – Metabólitos hidroxilados do composto 1.....	69
Figura 21 – Rato Wistar cateterizado em gaiola metabólica.....	73
Figura 22 – Coleta de sangue do animal através do cateter.....	75
Figura 23 – Gráfico e cromatogramas do primeiro e último dia do estudo de estabilidade química do composto 1 em PBS (pH 7).....	83
Figura 24 – Gráficos da concentração do composto 1 em ácido canfosulfônico (pH 2), DMSO, CMC/tween e metanol.....	84
Figura 25 – Gráficos da concentração do composto 2 em todos os solventes	

e condições de temperatura e luminosidade	85
Figura 26 – Composto 2 em metanol à 4°C no primeiro e 9° dia de estudo.....	86
Figura 27 – Composto 2 em ácido canfosulfônico (pH 2) em temperatura ambiente sob influência da luz no primeiro e no 9° dia de estudo.....	86
Figura 28 – Gráficos da concentração do composto 3 em todos os solventes e condições de temperatura e luminosidade	87
Figura 29 – Composto 3 em PBS à 4°C no primeiro e no 9° dia de estudo.....	88
Figura 30 – Composto 3 em DMSO em temperatura ambiente sob influência da luz no primeiro e no 9° dia de estudo.....	88
Figura 31 – Imagem do sal canfosulfônico do composto 1 em microscopia ótica em luz refletida com aumento de 40 x.....	91
Figura 32 – Imagem do sal canfosulfônico do composto 1 em microscopia ótica em luz polarizada com aumento de 81 x.....	92
Figura 33 – Superposição dos perfis de difração de raios X das amostras do sal canfosulfônico do composto 1.....	93
Figura 34 – Cromatograma dos compostos 1, 4, 5, 6 e do padrão interno em coluna Sunfire™ em fase móvel isocrática composta por tampão acetato 10 ⁻² M pH 4,0 e metanol 60:40 (v/v). Leitura à 233 nm.....	94
Figura 35 – Cromatograma do controle negativo de plasma à 233 nm.....	98
Figura 36 – Cromatograma do controle negativo de plasma à 233 nm.....	98
Figura 37 – Cromatograma de plasma do rato identificado como número 4 antes da administração do composto 1 (controle) com o pico do padrão interno.....	100
Figura 38 – Cromatograma de plasma do rato identificado como número 4 em 5 minutos após a administração do composto 1 com os picos do composto 1 e do padrão interno.....	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de casos de leishmaniose cutânea no Brasil de 1980 a 2006.....	11
Gráfico 2 – Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2006.....	12
Gráfico 3 – Curva de calibração do composto 1.....	95
Gráfico 4 – Curva de calibração do composto 4.....	95
Gráfico 5 – Curva de calibração do composto 5.....	96
Gráfico 6 – Curva de calibração do composto 6.....	96
Gráfico 7 – Perfil plasmático médio após administração intravenosa do composto 1.....	101
Gráfico 8 – Perfil de concentração plasmática do composto 1 após administração intravenosa em modelo bi-compartimental.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias isoladas de plantas com atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	44
Tabela 2 – Condições operacionais para aquisição dos perfis de difração de raios X.....	68
Tabela 3 – CI_{50} dos compostos e medicamentos de referência sobre formas promastigotas de <i>L. donovani</i>	80
Tabela 4 – FICI e resultado do efeito encontrado para as associações <i>in vitro</i> do composto 1 com os compostos 2 e 3 e com os medicamentos de referência.....	81
Tabela 5 – Sinais de toxicidade nos grupos tratados com os compostos 1 e 2 e no grupo controle.....	89
Tabela 6 – Análises bioquímicas do sangue coletado no último dia de observação dos grupos tratados com os compostos 1 e 2 e do grupo controle.....	90
Tabela 7 – Rendimento dos compostos 1, 4, 5 e 6 em plasma e urina.....	97
Tabela 8 – Parâmetros farmacocinéticos em modelo não-compartimental do composto 1 administrado por via intravenosa.....	101
Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos em modelo bi-compartimental do composto 1 administrado por via intravenosa.....	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. A LEISHMANIOSE.....	01
1.1.1. Formas clínicas da doença.....	01
1.1.2. Agente etiológico.....	04
1.1.3. Modo de transmissão.....	06
1.1.4. Distribuição geográfica.....	08
1.1.5. Ciclo de transmissão do parasito.....	15
1.1.6. Tratamentos.....	19
1.1.6.1. Antimoniais.....	19
1.1.6.2. Anfotericina B.....	23
1.1.6.3. Pentamidina.....	26
1.1.6.4. Miltefosina.....	28
1.1.6.5. Quimioterapias em desenvolvimento.....	34
1.1.6.5.1. Sitamaquina.....	34
1.1.6.5.2. Paromomicina.....	35
1.1.6.5.3. Imiquimod.....	37
1.1.6.6. Terapias combinadas.....	38
1.1.6.7. Produtos naturais.....	39
1.2. QUINOLEÍNAS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	45
1.2.1. A descoberta das quinoleínas.....	45
1.2.2. Farmacomodulação e relação estrutura-atividade.....	48
1.2.3. Quinoleínas selecionadas.....	49
1.2.4. Estudos com a 2-n-propilquinoleína (composto 1).....	50
1.2.5. Estudos com a 2-(2metoxietenil)quinoleína (composto 2).....	53
1.2.6. Estudos com a (E)-3-(quinoleína-2-il)prop-2-em-1-ol (composto 3).....	54
1.2.7. Estudos de biodisponibilidade com os compostos 1 e 3.....	55
2. OBJETIVOS.....	57
2.1. OBJETIVO GERAL.....	57
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	
3.1. AÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS QUINOLEÍNAS SOBRE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	58
3.1.1. Substâncias.....	58
3.1.2. Parasitos.....	58
3.1.3. Cultura de formas promastigotas.....	59
3.1.4. Ensaio <i>in vitro</i>	59

3.2. INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	61
3.3. ESTABILIDADE QUÍMICA.....	64
3.3.1. Preparo e armazenamento das soluções.....	64
3.3.2. Condições cromatográficas.....	65
3.4. TOXICIDADE AGUDA.....	66
3.4.1. Preparo das emulsões.....	66
3.4.2. Tratamento e análise.....	66
3.4.3. Síntese do sal canfosulfônico do composto 1.....	67
3.4.4. Caracterização do sal canfosulfônico do composto 1.....	67
3.5. ESTUDO FARMACOCINÉTICO.....	68
3.5.1. Compostos.....	68
3.5.2. Preparo das emulsões.....	69
3.5.3. Animais.....	70
3.5.4. Cateterização.....	70
3.5.4.1. Materiais.....	70
3.5.4.2. Procedimento.....	71
3.5.5. Administração do composto 1 e coleta das amostras.....	74
3.5.5.1. Materiais.....	74
3.5.5.2. Procedimento.....	74
3.5.6. Recuperação do plasma.....	76
3.5.7. Extração sólido-líquido.....	76
3.5.8. Curva de calibração.....	77
3.5.9. Rendimento.....	78
3.5.10. Condições cromatográficas.....	79
3.5.10. Cálculos farmacocinéticos.....	79
4. RESULTADOS.....	80
4.1. AÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS QUINOLEÍNAS SOBRE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	80
4.2. INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	81
4.3. ESTABILIDADE QUÍMICA.....	81
4.4. TOXICIDADE AGUDA.....	89
4.5. SÍNTESE DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1.....	90
4.6. CARACTERIZAÇÃO DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1.....	91
4.7. ESTUDO FARMACOCINÉTICO.....	94
5. DISCUSSÃO.....	103
5.1. AÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS QUINOLEÍNAS SOBRE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	103

5.2. INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	106
5.3. ESTABILIDADE QUÍMICA.....	108
5.4. TOXICIDADE AGUDA.....	111
5.5. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1.....	114
5.7. ESTUDO FARMACOCINÉTICO.....	116
6. CONCLUSÕES.....	125
7. PERSPECTIVAS.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXOS.....	145

1. INTRODUÇÃO

1.1. A LEISHMANIOSE

1.1.1. Formas clínicas da doença

Classificando-se a doença de modo básico, há duas formas de leishmaniose: a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral (Rath *et al.*, 2003). Entretanto, para cada uma destas formas de leishmaniose, existem variações da doença caracterizadas por um espectro de manifestações clínicas (TDR, 2005).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais severa e caracteriza-se pela presença de parasitos no baço, fígado, medula óssea e sistema reticuloendotelial. Os pacientes portadores desta forma da doença podem apresentar perda de peso, febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (Desjeux, 2004). As crianças podem apresentar diarreia e retardo no crescimento (Murray *et al.*, 2005).



Figura 1: **a** | Paciente com leishmaniose cutânea. **b** | Paciente com leishmaniose mucosa. **c** | Paciente com leishmaniose visceral. **d** | Paciente com leishmaniose dérmica pós-calazar nodular (WHO, 2007c e Chappuis *et al.*, 2007).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma variação da LV. Esta complicação se desenvolve após a cura aparentemente eficaz do calazar (WHO, 2007a). É manifestada pela presença de lesões na pele que podem ser de vários tipos e, inicialmente, são mais proeminentes na face (Herwaldt, 1999). Normalmente, os tratamentos são caros e prolongados (Desjeux, 2004). Os pacientes apresentam altas cargas parasitárias contribuindo para a manutenção dos reservatórios, especialmente em áreas onde o ciclo de transmissão é exclusiva ou predominantemente antroponótico (WHO, 2007a). Esta

manifestação é comum na Índia e na África (principalmente no Sudão e no Quênia) (TDR, 2005).

A leishmaniose tegumentar (LT) pode apresentar diversas manifestações clínicas que vão desde lesões ulcerativas que se desenvolvem no local da picada do flebótomo à múltiplos nódulos não-ulcerativos ou, ainda, à uma inflamação que provoca grande destruição tecidual na mucosa (Reithinger *et al.*, 2007). Embora não seja letal, a epidemia desta forma é preocupante e difícil de controlar (TDR, 2005).

A leishmaniose mucosa é uma das variações da LT causada pelo subgênero *Viannia*, tipicamente *L. (V.) braziliensis*, mas também *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*; podendo ser causada por *L. amazonensis* (Herwaldt, 1999). Esta forma, endêmica no México, na América Central e na América do Sul, produz lesões que podem levar à destruição desfigurante das membranas mucosas da boca, nariz e garganta (TDR, 2005).

A leishmaniose recidivante é outra forma variante, crônica, super reativa e oligoparasitária da LT do Velho Mundo; tipicamente manifestada por lesões faciais solitárias que curam no centro, mas aumentam gradualmente durante muitos anos; é causada por *L. tropica*, às vezes por *L. major*, e é encontrada no Irã, Iraque ou áreas vizinhas (Herwaldt, 1999).

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma crônica e progressiva manifestada por lesões não ulcerativas disseminadas na pele que evoluem para a formação de nódulos e placas com caráter altamente deformante. Esta forma se manifesta em indivíduos com marcada deficiência imunológica (Camargo & Barcinski, 2003) e é causada por *L. aethiopica* e *L. amazonensis* no Velho Mundo e por espécies do complexo *L. mexicana* no Novo Mundo (Catorze, 2005).

1.1.2. Agente etiológico

O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário do gênero *Leishmania* pertencente à família *Trypanosomatidae* (Herwaldt, 1999). Os parasitos podem ser encontrados em dois estágios (Figura 2): promastigotas, que é a forma flagelada encontrada nos flebotomíneos; com 15 a 20 μm de comprimento por 1,5 a 3,5 μm de diâmetro e um flagelo de 15–28 μm ; e amastigotas, que são formas arredondadas não-flageladas com 2 a 4 μm de diâmetro encontradas no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (Herwaldt, 1999).

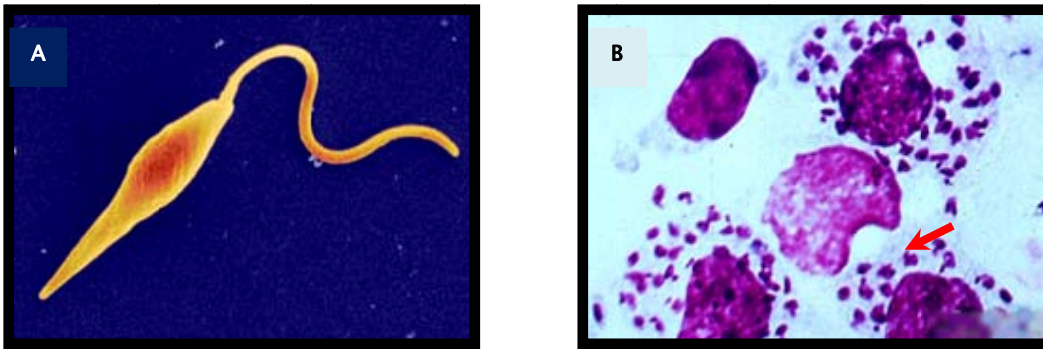


Figura 2: Formas promastigota (A) e amastigota intramacrofágica (B) do parasito *Leishmania* (Reproduzidas dos sites <http://www.sanger.ac.uk/Info/Press/2007/070617.shtml> e http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Leishmaniasis/amastigotes.jpg).

Mais de 20 espécies de *Leishmania* podem infectar os humanos e causar quadros distintos da doença, dependendo das características de virulência da espécie, da resposta imune do hospedeiro, de fatores genéticos e da associação com outras doenças (Vieira *et al.*, 2007).

As espécies envolvidas na LV são do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo); além da *L. tropica* (Velho Mundo) e *L. amazonensis* (Novo Mundo). Com relação à LT, as espécies são, no Velho Mundo, *L. tropica*, *L. killicki*, *L. major* e *L. aethiopica*; além de *L. infantum* e *L. donovani*. E, no Novo Mundo, o complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. garnhami* e *L. venezuelensis*) e o subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) peruviana*); além de *L. chagasi*. (Herwaldt, 1999; Bacellar & Carvalho, 2005; Reinthinger *et al.*, 2007)

1.1.3. Modo de transmissão

A infecção pode ser transmitida através da picada do flebotomíneo (Figura 3) infectado. Estes vetores pertencem à família *Psychodida* e podem ser do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (Rath *et al.*, 2003). Trinta espécies de flebotomíneos foram identificadas como transmissoras da doença (TDR, 2005). As espécies mais importantes de *Lutzomyia* no Brasil são: a *Lu. flaviscutellata*, pouco antropofílica e de hábitos noturnos, transmissora da *L. amazonensis*; a *Lu. welcomei*, *Lu. pessoai* e *Lu. migonei*, bastante antropofílicas, de hábitos diurnos e transmissoras da *L. braziliensis*; *Lu. umbratilis* transmissora da *L. guyanensis* e a espécie *Lu. longipalpis*, antropofílica, de hábitos peri-domiciliares e transmissora da forma visceral causada pela *L. chagasi* (Camargo & Barcinski, 2003).

O vetor tem aproximadamente 2-3 mm de comprimento, com pernas longas e delgadas e o corpo densamente piloso. Eles voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, o que facilita sua identificação (Camargo & Barcinski, 2003). Apenas as fêmeas são hematófagas e adquirem os parasitos ao se alimentarem de sangue de um hospedeiro mamífero infectado (Herwaldt, 1999).

No Brasil, os flebótomos são conhecidos popularmente por nomes diferentes em cada região: mosquito palha, asa dura, cangalha, arrepiado, entre outros (Camargo & Barcinski, 2003).

Estes insetos têm atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos (Rath *et al.*, 2003). Seus ovos e larvas desenvolvem-se em áreas úmidas ricas em matéria orgânica em decomposição, daí a sua preferência por florestas e sombra. Algumas espécies de flebótomos picam exclusivamente animais silvestres, muitas vezes uma única espécie. Outras, mais ecléticas, se alimentam sobre várias espécies de vertebrados, inclusive o homem. Não existe nenhuma que seja exclusivamente antropofílica (Camargo & Barcinski, 2003).

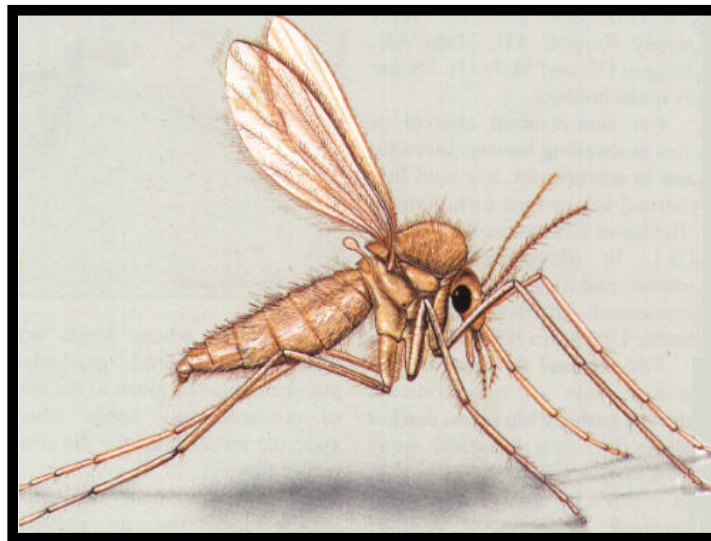


Figura 3: Exemplo de flebotomíneo. Espécie *Phlebotomus intermedius* (Reproduzido do site <http://biolab.cin.ufpe.br/leishmania/mosquito.html>).

A infecção também pode ser transmitida por via congênita e parenteral, através de transfusões de sangue, compartilhamento de seringas e acidentes de laboratório (Herwaldt, 1999).

1.1.4. Distribuição geográfica

Mais de 12 milhões de pessoas em 88 países são infectadas pela leishmaniose. Dois milhões de novos casos ocorrem anualmente, sendo 1,5 milhões de casos de LT (90% no Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Sudão) e 500 mil casos da forma visceral da doença (90% em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão) com uma estimativa de mais de 50 mil mortes (TDR, 2005; WHO, 2007b).

O foco da LV é a região sudeste da Ásia, com uma estimativa de 300.000 casos em 2006. A parte leste da África tem aproximadamente 30.000 casos por ano; e o terceiro maior foco está localizado nas Américas com 4.000 casos reportados em 2006 (WHO, 2007a).

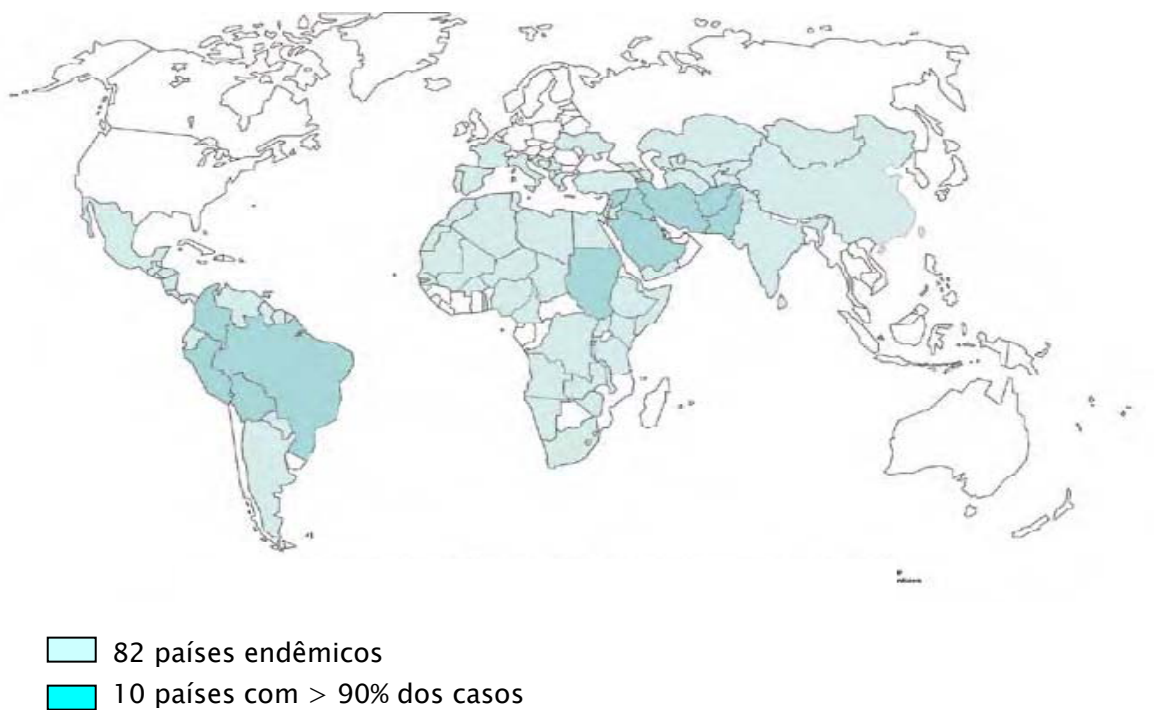


Figura 4: Mapa da distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (reproduzido da referência WHO, 2007c).



Figura 5: Mapa de distribuição mundial da LV (retirado da referência Chappuis *et al.*, 2007).

Novos focos estão aparecendo em uma taxa alarmante (WHO, 2007a) e a incidência da leishmaniose está crescendo. Muitas áreas endêmicas reportam uma elevação de 500% nos últimos sete anos (Roberts *et al.*, 2006). Este aumento se deve às migrações humanas, à deterioração das condições sociais e econômicas nas redondezas das áreas urbanas, ao aumento da transmissão nas cidades, à má nutrição (com conseqüente enfraquecimento do sistema imune) e à co-infecção com o HIV (WHO, 2007b).

A ausência de sistemas de vigilância e os freqüentes erros no diagnóstico mostram que a verdadeira incidência é subestimada. A falha no diagnóstico correto da doença leva ao aumento do número de casos fatais (WHO, 2007a). A declaração da doença só é obrigatória em 32 países, assim, um número substancial de casos e a mortalidade global não são registrados (Hailu *et al.*, 2005; TDR, 2005).

As leishmanioses afetam as populações mais pobres do mundo (Davies *et al.*, 2003). Na Índia, 88% dos pacientes recebem menos de dois dólares ao dia, vivem em condições sócio-econômicas difíceis e têm um baixo nível de instrução. Há um forte estigma social associado às deformidades e feridas desfigurantes causadas pela doença. Estas deficiências prejudicam o desenvolvimento sócio-econômico e a produtividade dos indivíduos afetados (TDR, 2005).

O Brasil apresenta um aumento do número de casos tanto para LT como para LV com incidência anual de 32.000 e 3.500 casos, respectivamente. Enquanto os casos de leishmaniose cutânea (LC) são largamente distribuídos, a LV é endêmica no Nordeste e nas áreas centrais do país (WHO, 2007a).

A distribuição da leishmaniose mudou com o aumento do número de casos em áreas urbanas e periurbanas e com a adaptação dos flebótomos às áreas peri-domiciliares, colocando um grande número de indivíduos em risco de contaminação (Oliveira *et al.*, 2004).

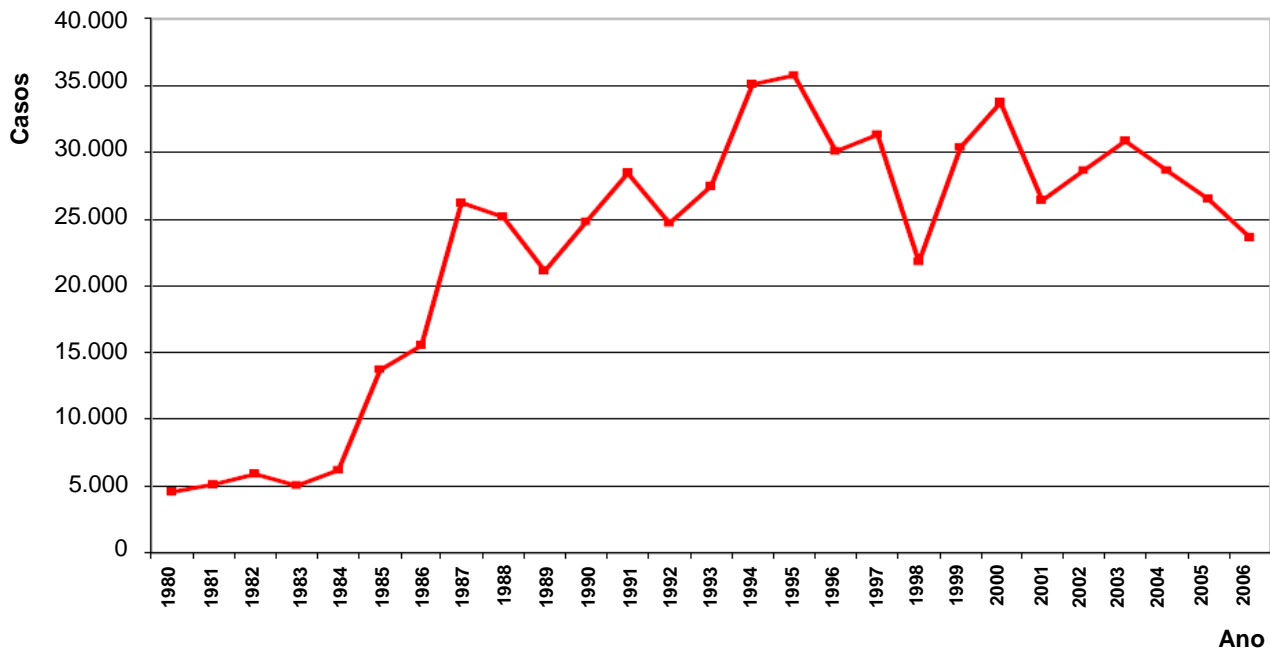


Gráfico 1: Número de casos de leishmaniose cutânea no Brasil de 1980 a 2006 (adaptado da referência WHO, 2007a).

No Brasil, a LV acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com

menos de 10 anos. Em alguns focos urbanos existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (Gontijo, 2004).

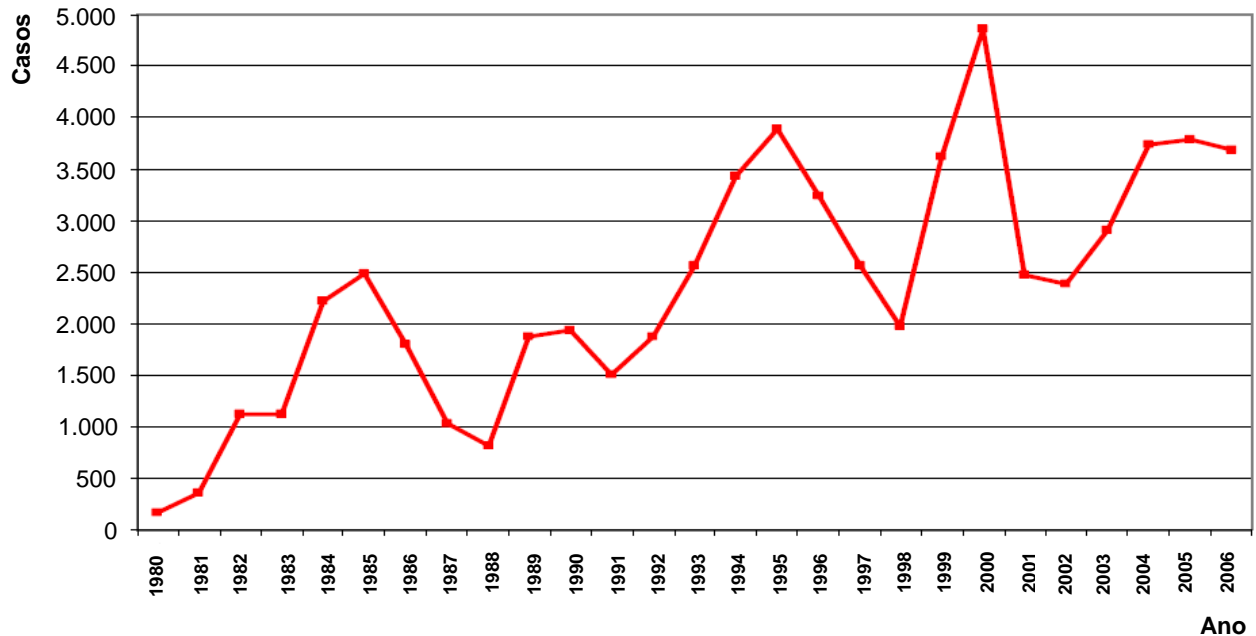


Gráfico 2: Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2006 (adaptado da referência WHO, 2007a).

A letalidade da LV vem aumentando gradativamente no Brasil, passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85% (MS, 2006).

O primeiro caso de leishmaniose associado à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi reportado em 1985. Desde então, 35 países têm reportado casos de co-infecção. A co-infecção leishmaniose/HIV está presente em 2-12% de todos os casos de LV - uma proporção que deve

umentar dramaticamente. Entre algumas populações, como em Humera – Etiópia, a proporção atinge 30% (WHO, 2007a).

Atualmente, a maioria dos relatos de casos de co-infecção à OMS advém do Sudeste Europeu; 90% de mais de 2.000 casos notificados em 2001 aconteceram na França, Itália, Portugal e Espanha (WHO, 2007a). Nos países da península Ibérica, a leishmaniose se tornou a terceira infecção oportunista mais freqüente no doente HIV – atrás da toxoplasmose e da criptosporidiose (Catorze, 2005). Entretanto, a incidência de novos casos clínicos de LV em indivíduos HIV positivos vem diminuindo significativamente na Europa durante os últimos dez anos (Dujardin, 2005).

Em outros continentes, ao contrário, a previsão de elevação do número de casos de co-infecção é preocupante (Dujardin, 2005). Em algumas áreas da África, como resultado de migrações e guerras, o número de casos de co-infecção aumentou consideravelmente. Na Ásia, os casos de co-infecções vêm crescendo na Índia, um país que também está confrontando altas taxas de resistência aos antimoniais. Apesar desta realidade, grande parte dos casos de países da África ou Ásia ainda não são diagnosticados por falta de recursos e o sistema de notificação é precário (WHO, 2007a).

A população de toxicodependentes por via endovenosa constitui o principal grupo de risco da co-infecção leishmaniose/HIV no Sudoeste da

Europa, constituindo 72% do total de doentes co-infectados. No Brasil, a situação é diferente, os toxicod dependentes por via endovenosa constituem 7% do total de doentes co-infectados (Catorze, 2005).

O Brasil é o epicentro do SIDA na América do Sul e contabiliza um terço de todas as pessoas que vivem com o vírus na região. O SIDA foi primeiramente relatada no Brasil em 1983, e o relatório UNAIDS 2006 estima que há 620.000 pessoas vivendo com o HIV no país. Entre os pacientes co-infectados, 78% eram homens com idade média de 38 anos (86% entre 20-49 anos). Dos casos de co-infecção, 53% foram da região Nordeste e 29% da região Sudeste (WHO, 2007a).

A leishmaniose mucocutânea é freqüentemente observada em pacientes co-infectados no Brasil (43%), um padrão clínico raramente encontrado (0,3%) no Sudeste Europeu (WHO, 2007a).

A co-infecção leishmaniose-HIV é resultante da sobreposição entre o vírus HIV e das espécies de *Leishmania* em áreas rurais e suburbanas. Os pacientes co-infectados são uma fonte de parasitos para os flebótomos e para outros humanos através de compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis (Dujardin, 2005).

Com a disseminação do HIV, apareceram formas incomuns de leishmaniose. Também pode ocorrer a reativação de infecções assintomáticas

ou previamente curadas. A co-infecção *Leishmania*/HIV é mais resistente ao tratamento e acelera substancialmente o progresso do SIDA (Roberts *et al.*, 2006).

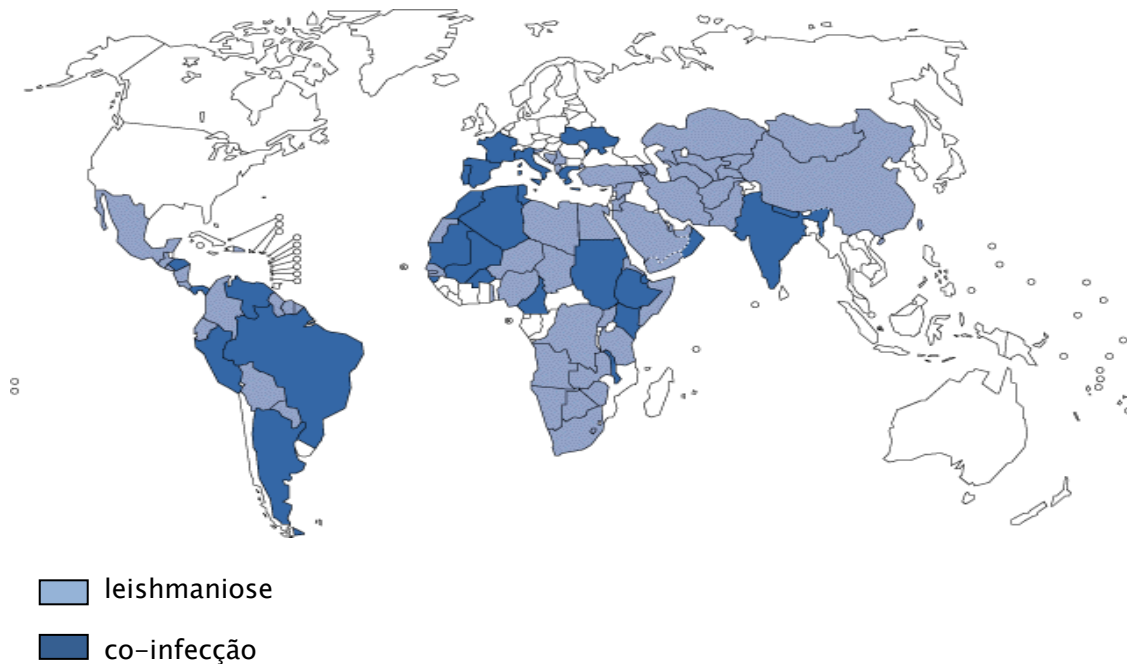


Figura 6: Mapa com a distribuição global dos casos reportados de co-infecção *Leishmania* / HIV e com a distribuição de casos de leishmaniose (reproduzido do site http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html).

Além do HIV, há outros fatores imunossupressores que contribuem para a disseminação da leishmaniose, como a tuberculose (Dujardin, 2005).

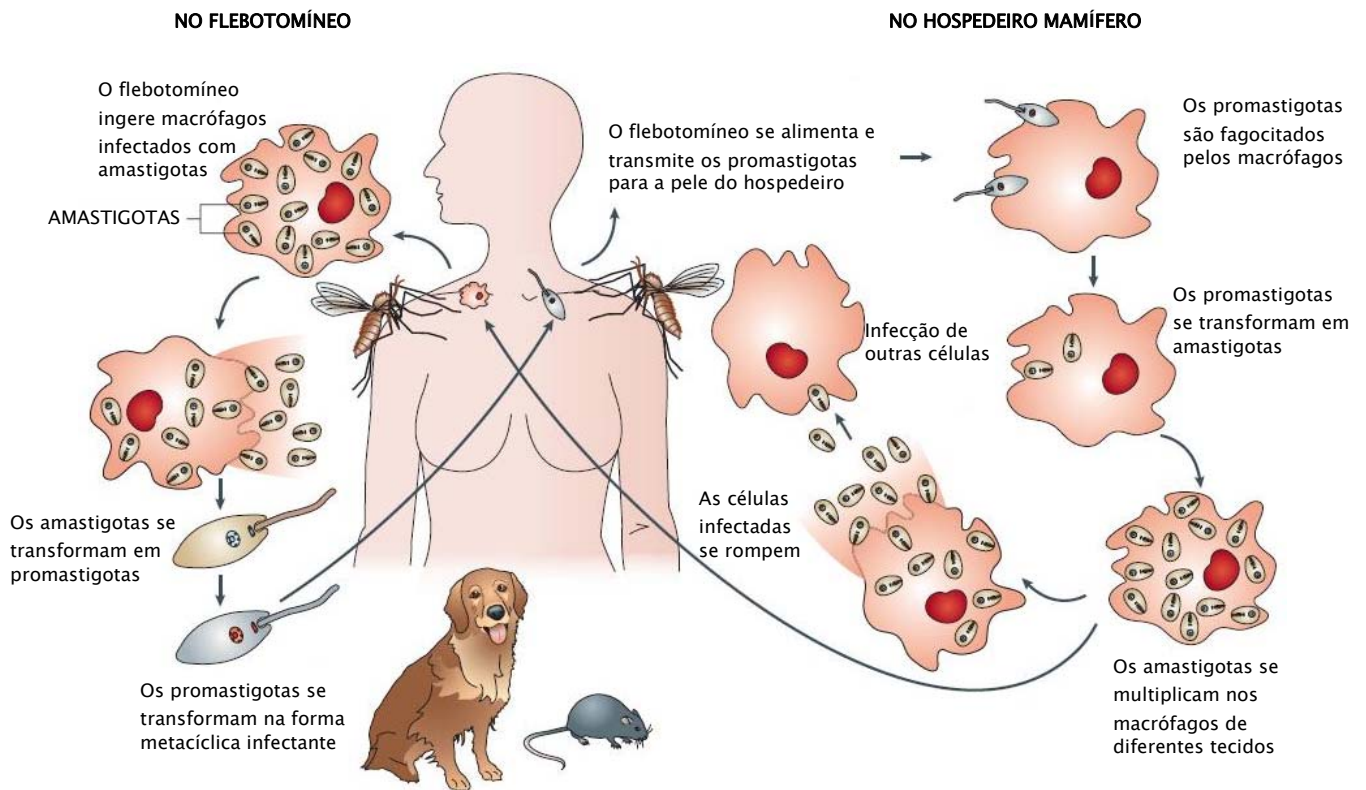
1.1.5. Ciclo de transmissão do parasito

No flebótomo, o parasito tem uma forma flagelada promastigota. Uma vez inoculada no mamífero, a *Leishmania* é fagocitada ou penetra nas células do sistema fagocítico mononuclear, onde perde o flagelo e transforma-se na forma

amastigota. Quando as células do sistema fagocítico não conseguem destruir o parasito, ele inicia sua multiplicação intracelular, lisando as células infectadas. Os parasitos são, então, liberados, repetindo o ciclo de penetração e destruição celular (Bacellar & Carvalho, 2005).

Cada espécie do parasito apresenta um quadro ecológico associado, com hospedeiros reservatórios, vetor e distribuição geográfica próprias. As diferentes associações podem resultar num ciclo de transmissão específico (Feitosa & Castellon, 2004). Alguns parasitos proliferam apenas em uma determinada espécie de flebótomo e outras adotam um largo espectro de vetores (Camargo & Barcinski, 2003).

Em algumas áreas, a leishmaniose é uma infecção zoonótica que envolve vários reservatórios (TDR, 2005), geralmente, animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros (Rath *et al.*, 2003). No Brasil, os reservatórios animais mais importantes são o cão, domiciliar, e a raposa, silvestre (Bacellar & Carvalho, 2005). Em algumas regiões, os humanos são os únicos reservatórios da infecção (TDR, 2005).



Ciclo de transmissão da leishmaniose: Os parasitos da *Leishmania* são transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados que injetam promastigotas na pele. Os promastigotas entram nos macrófagos onde se transformam em amastigotas. Os macrófagos infectados são ingeridos pelos flebotomíneos onde os parasitos se transformam em formas promastigotas.

Figura 7: Ciclo de transmissão da leishmaniose (adaptado de Lipoldová & Demant, 2006).

A doença, originariamente centrada no ambiente silvestre ou em pequenas localidades rurais, passa a ser identificada em centros urbanos devido à migração do mosquito transmissor em função do desmatamento, da expansão das áreas urbanas e da presença dos reservatórios, principalmente do cão doméstico (Vieira *et al.*, 2007).

Atualmente, a leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas. Estas doenças colaboram para o aumento da pobreza, pois interferem no crescimento e desenvolvimento infantil, reduzem a capacidade de trabalho e podem deixar seqüelas importantes (Hotez *et al.*, 2007).

Muitos fatores são responsáveis pela (re)emergência e disseminação da leishmaniose no mundo, entre eles, estão as mudanças do meio que podem ser climáticas (Cardenas *et al.*, 2006) ou produzidas pelo homem; o status imune do hospedeiro; as falhas terapêuticas e a resistência aos medicamentos (Dujardin, 2005). Além disso, a falta de acesso ao tratamento e a toxicidade dos medicamentos disponíveis são barreiras que dificultam a terapêutica (Hotez *et al.*, 2007).

Outro problema importante a ser contornado é a habilidade dos parasitos intracelulares de permanecerem no organismo do hospedeiro mesmo após a resolução da doença. Os parasitos do gênero *Leishmania* persistem na corrente sanguínea, na pele sadia, nas escaras e nos linfonodos de pacientes assintomáticos ou curados mesmo décadas após a infecção primária (Bogdan, 2008).

As estratégias de prevenção não têm sido suficientes para o controle desta endemia, uma vez que as diferentes formas das leishmanioses e as constantes mudanças dos seus padrões epidemiológicos dificultam as ações de

controle (Vieira *et al.*, 2007). Assim, o desenvolvimento de um tratamento eficaz é crucial para reduzir a mortalidade e morbidade da doença (Hailu *et al.*, 2005).

1.1.6. Tratamentos

1.1.6.1. Antimoniais

O antimoniato de meglumina (Glucantime® da Sanofi–Aventis) é comercializado no Brasil e nos países de línguas francesa e espanhola. O estibogluconato de sódio (Pentostam® da GlaxoSmithKline) é distribuído nos países de língua inglesa. Os antimoniais são eficazes no tratamento das formas cutânea, mucocutânea e visceral da doença (Rath *et al.*, 2003).

A Organização Mundial de Saúde preconiza a administração intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) em doses que não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia durante 30 dias (WHO, 2007a), respeitando o limite de 850 mg de antimônio, devido à sua elevada toxicidade (Rath *et al.*, 2003). Porém, o protocolo de tratamento pode ser diferente para cada área geográfica, pois a eficácia terapêutica pode variar dependendo do país (Santos *et al.*, 2008).

O uso destes medicamentos está associado à diversos efeitos colaterais tais como, dor no local da injeção, enrijecimento das articulações, mialgias, nefrites, alterações hepáticas e distúrbios gastrointestinais, cardiológicos e

respiratórios (Rath *et al.*, 2003; Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito (Rath *et al.*, 2003).

Os efeitos adversos destes medicamentos, principalmente pancreatite e cardiotoxicidade, são mais freqüentes em pacientes HIV positivos. Análises bioquímicas e monitoramento por eletrocardiograma são extremamente importantes durante o tratamento (WHO, 2007a).

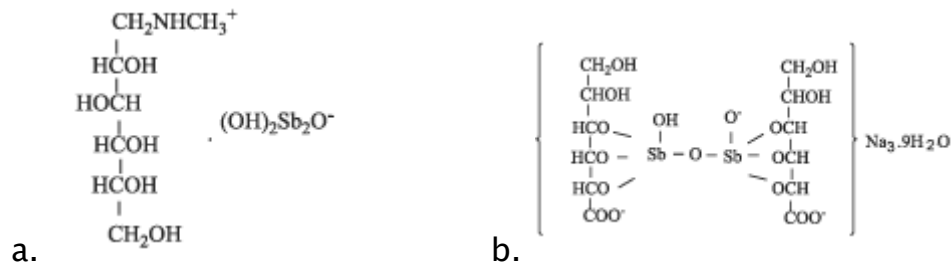


Figura 8: Estruturas moleculares do antimoniato de meglumina (a) e do estibogluconato de sódio (b) (retiradas da referência Rath *et al.*, 2003).

Pouco se compreende ainda sobre o mecanismo de ação do antimônio pentavalente, sugere-se que este medicamento possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração (Rath *et al.*, 2003). Esta conversão foi sugerida há mais de 50 anos e tem sido corroborada pela evidência em soro de pacientes tratados com Glucantime® que apresenta de 15 a 25% de antimônios trivalentes (Sereno *et al.*, 1998). Os detalhes do mecanismo de ativação e o sítio exato de conversão ainda não estão claros. Um estudo mostrou que parasitos amastigotas axênicos reduzem o antimônio

pentavalente à trivalente enquanto as formas promastigotas não são capazes de ativá-lo. Outros estudos sugerem que a redução provavelmente ocorre no macrófago e não no parasito. A redução ou perda desta ativação pode ser um mecanismo pelo qual o parasito pode se tornar resistente (Ouellette *et al.*, 2004).

Os antimoniais alteram importantes funções biológicas da *Leishmania*. Uma das vias de ação seria a interferência no processo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*. Estes compostos se ligariam às diferentes proteínas do parasito, particularmente às enzimas envolvidas na glicólise e oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a geração de ATP (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001; Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

Também há evidências de que os antimoniais trivalentes induzem a fragmentação do DNA, sugerindo que estes compostos matam os parasitos por um processo de apoptose (Serenó *et al.*, 2001; Sudhandiran & Shara, 2003). Contudo, estes efeitos não são operados pela via clássica mediada pelas caspases (Ashutosh *et al.*, 2007).

Além disso, os antimoniais parecem alterar o potencial redox da *Leishmania*, diminuindo as concentrações intracelulares de glutatona e tripanotona, dois compostos envolvidos na defesa do parasito contra agentes químicos eletrófilos (Kapoor *et al.*, 2000; Vickers & Fairlamb, 2004). O antimônio trivalente poderia se conjugar à glutatona (Sun *et al.*, 2000) e à

tripanotiona (Yan *et al.*, 2000) além de inibir a tripanotiona redutase da *Leishmania* (Cunningham *et al.*, 1994; Wyllie *et al.*, 2004).

Os antimoniais são mal-tolerados pelos pacientes co-infectados com LV e HIV na Europa (Delgado *et al.*, 1999) e muitos relatos mostram que, nestes pacientes, a espécie *L. infantum* desenvolve resistência após repetições do tratamento. Além disso, existem evidências de que o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, este em menor escala, estimulam a replicação do HIV-1 *in vitro* (WHO, 2007a).

Os antimoniais pentavalentes estão, atualmente, quase obsoletos na Índia por causa da resistência (Croft *et al.*, 2005). O problema é mais relevante no estado de Bihar na Índia que apresenta mais de 40% da incidência global da LV (Jha, 2006). Entretanto, eles ainda são úteis em outros países, sobretudo após a introdução de marcas genéricas no mercado que reduzem os custos do tratamento (Croft *et al.*, 2005). Em áreas endêmicas a taxa de resposta é de 85% (WHO, 2007a).

A terapia pode ser complicada pelas variações na sensibilidade das espécies de *Leishmania*, pela resposta imune do hospedeiro e pela farmacocinética do medicamento (Jha, 2006).

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de meglumina é rapidamente absorvido. O antimônio acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue. Uma quantidade expressiva de antimônio no sangue pode estar relacionada com a grande afinidade do antimônio trivalente pelos eritrócitos. A excreção de antimônio em humanos é preferencialmente via renal, mais de 80% é excretado na urina após 6–8 h. Em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento (Rath *et al.*, 2003).

As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento, paralelamente aos efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para este fármaco. Uma tentativa é o encapsulamento dos antimoniais em lipossomas, isto permitiria a redução de efeitos colaterais, dirigindo o fármaco para os sítios de ação, além de controlar sua concentração e a velocidade de liberação no órgão-alvo (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

1.1.6.2. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico poliênico (WHO, 2007a) produzido pelas bactérias *Streptomyces nodosus* (Rath *et al.*, 2003), que atua

sobre formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e *in vivo* (MS, 2006). Seu mecanismo envolve a interação com os esteróis da membrana da *Leishmania* (Ouellette *et al.*, 2004).

No Brasil, duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (MS, 2006).

Febre, flebite no lugar da injeção, danos renais e anemia são efeitos colaterais comuns; hipocalcemia e miocardite são efeitos adversos raros porém graves. Há 1% de toxicidade aguda fatal, assim, é primordial que haja um acompanhamento clínico e laboratorial (WHO, 2007a; Chappuis *et al.*, 2007).

A quimioterapia antileishmania tem se beneficiado do desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B, que reduziram a toxicidade e a longa meia-vida plasmática (Croft & Coombs, 2003). Os lipossomas carregadores da anfotericina B são bem absorvidos pelo sistema reticuloendotelial onde o parasito reside, diminuindo a absorção pelos rins que são os órgãos mais afetados pela sua toxicidade (Rath *et al.*, 2003). A formulação lipídica AmBisome® foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), mas o custo elevado tem limitado seu uso.

Algumas melhorias feitas para reduzir o custo incluem: testes de eficácia com doses únicas de AmBisome para o tratamento de LV, o uso de formulações lipossomais mais baratas e o desenvolvimento de nanopartículas, formulações lipídicas ou derivados químicos alternativos (Croft & Coombs, 2003).

A anfotericina B convencional substituiu os antimoniais como a primeira linha de tratamento para a LV em algumas áreas do Estado de Bihar na Índia devido às altas taxas de falha terapêutica dos antimoniais (Chappuis *et al.*, 2007).

A anfotericina B também está indicada como primeira escolha em pacientes com idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, co-morbidades, incluindo: infecções bacterianas, icterícia, fenômenos hemorrágicos (exceto epistaxe), edema generalizado, sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipoventilação ou hiperventilação e instabilidade hemodinâmica) (MS, 2006).

O medicamento é administrado por via intravenosa e a dose recomendada, embora ainda não seja bem estabelecida, é de 3–5 mg/kg/dia ou intermitentemente por 10 doses (dose total de 40 mg/kg), com muita hidratação. O paciente tem que ficar hospitalizado por longos períodos e o uso do medicamento é restrito às áreas hospitalares (WHO, 2007a).

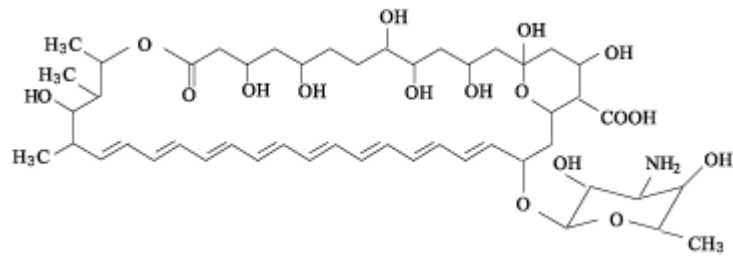


Figura 9: Estrutura molecular da anfotericina B (retirada da referência Rath *et al.*, 2003)

A resistência à anfotericina B em regiões isoladas não parece ser um problema, embora sejam encontrados casos de recidivas após o tratamento, principalmente em pacientes HIV-positivos. A resistência à anfotericina já foi induzida *in vitro* e parece estar associada à uma mudança na constituição e fluidez da membrana (Ouellette *et al.*, 2004).

A experiência clínica acumulada sobre o uso deste medicamento no tratamento da LV vem aumentando ao longo dos últimos anos. Foi demonstrado, por exemplo, que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia e com conseqüente diminuição de sua toxicidade (MS, 2006).

1.1.6.3. Pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática comercializada na forma de dois sais, o isotionato de pentamidina (Pentamidina®), disponível nos EUA, na Europa e no Brasil, e o mesilato de pentamidina, disponível apenas na Europa (Lomidine®) (De Paula *et al.*, 2003). Este medicamento é usado como segunda

linha no tratamento de pacientes refratários ou hipersensíveis aos antimoniais pentavalentes (Ouellette *et al.*, 2004).

A dose recomendada é de 4 mg/kg/dia por via intramuscular profunda, de 2 em 2 dias, não ultrapassando a dose total de 2g (MS, 2000). A pentamidina foi usada com sucesso em séries de 12 a 15 doses para o tratamento da LV. Após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessário administrar uma segunda série em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento (Rath *et al.*, 2003).

A alta toxicidade deste fármaco é um fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (Rath *et al.*, 2003). A diabetes mellitus foi observada em pacientes tratados com pentamidina no tratamento da LC e a incidência encontrada foi de 12% para os pacientes com LV na Índia. Devido aos seus efeitos adversos severos, a pentamidina só deve ser usada quando não há outras opções disponíveis (WHO, 2007a).

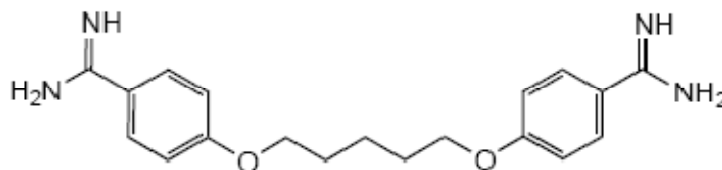


Figura 10: Estrutura molecular da pentamidina (retirada da referência Croft & Coombs, 2003).

O mecanismo de ação da pentamidina parece ser complexo e mal compreendido. Uma das vias sugeridas seria a inibição competitiva do influxo de poliaminas (Basselin *et al.*, 1996), mas logo em seguida foi demonstrado que esta inibição não seria competitiva, excluindo a utilização do mesmo sistema de transporte (Basselin *et al.*, 2000). Basselin *et al.* (2002) demonstraram que a pentamidina se acumulava rapidamente na mitocôndria de parasitos selvagens enquanto que, nos parasitos resistentes, o medicamento permanecia livre no citosol e era lançado para fora das células por bombas de efluxo.

Ela poderia também se ligar às regiões ricas em adenina e timina do kDNA, portanto, alterações na seqüência do kDNA poderiam prevenir a ligação deste medicamento, contribuindo para a resistência (Basselin *et al.*, 1998).

A resistência *in vitro* à pentamidina foi induzida em varias espécies de *Leishmania*, tanto em promastigotas como em amastigotas axênicos e o declínio da eficácia da pentamidina na Índia sugere que os parasitos estão se tornando resistentes (Ouellette *et al.*, 2004).

1.1.6.4. Miltefosina

Talvez o avanço mais significativo dos últimos tempos tenha sido o tratamento oral da LV com a miltefosina (Croft & Coombs, 2003) ou hexadecilfosfocolina (HePC), uma alquilfosfocolina que foi inicialmente usada

para o tratamento antitumoral, particularmente nas metástases de câncer de mama (Rakotomanga *et al.*, 2007). Sua atividade leishmanicida foi inicialmente descoberta em meados dos anos 80 e a subsequente demonstração de sua eficácia em diversos modelos experimentais a conduziu, em meados da década de 90, aos estudos clínicos e ao seu desenvolvimento para a leishmaniose pela parceria entre Asta Médica e WHO/TDR (Croft & Coombs, 2003).

A formulação oral é mais fácil de ser administrada, o que a torna uma ferramenta importante para reduzir as dificuldades socioeconômicas relacionadas ao tratamento que estão presentes em áreas onde a doença é endêmica (Fournet *et al.*, 1996).

Este derivado de alquilfosfolípídeo foi registrado na Índia em 2002, na Alemanha em 2004 (Friedrich, 2008) e na Colômbia em 2005 (Croft *et al.*, 2005). A dose administrada oralmente é de 2–3 mg/kg/dia (100 mg/dia para pacientes com peso inferior a 25 kg) por 28 dias. Doses diárias de 150 mg têm sido sugeridas por alguns especialistas para o tratamento de pacientes adultos HIV positivos (WHO, 2007a).

O custo do curso de tratamento é de US\$ 125–200 no setor privado, que trata 80% dos casos de LV na Índia; porém, o medicamento pode ser comprado pela OMS por um preço mais acessível (US\$ 60 a US\$ 75), dependendo do número de tabletes comprados (WHO, 2007a; Chappuis *et al.*, 2007).

Os principais efeitos colaterais são a toxicidade gastrointestinal e a teratogenicidade; por isso, a miltefosina é contra-indicada durante a gravidez e a lactação. Mulheres em idade fértil devem usar métodos de contracepção durante o tratamento e até três meses após o término do mesmo (Sundar, 2001; WHO, 2007a). O fármaco também pode aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, uréia e creatinina (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

No Programa Nacional de Calazar na Índia, o uso da miltefosina foi recomendado como primeira linha de tratamento em áreas com >10% de resistência aos antimoniais pentavalentes (Sundar, 2001).

O mecanismo de ação da miltefosina contra *Leishmania* ainda é bastante controverso (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que a miltefosina estimula as células T e os macrófagos a secretarem interferon gama (IFN γ) e aumentam a produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos (Palumbo, 2008).

Utilizando-se da combinação de técnicas específicas para a detecção de morte celular programada, Verma *et al.* (2004) e Paris *et al.* (2004) observaram indícios de que a miltefosina induz a apoptose em *L. donovani*.

Rakotomanga *et al.* (2007) mostraram uma correlação positiva entre o efeito da miltefosina no crescimento do parasito e na composição de

fosfolipídeos da membrana. O conteúdo de colesterol foi duas vezes maior em parasitos tratados com miltefosina do que em parasitos selvagens. A miltefosina interfere na permeabilidade e fluidez da membrana, na composição lipídica e no metabolismo dos fosfolipídeos (Palumbo, 2008).

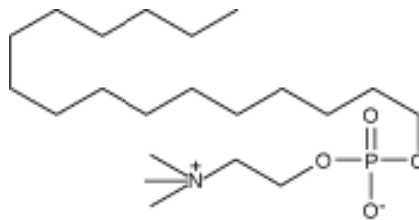


Figura 11: Estrutura molecular da miltefosina (hexadecilfosfocolina) (retirada do site <http://www.caymaneuropa.com/app/template/Product.vm/catalog/63280/a/z;jsessionid=70C9016F26C8626EC7205F4A48E39051>).

Ainda não há relatos de resistência medicamentosa à miltefosina na clínica (Ouellette *et al.*, 2004), mas sua meia-vida longa, de aproximadamente 150 h, poderia favorecer o desenvolvimento de resistência (Sundar, 2001), que já é induzida *in vitro* (Seifert *et al.*, 2003).

Entre os possíveis mecanismos de resistência estão a diminuição na captação do medicamento, alterações na permeabilidade da membrana plasmática, metabolização mais rápida do medicamento e efluxo do composto. Estudos dos mecanismos de resistência com cepas de *L. donovani* resistentes *in vitro* à miltefosina revelaram a correlação existente entre resistência e acúmulo reduzido do medicamento. Células que superexpressam P-glicoproteínas, transportadores ATP-binding cassette (ABC) envolvidos na resistência à

múltiplos medicamentos em células cancerígenas, foram resistentes à miltefosina. Para diminuir a possibilidade de emergência de cepas resistentes, seria apropriado utilizar a miltefosina em combinação com outros medicamentos (Ouellette *et al.*, 2004).

Um estudo feito por Soto *et al.* (2004), onde 38 pacientes da Guatemala com *L. braziliensis* e *L. mexicana* foram tratados com a miltefosina na dose de 2,5 mg/kg/dia por 28 dias apresentou uma baixa taxa de eficácia (53%). Entretanto, Soto *et al.* (2007a) realizaram um outro estudo com pacientes com leishmaniose mucosa infectados com *L. braziliensis* na Bolívia e mostraram que o mesmo esquema terapêutico com a miltefosina apresentou eficácia de 83% em pacientes com grau moderado da doença (afetando pele e mucosa nasais) e de 58% para os pacientes com a doença em estágio avançado (envolvendo o palato, a faringe e a laringe). A miltefosina foi segura e eficaz para o tratamento de leishmaniose mucosa e cutânea causada por *L. braziliensis* na Bolívia (Soto & Toledo, 2007b).

Um estudo clínico de fase IV na Índia obteve altas taxas de cura, com apenas três mortes entre 1.132 pacientes. Neste mesmo estudo, 3% dos pacientes apresentaram efeitos adversos graves, incluindo toxicidade gastrointestinal severa e aumento significativo dos níveis séricos de transaminases e creatinina (Bhattacharya *et al.*, 2007).

A miltefosina administrada um ou duas vezes por semana à camundongos deficientes em células T infectados com *L. donovani*, preveniu a recorrência da replicação visceral do parasito até 12 semanas após a infecção. Este resultado indicou que a miltefosina poderia ser usada no tratamento de pacientes com a co-infecção (Murray, 2000). Entretanto, este medicamento é menos eficaz que os antimoniais em pacientes co-infectados por HIV e *L. donovani* (WHO, 2007a).

A miltefosina também está sendo considerada no tratamento de leishmaniose canina, uma doença que até o presente não tem tratamento eficaz. Compostos similares como a formulação de oleil-fosfocolina mostrou ser eficaz em cães. O tratamento dos animais é benéfico também para reduzir os reservatórios do parasito (Croft & Coombs, 2003).

Há pouca informação disponível sobre sua farmacocinética em seres humanos. Em ratos, a miltefosina é rapidamente absorvida e se acumula em vários órgãos internos, como os rins, fígado, pulmões, baço e glândulas adrenais. Em administrações orais do medicamento na dose de 30 mg/kg duas vezes ao dia, as concentrações no tecido atingem 155 a 189 nmol/g. A miltefosina é lentamente metabolizada pelas fosfolipases para formar produtos como a colina e álcoois de cadeia longa que são metabólitos fisiológicos e podem ser reciclados nos fosfolipídeos (Palumbo, 2008).

1.1.6.5. Quimioterapias em desenvolvimento

1.1.6.5.1. Sitamaquina

A sitamaquina é uma 8-aminoquinoleína desenvolvida pela GlaxoSmithKline para ser uma alternativa no tratamento da LV como medicamento por via oral (Croft *et al.*, 2006).

Alguns ensaios clínicos foram finalizados com resultados variáveis. A sitamaquina não demonstra uma correlação linear entre a dose e as taxas de cura (Davies *et al.*, 2003). Um estudo de fase II com a sitamaquina no Brasil apresentou resultados desanimadores, dos 22 pacientes tratados com doses de 1,0 a 3,25 mg/kg/dia, as taxas de cura foram inferiores à 20 %; somente o grupo tratado com 2,0 mg/kg/dia obteve 67% de cura (Dietze *et al.*, 2001). No Quênia, as taxas foram superiores à 80% para os pacientes com LV tratados com doses entre 1,75 e 3,0 mg/kg/dia por 28 dias (Wasunna *et al.*, 2005). Na Índia, os percentuais de cura para os 120 pacientes diagnosticados com LV foram de 81%, 89%, 100% e 80% nas doses de 1.5, 1.75, 2.0 ou 2.5 mg/kg, respectivamente (Jha *et al.*, 2005). Outros estudos de fase II e III estão em andamento ou vêm sendo planejados na Índia (Chappuis *et al.*, 2007).

Alguns efeitos adversos foram observados, tais como, vômito, dispepsia, nefrotoxicidade e a metahemoglobinemia (Dietze *et al.*, 2001; Jha *et al.*, 2005; Wasunna *et al.*, 2005; Jha, 2006).

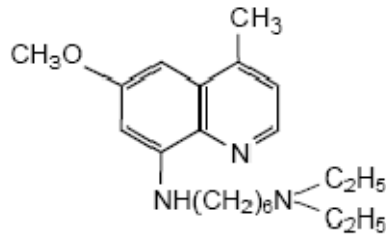


Figura 12: Estrutura molecular da sitamaquina (retirada da referência Croft & Coombs, 2003).

1.1.6.5.2. Paromomicina

O sulfato de paromomicina, ou aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo produzido pelo *Streptomyces rimosus* var. *paromomycinus* (Butler, 2005) usado no combate à *L. donovani* (WHO, 2007a).

O custo do tratamento é de US\$ 10–15. A vantagem da paromomicina intramuscular em relação aos outros medicamentos é a duração do tratamento de 21 dias comparada com 30 dias para a anfotericina B e 28 dias para a miltefosina (WHO, 2007a).

Um ensaio clínico de fase II foi realizado para testar vários esquemas terapêuticos com a paromomicina nas doses de 12, 16 ou 20 mg/kg/dia por 21 dias, comparada ao estibogluconato de sódio na dose de 20 mg/kg/dia por 28

dias em 120 pacientes com LV. Cento e oitenta dias após o fim do tratamento, os 3 esquemas terapêuticos com a paromomicina mostraram ser significativamente melhores que o grupo tratado com estibogluconato de sódio (Thakur *et al.*, 2000a).

O estudo de Jha *et al.* (1998) apresentou resultados similares com taxas finais de cura de 77%, 93% e 97% nos grupos tratados com 12, 16 e 20 mg/kg/dia durante 21 dias, comparadas com 63% dos pacientes do grupo que recebeu estibogluconato de sódio na dose de 20 mg/kg/dia por 28 dias.

Em outro estudo desenhado para verificar a segurança e a eficácia da terapia combinada da paromomicina com o estibogluconato de sódio, as taxas finais de cura foram superiores à 90% para os grupos tratados com a associação paromomicina e estibogluconato de sódio e de 53,1% para o grupo tratado apenas com estibogluconato de sódio (Thakur *et al.*, 2000b).

Em um grande ($n = 666$) ensaio comparativo de fase III na Índia, a paromomicina teve eficácia similar à anfotericina B com 94,6% de taxa de cura final com a administração de injeções intramusculares por 21 dias, comparada com 98,8 % para a anfotericina B por via intravenosa durante 21 dias. A eficácia e a segurança do medicamento são desconhecidas em pacientes co-infectados LV/HIV. A incidência de ototoxicidade é transiente e reversível (WHO, 2007a).

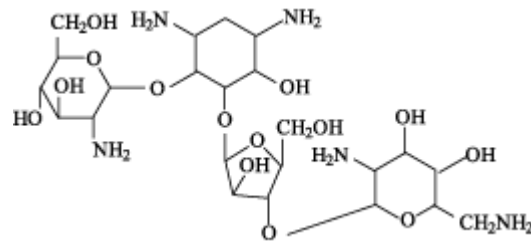


Figura 13: Estrutura molecular da paromomicina (retirada da referência Rath *et al.*, 2003)

Para o tratamento da LC, permanece a busca por formulações tópicas mais eficazes e menos irritantes que as formulações desenvolvidas originalmente, algumas estão sendo avaliadas em ensaios clínicos (Croft *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação da paromomicina parece envolver alterações na fluidez da membrana e no metabolismo de lipídeos e interferências na atividade mitocondrial (Ouellette *et al.*, 2004). Além disso, o medicamento inibe a síntese protéica através de ligação às proteínas ribossômicas, interferindo na leitura do mRNA (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

1.1.6.5.3. Imiquimod

O imiquimod é um composto para o uso tópico que estimula a resposta imune no local da aplicação. Este medicamento é um potente indutor de citocinas em células mononucleares humanas. *In vitro*, o imiquimod ativa a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos, matando os amastigotas intracelulares de *Leishmania*. A administração de imiquimod em associação ao

antimoniato de meglumina foi eficaz no tratamento da LC em pacientes refratários ao tratamento apenas com o antimoniato de meglumina (Arevalo *et al.*, 2001).

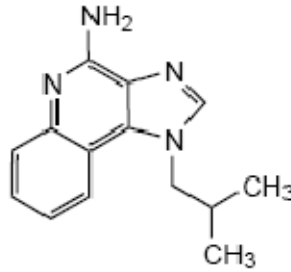


Figura 14: Estrutura molecular do imiquimod (retirada da referência Croft & Coombs, 2003).

O estudo de Miranda-Verastegui *et al.* (2006) mostrou que a terapia combinada do imiquimod com um antimonial apresenta vantagens sobre a monoterapia com antimonial no tratamento de LC refratária, pois acelera o processo de cura e melhora a qualidade na cicatrização das lesões.

1.1.6.6. Terapias combinadas

A terapia combinada com dois ou mais medicamentos com diferentes mecanismos de ação é o tratamento padrão para a tuberculose e para o SIDA (Sibley & Hunt, 2003). A combinação de medicamentos para a LV pode ser vantajosa em termos de proteção contra o desenvolvimento da resistência, bem como uma redução na duração do tratamento e na toxicidade (Hailu *et al.*, 2005).

O custo elevado e a complexidade operacional para se utilizar mais de um medicamento são fatores constantemente citados como razão pra manter a monoterapia nas doenças parasitárias, porém este argumento ignora os custos reais em morbidade e mortalidade provocados pelo tratamento ineficaz (WHO, 2007a).

As dificuldades para se desenvolver um único medicamento para todas as formas de leishmaniose envolvem alguns fatores, entre os quais: os sítios de infecção da LT e da LV requerem medicamentos com diferentes perfis farmacocinéticos e a variação intrínseca na sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos medicamentos. Outros problemas enfrentados pelos novos tratamentos para a leishmaniose são, a necessidade por medicamentos ativos no Estado de Bihar na Índia, onde há resistência aos antimoniais pentavalentes, e o aumento da eficácia em pacientes imunocomprometidos, em particular os co-infectados com HIV (Croft *et al.*, 2006). Porém, é provável que mesmo as terapias combinadas não consigam prevenir todos os casos de recidiva (WHO, 2007a).

1.1.6.7. Produtos naturais

Para uma grande parte da população que habita em zonas endêmicas distantes, o uso de medicamentos tradicionais é a única forma de tratamento para as doenças parasitárias (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001; Fournet *et*

al., 2002). Na medicina tradicional, o tratamento da leishmaniose normalmente consiste na administração oral de chás de plantas para as formas sistêmicas da doença e nas preparações tópicas de extratos de plantas para o tratamento das lesões na pele (Chan–Bacab & Peña–Rodríguez, 2001). Assim, muitos pesquisadores têm buscado novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose na natureza, uma fonte importante de moléculas usadas no tratamento de diversas doenças (Santos *et al.*, 2008). O grande interesse pelas plantas medicinais está relacionado ao isolamento de princípios ativos (Balunas & Kinghorn, 2005), principalmente pelo método bioguiado (Chin, 2006).

Os produtos naturais são estruturas químicas privilegiadas, selecionadas na natureza por pressões exercidas no processo evolutivo. Estes produtos interagem como uma grande variedade de proteínas ou outros alvos moleculares com propósitos específicos. Suas estruturas apresentam grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as tornam favoráveis como compostos líderes para a pesquisa de medicamentos, e que as diferenciam das bibliotecas de compostos sintéticos ou combinatoriais (Koehn & Carter, 2005).

Em algumas áreas terapêuticas como a oncologia, os produtos naturais têm um papel central na descoberta de compostos líderes (Butler, 2005). A maioria das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários de plantas e de seus derivados têm sido direcionadas ao combate do câncer. De todos os

medicamentos anticancerígenos disponíveis entre 1940 e 2002, 40% foram produtos naturais ou seus derivados (Balunas & Kinghorn, 2005). O paclitaxel, um medicamento anticancerígeno derivado de *Taxus brevifolia*, vendeu US\$1,6 bilhões em 2000. As vendas de agentes quimioterapêuticos anticancerígenos derivados de plantas foram responsáveis por aproximadamente um terço das vendas de anticancerígenos no mundo – correspondendo à cerca de US\$ 3 bilhões em 2002 (Chin, 2006).

Entre os medicamentos derivados de compostos medicinais cita-se o arteeter, um agente antimalárico desenvolvido a partir da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) (Balunas & Kinghorn, 2005; Chin, 2006). Outro composto, o tiotrópio, foi aprovado para o tratamento de broncoespasmo associado à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Este composto, derivado da atropina de *Atropa belladonna* (Solanaceae), é um potente inibidor reversível não-seletivo dos receptores muscarínicos (Balunas & Kinghorn, 2005). A apomorfina, um derivado da morfina isolada de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) atua como agonista de curta ação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 e é usada no tratamento de doença de Parkinson (Chin, 2006).

Outros exemplos de substâncias derivadas de plantas são a galantamina e a calanolida A. A galantamina (Reminyl®) foi descoberta através do método etnomedicinal e isolada de *Galanthus woronowii* Losinsk (Amaryllidaceae) na

Rússia, no início dos anos 50. Esta molécula se liga ao receptor nicotínico de acetilcolina e inibe a acetilcolinesterase, retardando o processo de degeneração neurológica. A galantamina foi aprovada para o tratamento de Alzheimer (Balunas & Kinghorn, 2005).

A calanolida A é uma dipiranocumarina isolada de *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* (Whitmore) P.F. Stevens (Clusiaceae), uma árvore da floresta da Malásia. A calanolida A é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa do HIV tipo 1, que também é eficaz em cepas resistentes à zidovudina (Balunas & Kinghorn, 2005).

De 1983 a 1994, cerca de 40% dos novos medicamentos aprovados na América do Norte eram derivados de compostos naturais e aproximadamente 70% das novas entidades químicas relatadas entre 1981 e o início de 2006 resultaram de estudos com produtos naturais (Liu & Wang, 2008). A maioria destes medicamentos é utilizada para o tratamento de câncer e doenças infecciosas (Newman *et al.*, 2003).

Além disso, os medicamentos oriundos de produtos naturais ou derivados de produtos naturais corresponderam à 40%, 24% e 26%, respectivamente, dos 35 medicamentos mais vendidos no mundo nos anos de 2000, 2001 e 2002 (Butler, 2004).

Outro panorama pode ser obtido pela análise do número de patentes lançadas nos últimos anos. Kohen & Carter (2005) avaliaram as patentes de produtos naturais originais geradas entre 1984 e 2003. Os autores observaram um período de aumento no número de patentes criadas até o início da década de 90, seguido por um período de declínio até meados do ano 2000, quando o número de patentes voltou a aumentar.

O período de declínio parece estar envolvido com o surgimento de novas técnicas de descoberta de compostos-líderes como o desenho racional de fármacos e a química combinatorial (Balunas & Kinghorn, 2005). Durante este período, muitas companhias farmacêuticas pararam ou diminuíram sua pesquisa com produtos naturais (Butler, 2005) em favor da síntese de grandes livrarias de compostos (Kayser *et al.*, 2003). Entretanto, apesar da promessa destes novos métodos de busca, há uma pequena quantidade de compostos líderes em desenvolvimento clínico (Butler, 2005).

Apesar do aparecimento dos novos métodos de busca por medicamentos, os produtos naturais permanecem sendo uma fonte importante de novas entidades químicas e novos compostos líderes (Butler, 2004; Balunas & Kinghorn, 2005). Mas este interesse só poderá ser mantido se a pesquisa por produtos naturais prosseguir sendo competitiva com outras técnicas usadas na descoberta de novas moléculas (Butler, 2005).

Muitos produtos naturais têm revelado seu potencial antiparasitário em ensaios *in vitro* e representam estruturas líderes interessantes para o desenvolvimento de novos medicamentos para as doenças parasitárias (Kayser *et al.*, 2003). A Tabela 1 mostra o resultado de testes *in vitro* com algumas substâncias isoladas de plantas que vêm sendo estudadas para leishmaniose.

Tabela 1: Substâncias isoladas de plantas com atividade leishmanicida *in vitro*.

Espécie	Substância	Parasito	CI ₅₀	Referência
<i>Croton cajucara</i>	linalol	<i>L. amazonensis</i> (P)	4,3 ng/mL	Rosa <i>et al.</i> , 2003
		<i>L. amazonensis</i> (A)	15,5 ng/mL	
<i>Peschiera australis</i>	coronaridina	<i>L. amazonensis</i> (A)	12 µg/mL	Delorenzi <i>et al.</i> , 2001
<i>Maesa balansae</i>	maesabalida III	<i>L. amazonensis</i> (A)	7 ng/MI	Germonprez <i>et al.</i> , 2005
	maesabalida IV		14 ng/mL	
<i>Laetia procera</i>	casearlucina A	<i>L. amazonensis</i> (P)	11,1 µg/mL	Jullian <i>et al.</i> , 2005
		<i>L. amazonensis</i> (A)	5,98 µg/mL	
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	saponina	<i>L. major</i> (P)	0,3 µg/mL	Fuchino <i>et al.</i> , 2008
	tipo furostano	<i>L. guyanensis</i> (P)	5,5 µg/mL	
		<i>L. panamensis</i> (P)	8,0 µg/mL	
<i>Cistus monspeliensis</i>	diterpeno <i>cis</i> -clerodano*	<i>L. donovani</i> (P)	3,3 µg/mL	Fokialakis <i>et al.</i> , 2006
<i>Tanacetum parthenium</i>	partenolido	<i>L. amazonensis</i> (P)	0,37 µg/mL	Tiuman <i>et al.</i> , 2005
<i>Gonocytisus angulatus</i>	luteolina	<i>L. donovani</i> (A)	0,8 µg/mL	Tasdemir <i>et al.</i> , 2006

P = promastigotas

A = amastigotas

*18-acetoxi-*cis*-clerod-3-en-15-ol

Além dos resultados já obtidos com estas substâncias isoladas de plantas medicinais, inúmeros extratos com potencial leishmanicida vêm sendo estudados (Weniger *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Billo *et al.*, 2005; De

Mesquita *et al.*, 2005; Khalid *et al.*, 2005; Desrivot *et al.*, 2007d; Estevez *et al.*, 2007; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2008; Patricio *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008) e poderão gerar novos compostos líderes.

Devido ao limitado interesse comercial para desenvolver medicamentos para as doenças tropicais (Fournet *et al.*, 1994) e aos problemas associados ao manuseio dos medicamentos comumente disponíveis para o tratamento da leishmaniose (Hailu *et al.*, 2005), há uma urgência pela busca de tratamentos alternativos e baratos para administração oral em ciclos mais curtos de tratamento e pela identificação dos mecanismos que facilitem o acesso às medidas de controle já existentes, incluindo a reforma do setor de saúde em alguns países em desenvolvimento (Watkins, 2003; WHO, 2007b).

1.2. QUINOLEÍNAS COM ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

1.2.1. A descoberta das quinoleínas

A partir de um estudo realizado no Departamento de Beni em área Amazônica sobre terapias vegetais tradicionalmente usadas na Bolívia para o tratamento de afecções parasitárias, o Dr. Alain Fournet encontrou um arbusto denominado *Galipea longiflora* cujo pó da casca é utilizado em cataplasmas pelos índios Chimanos no tratamento das lesões da LC. Assim, o grupo de

pesquisa do Dr. Alain Fournet achou interessante estudar a composição químico-biológica desta planta (Fournet *et al.*, 1989; Desrivot, 2007e).

O gênero *Galipea* Aubl. compreende mais de 20 espécies, todas localizadas na América do Sul (Fournet *et al.*, 1989). *Galipea longiflora* Krause (Krause 1914) – Rutaceae – é um grande arbusto (Figura 15) de 10 a 15 metros de altura que apresenta longas folhas trifoliadas e está localizado na floresta Amazônica no nordeste da Bolívia (Figura 16) (Desrivot, 2007e; Fournet *et al.*; 1989).



Figura 15: *Galipea longiflora* Krause (fotografia cedida pelo Prof. Dr. Alain Fournet – Institut de Recherche pour le Développement / IRD)

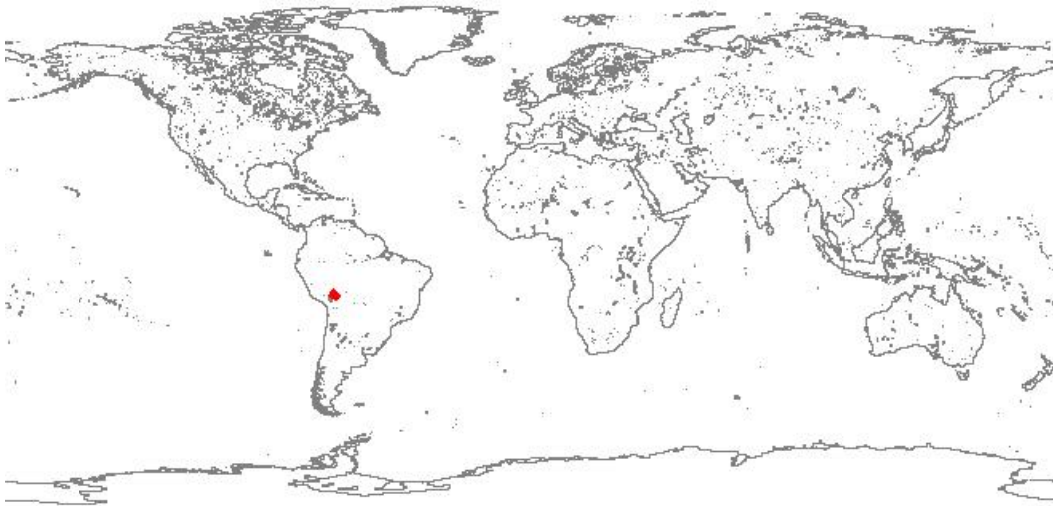


Figura 16: Mapa da localização da espécie *Galipea longiflora* Krause (retirado do site <http://www.gbif.org/>)

As purificações bioguiadas a partir da casca do caule, da casca da raiz e das folhas do arbusto conduziram ao isolamento de uma nova família de alcalóides, as quinoleínas substituídas sobre o carbono da posição 2 (Figura 17) (Duret *et al.*, 2003; Desrivot, 2007e).

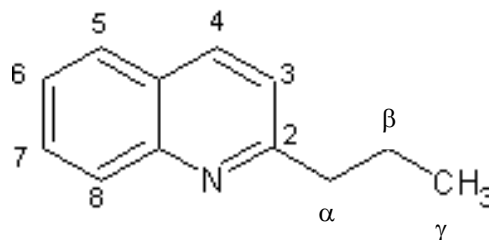


Figura 17: Anel quinoléico com as posições indicadas

Quatro destas substâncias eram inéditas e foram chamadas chimaninas A, B, C e D em homenagem aos índios Chimanos. Dos doze alcalóides testados em camundongos infectados por *L. amazonensis* ou *L. venezuelensis*, a 2-n-propilquinoleína e as chimaninas B e D se revelaram tão ou mais ativas que o medicamento de referência, o Glucantime®. Estes resultados interessantes foram patenteados pelo Institut de Recherche pour le Développement (IRD) juntamente com os colaboradores bolivianos (Fournet *et al.*, 1991; http://www.mpl.ird.fr/suds-en-ligne/fr/plantes/pdf/1G_chiman.pdf). No ano seguinte, a patente internacional foi publicada (Fournet *et al.*, 1992).

1.2.2. Farmacomodulação e relação estrutura-atividade

Os estudos de farmacomodulação foram realizados para identificar as funções químicas responsável pela atividade das quinoleínas e estabelecer uma relação estrutura-atividade (Desrivot, 2007e).

Em 1994, foram sintetizadas as quinoleínas substituídas no carbono de posição 2 com um trans-epóxido na posição α - β (Munos *et al.*, 1994). Depois, outra série de quinoleínas substituídas na posição 2 foi sintetizada, algumas das quinoleínas continham radicais com dupla ligação no segundo carbono (Fakhfakh *et al.*, 2001a; Fakhfakh *et al.*, 2001b; Fakhfakh *et al.*, 2003; Duret *et al.*, 2003).

Alguns critérios foram observados, por exemplo, o comprimento ideal da cadeia para se obter a máxima atividade antileishmania não deve exceder cinco carbonos. As quinoleínas mais ativas são aquelas que apresentam uma cadeia de três carbonos ligada na posição 2. A estrutura não-saturada na cadeia favorece as reações químicas com alvos pontuais (Nakayama *et al.*, 2005). E as funções eletrofílicas reativas como a carbonila e hidroxila ou um halogenado aumentam a atividade (Fakhfakh *et al.*, 2003).

O comprimento da cadeia carbônica também é importante para a manutenção da ação de 4-aminoquinoleínas análogas da cloroquina sobre cepas resistentes de *P. falciparum* (Ridley *et al.*, 1996).

A presença de quinoleínas substituídas na posição 2 não é muito freqüente na natureza. Estes derivados parecem ser uma característica quimiotaxonômica da família Rutaceae e, em particular, do gênero *Galipea* (Fournet *et al.*, 1993b).

1.2.3. Quinoleínas selecionadas

Três quinoleínas substituídas na posição 2 foram selecionadas para este estudo (Figura 18).

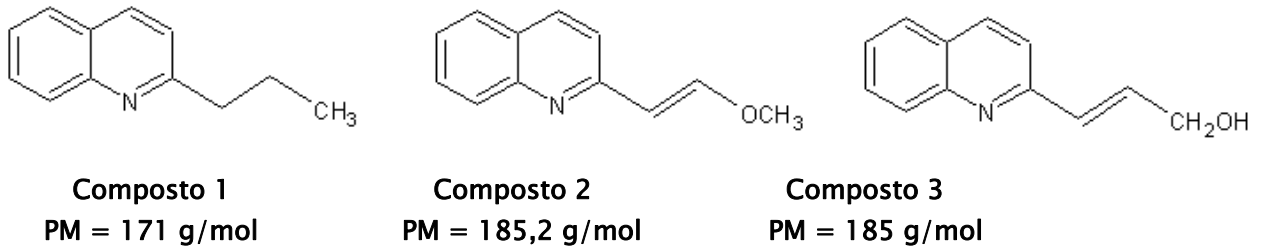


Figure 18: Quinoleínas substituídas na posição 2: 2-n-propilquinoleína (composto 1), 2-(2-metoxietenil) quinoleína (composto 2) e 2-(2-hidroxiprop-2-enil) quinoleína (composto 3).

1.2.4. Estudos com a 2-n-propilquinoleína (composto 1)

No estudo *in vitro* de Fournet *et al.* (1993b), o composto 1 apresentou um valor de IC₉₀ de 50 µg/mL sobre *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Em Fournet *et al.* (1993a), o composto 1 administrado na dose de 100 mg/kg/dia foi mais ativo que o antimoniato de n-metilglucamina subcutâneo na dose de 56 mg/kg/dia em camundongos infectados com *L. amazonensis* PH8; e foi tão ativo quanto o medicamento de referência no tratamento da infecção por *L. venezuelensis*. Camundongos Balb/c infectados com *L. venezuelensis* que não foram tratados apresentaram múltiplos nódulos cutâneos nas orelhas.

Fournet *et al.* (1994) estudaram a ação *in vivo* do composto 1 nas vias intraperitoneal, subcutânea e oral. A injeção intraperitoneal na dose de 0,70 mmol/kg/dia (119 mg/kg/dia) aplicada durante 5 dias reduziu a carga parasitária do fígado em 97,2% ao passo que o Glucantime® (0,54 mmol/kg/dia,

66 mg/kg/dia) apresentou uma taxa de redução de 62,4%. A administração subcutânea mostrou que o Glucantime® foi mais eficaz que o composto 1 nas mesmas doses (0,54 mmol/kg/dia, 66 mg/kg/dia), com uma diminuição da parasitemia do fígado igual a 89,9% para o Glucantime® e 76,3% para o composto 1 no tratamento de 5 dias ou de 97,4% para o Glucantime® e 67,8% para o composto 1 no tratamento de 10 dias. Já a administração por via oral do composto 1 (0,54 mmol/kg/dia, 92 mg/kg/dia) demonstrou uma taxa de redução da carga parasitária hepática comparável à do Glucantime® subcutâneo (0,54 mmol/kg/dia, 66 mg/kg/dia). As taxas encontradas foram de 87,8% para o composto 1 e 89,7% para o Glucantime® no tratamento de 5 dias ou de 99,9% para o composto 1 e 97,4% para o Glucantime® no tratamento de 10 dias.

Em outro experimento, o composto 1 foi administrado por via oral ou intralesional e o antimoniato de n-metilglucamina foi administrado pela via subcutânea ou intralesional à camundongos infectados com *L. amazonensis*. O medicamento de referência produziu uma redução significativa no número de parasitos na lesão: cerca de 88% (subcutâneo) e 96% (intralesional) enquanto o tratamento com o composto 1 diminui a carga parasitária na lesão em 77% (por via oral) e 81% (intralesional) (Fournet *et al.*, 1996).

Em Nakayama *et al.* (2005), o composto 1 foi administrado por via oral nas doses de 12,5 e 25 mg/kg durante 10 dias à camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* e houve uma diminuição na carga parasitária do

fígado de 66 % e 65%, respectivamente. A miltefosina foi administrada ao grupo controle e apresentou uma redução na carga parasitária do fígado de 72% (Nakayama *et al.*, 2005).

O efeito não dose-dependente observado no estudo acima também foi observado com outra quinoleína substituída na posição 2, como a nitril quinoleína, em um modelo de LV com *L. donovani* (Nakayama *et al.*, 2007).

O composto 1 também foi testado sobre células HUT-2 infectadas pelo vírus T-linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1) mas não apresentou nenhum efeito antiproliferativo na dose de 10 μ M (Fournet *et al.*, 2003). Este composto também não demonstrou uma atividade importante sobre o vírus HIV-1, CI_{50} de 78 μ M (Fakhfakh *et al.*, 2003).

A ação deste composto também foi observada em camundongos BALB/c infectados com *Plasmodium vinckei petteri* tratados com uma dose oral de 50 mg/kg. Os autores observaram o número de animais que sobreviveram em cada grupo após 14 dias de tratamento. Os resultados mostraram que, no grupo tratado com o composto 1, 60% (3/5) dos animais sobreviveram enquanto que, no grupo tratado com a cloroquina à 5,8 mg/kg, 100% dos animais sobreviveram (Gantier *et al.*, 1996).

O composto 1 mostrou um efeito inibidor dose-dependente na atividade de efluxo da P-glicoproteína (P-gp) em segmentos de intestino de ratos e na linhagem celular intestinal Caco-2. As P-gp estão envolvidas no desenvolvimento de resistência dos parasitos, então, a administração oral do composto 1 em terapias combinadas poderia reverter a resistência medicamentosa ou ainda reduzir a duração do tratamento (Belliard *et al.*, 2003b).

1.2.5. Estudos com a 2-(2metoxietenil)quinoleína (composto 2)

No modelo experimental de LV por *L. infantum* de Nakayama *et al.* (2005), o composto 2 administrado na dose de 25 mg/kg por via oral durante 10 dias reduziu a carga parasitária no fígado em 69 % e no baço em 57 %, enquanto o Glucantime® administrado pela via subcutânea na dose 28 mg/kg diminui a carga parasitária do fígado em 65% e do baço em apenas 5,7 %.

O composto 2 mostrou atividade nematocida similar ao albendazol à 100 µM inibindo a secreção e excreção de fosfatase ácida e acetilcolinesterase em adultos de *Heligmosomoides polygyrus* (87,4 vs 82,3 % para acetilcolinesterase e 30,2 % para ambos para fosfatase ácida) (Martínez-Grueiro *et al.*, 2005).

1.2.6. Estudos com a (E)-3-(quinoleína-2-il)prop-2-em-1-ol (composto 3)

Fakhfakh *et al.* (2003), sintetizou o composto 3 e testou-o *in vitro* sobre diversas células:

citotoxicidade sobre macrófagos	CI ₅₀ (µM)			
	<i>L. amazonensis</i> amastigotas	<i>L. infantum</i> amastigotas	<i>T. brucei</i> trypomastigotas	<i>T. cruzi</i> amastigotas
34	4	2	>32	4

Além disso, o composto demonstrou ter atividade antiviral, impedindo a replicação do HIV-1 em células CEM4fx com CI₅₀ de 3,6 µM (Fakhfakh *et al.*; 2003).

Em Desrivot *et al.* (2007c), o composto 3 foi testado *in vitro* e apresentou CI₅₀ de 2,4 e 4,1 µM sobre promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente.

Em Nakayama *et al.* (2005), o composto 3 foi testado em modelos experimentais de LC e LV. No modelo de LC, camundongos infectados com *L. amazonensis* foram tratados com 25 mg/kg do composto 3 por via oral durante 15 dias ou com Glucantime® na dose de 28 mg/kg por via subcutânea. O composto 3 não foi tão ativo quanto o medicamento de referência e reduziu a carga parasitária na lesão da pata em 54% comparado com 98% do Glucantime®.

No modelo de LV por *L. infantum*, o composto 3 foi administrado na mesma dose (25 mg/kg) durante 10 dias e causou uma diminuição da carga parasitária do fígado igual a 83% e do baço em 51%. O medicamento de referência apresentou reduções de 65% no fígado e 5,7% no baço. Em outro modelo de LV com *L. donovani*, o composto 3 foi administrado nas doses de 12,5 e 25 mg/kg por via oral por 10 dias e a miltefosina foi usada como medicamento de referência na dose de 7,5 mg/kg. As reduções nas cargas parasitárias no fígado foram de 59% (12,5 mg/kg), 61% (25 mg/kg) e 72% (miltefosina) (Nakayama *et al.*, 2005).

Quando testado *in vitro* sobre *Trichomonas vaginalis*, à 100 µM este composto reduziu em 99,7% o crescimento do protozoário após 24 h de incubação (Martínez-Grueiro *et al.*, 2005).

O composto 3 também foi testado sobre células HUT-2 infectadas pelo vírus T-linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1) mas não apresentou nenhum efeito antiproliferativo na dose de 10 µM (Fournet *et al.*, 2003).

1.2.7. Estudos de biodisponibilidade com os compostos 1 e 3

Alguns estudos de biodisponibilidade foram realizados com o composto 1. Nos estudos *in vitro*, foram identificados três metabólitos majoritários, além de alguns citocromos envolvidos no metabolismo (Belliard *et al.*, 2003a). Os

metabólitos foram metabolizados por microsomas de fígado humano (MFH) e identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Foram identificados os compostos α -hidroxilado (composto 4) e γ -hidroxilado (composto 6), bem como, um composto bis-hidroxilado no anel quinoléico. Utilizando como referência o estudo de Reigh *et al.* (1996), os grupos hidroxila deste último composto devem estar localizados nos carbonos 5 e 6. Este estudo identificou as isoformas dos citocromos envolvidos no metabolismo das quinoleínas em microsomas de ratos e humanos. Os autores mostraram que os citocromos 2A6 e 2E1 são os principais responsáveis na formação dos metabólitos em humanos. No estudo *in vivo*, o composto 1 foi administrado por via oral à camundongos na dose 0,54 mmol/kg. A meia-vida encontrada foi de 100 minutos. (Iglarz *et al.*, 1998).

Desrivot *et al.* (2007c) determinaram a estrutura dos metabólitos de fase I e II produzidos pela incubação *in vitro* dos compostos 1 e 3 com microsomas hepáticos humanos e de ratos ou com hepatócitos de ratos. Os autores também realizaram um estudo preliminar de biodisponibilidade plasmática com o composto 3 após administração oral ou endovenosa. No ensaio, não foi possível detectar o composto 3 nos tempos de 30 min e 1 h após a administração oral, nem 5 min após administração intravenosa, sugerindo uma meia-vida curta para o composto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as quinoleínas substituídas na posição 2 com atividade leishmanicida a fim de selecionar o composto mais promissor para o desenvolvimento clínico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar estudo de estabilidade química dos compostos 1, 2 e 3.
2. Avaliar a ação *in vitro* dos compostos 1, 2 e 3 sobre cepas selvagens e resistentes de *Leishmania donovani*.
3. Avaliar a interação *in vitro* do composto 1 com os medicamentos de referência e com os compostos 2 e 3 sobre formas promastigotas de *Leishmania donovani*
4. Avaliar a toxicidade aguda dos compostos 1 e 2
5. Sintetizar e caracterizar a formulação de um sal cristalino com os compostos 1 e 2
6. Realizar o estudo farmacocinético com o composto selecionado

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AÇÃO *IN VITRO* DAS QUINOLEÍNAS SOBRE *LEISHMANIA DONOVANI*

3.1.5. Substâncias

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi cedida pelo Laboratório Zentaris (Frankfurt, Alemanha). A sitamaquina foi cedida pelo Laboratório GSK (Londres, UK). A anfotericina B foi cedida pelo Laboratório Bristols Myers Squibb. Os compostos 1 (2-n-propilquinoleína), 2 (2-(2-metoxietenil)quinoleína) e 3 (2-(2-hidroxi-prop-2-enil)quinoleína) foram sintetizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia de Châtenay-Malabry / França (Anexo 1). Os compostos foram submetidos à ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 e à espectrometria de massa.

3.1.6. Parasitos

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania donovani* selvagens denominadas LV9 WT (MHOM/ET/67/HU3) e DD8 WT (MHOM/IN/80/DD8) e formas promastigotas resistentes à miltefosina (HePC-R) e à sitamaquina (Sita-160-R). A cepa LV9 WT foi isolada de um paciente com LV da Etiópia e a cepa DD8 WT foi isolada de um paciente com LV da Índia. A linhagem selvagem LV9 WT foi submetida à pressão medicamentosa em doses crescentes de miltefosina

ou sitamaquina para obtenção das cepas HePC-R, cedida pelo Prof. S. Croft do LSTMH, Londres, UK e Sita-160-R (Bories et al., 2008), respectivamente.

3.1.7. Cultura de formas promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania donovani* foram mantidas em meio de cultura M199 suplementado com 40 mM de HEPES, 100 μ M de adenosina, 0,5 mg/L de hemina, 10% de soro fetal bovino inativado e 50 μ g/mL de gentamicina à 26 °C e 5% de CO₂.

3.1.8. Ensaio *in vitro*

Inicialmente, 500 μ L de uma solução-mãe de cada composto foram preparados em DMSO nas concentrações de 96 mM para o composto 1 e 24 mM para os compostos 2 e 3. Então, estas soluções foram diluídas misturando-se 250 μ L das mesmas à 500 μ L de água estéril.

Em todos os poços de uma placa de cultura celular de 96 escavações foram adicionados 195 μ L de meio de cultura M199, suplementado com 40 mM de HEPES, 100 μ M de adenosina, 0,5 mg/L de hemina, 10% de soro fetal bovino inativado e 50 μ g/mL de gentamicina, na primeira coluna e 100 μ L nos demais poços. Em seguida, 5 μ L da solução-mãe diluída foram adicionados nos primeiros poços e foi realizada uma diluição seriada até a penúltima coluna.

Depois, 100 μL de uma suspensão de 2×10^5 formas promastigotas dos parasitos foram adicionados em todos os poços. A placa foi incubada por 72 h à 26 °C e 5% CO_2 . As placas foram observadas em microscópio invertido. Então, 10 μl de uma solução do sal de tetrazolium (MTT) de 5 mg/mL foram adicionados a todos os poços e a placa foi incubada por 4 h à 26 °C e 5% CO_2 protegida da luz. Depois deste período, 100 μL da solução de lise constituída por 400 mL de água destilada, 16 mL de HCl 1 M e 100 mL de Triton-X-100 foram adicionados a todos os poços para liberação dos cristais de formazan. A leitura da placa foi feita em leitor de placa de Elisa à 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e foram repetidos 3 vezes. A CI_{50} foi determinada através de equações de gráficos do programa Excel[®]. A miltefosina, a sitamaquina e a anfotericina B foram usadas como controles positivos. Os controles negativos foram o DMSO e a suspensão de parasitos.

3.2. INTERAÇÃO *IN VITRO* DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA DONOVANI* (Odds *et al.*, 2003)

Definir a CI_{50} de cada molécula isolada: CI_{50}^A e CI_{50}^B



Calcular a concentração máxima para cada molécula:

$$\text{Concentração máxima de A} = 4 \times CI_{50}^A$$

$$\text{Concentração máxima de B} = 4 \times CI_{50}^B$$



Calcular o valor da parte (P) para cada molécula:

$$P_A = 4 \times CI_{50}^A / 5$$

$$P_B = 4 \times CI_{50}^B / 5$$



Preparar 4 mL da solução-mãe de A (SM_A) e 4 mL da solução-mãe de B (SM_B)

$$SM_A = 80 \times 5P_A$$

$$SM_B = 80 \times 5P_B$$



Preparar as soluções:

	A		B	Soluções
Molécula A sozinha	5 x P _A	+	0	1 mL SM _A
Associação 1	4 x P _A	+	1 x P _B	0,8 mL SM _A + 0,2 mL SM _B
Associação 2	3 x P _A	+	2 x P _B	0,6 mL SM _A + 0,4 mL SM _B
Associação 3	2 x P _A	+	3 x P _B	0,4 mL SM _A + 0,6 mL SM _B
Associação 4	1 x P _A	+	4 x P _B	0,2 mL SM _A + 0,8 mL SM _B
Molécula B sozinha	0	+	5 x P _B	1 mL SM _B



Preparar a placa de 96 poços:

- Colocar 195 µL do meio de cultura na primeira linha e 100 µL de meio de cultura nas demais linhas
- Colocar 5 µL de cada uma das soluções (molécula A sozinha, associações 1 a 4 e molécula B sozinha) na primeira linha da placa como indicado abaixo
- Fazer 6 diluições seriadas de linha em linha (diluições de razão 2)
- Finalizar a diluição seriada na penúltima linha (D/64); a última linha é usada como controle
- Adicionar 100 µL da suspensão de promastigotas de *Leishmania donovani* na concentração de 2×10^6 / mL

Repartição na placa de 96 poços (duplicata):

	A sozinha		Assoc. 1		Assoc. 2		Assoc. 3		Assoc. 4		B sozinha	
D												
D/2												
D/4												
D/8												
D/16												
D/32												
D/64												
Controle												



Incubar a placa na estufa de CO₂ à 26°C por 72 h



Adicionar 10 µL de uma solução de MTT de 5 mg/mL em todos os poços

Incubar a placa na estufa de CO₂ à 26°C por 4 h



Adicionar 100 µL da solução de lise (400 mL de água destilada, 16 mL de HCl

1 M e 100 mL de Triton-X-100) para liberação dos cristais de formazan



Ler a placa à 570 nm no espectrofotômetro



Definir a CI₅₀ de cada molécula para cada uma das associações

Exemplo: CI₅₀^A na associação 1 e CI₅₀^B na associação 1



Calcular a concentração inibitória fracional (FIC)

$$FIC^1_A = CI_{50}^A (\text{associação 1}) / CI_{50}^A (\text{molécula sozinha})$$

$$FIC^1_B = CI_{50}^B (\text{associação 1}) / CI_{50}^B (\text{molécula sozinha})$$



Calcular Σ FIC para cada associação

$$\Sigma FIC^1 = FIC^1_A + FIC^1_B$$



Calcular o índice de concentração inibitória fracional (FICI) que corresponde à

$$[\Sigma FIC^1 + \Sigma FIC^2 + \Sigma FIC^3 + \Sigma FIC^4] / 4$$

Se $FICI < 0,5 \rightarrow$ sinergia

Se $0,5 < FICI < 4 \rightarrow$ efeito aditivo simples

Se $FICI > 4 \rightarrow$ antagonismo

Os experimentos foram realizados 3 vezes.

3.3. ESTABILIDADE QUÍMICA

3.3.3. Preparo e armazenamento das soluções

As quinoleínas foram dissolvidas em uma concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ em cinco diferentes soluções: metanol, PBS pH 7, DMSO, solução de ácido canfosulfônico pH 2 ou uma mistura de carboximetilcelulose 0,5% em glicose à

5% e tween 80 à 0,5% (CMC / Tween 80). Cada preparação foi dividida em 3 partes que foram armazenadas em condições diferentes de temperatura e luminosidade: no refrigerador à 4°C, em temperatura ambiente sob influência da luz ou em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todos os dias, no mesmo horário, as amostras eram diluídas em fase móvel (1:20) e injetadas imediatamente no HPLC. O estudo teve a duração de 9 dias.

3.3.4. Condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema Waters de cromatografia líquida consistindo em uma bomba modelo 600 com um degaseificador em linha, um injetor automático modelo 717 e um detector de arranjo de fotodiodo modelo 996. O monitoramento do sistema e a aquisição dos dados foram realizados pelo programa Empower® software (Waters, France).

A coluna utilizada foi uma Symmetry Shield RP18 3,5 µm 4,6 x 150 mm. A fase móvel isocrática consistiu na mistura de tampão acetato 10⁻² M pH 4,0 e metanol (40:60, v/v). O fluxo foi de 1 mL/min e a temperatura de 40 °C. Os espectros de absorção em UV foram lidos à 233 nm para o composto 1, 266 nm para o composto 2 e 249 nm para o composto 3. O volume de injeção foi de 10 µL.

3.4. TOXICIDADE AGUDA

3.4.3. Preparo das emulsões

250 mg de carboximetilcelulose foram dissolvidos em q.s.p. 50 mL de glicose à 5%. Depois, 5 mL desta solução contendo 0,5% de tween 80 foram emulsionados com o composto 1 ou com o composto 2 nas concentrações finais de 0,4 mg/mL, 4 mg/mL e 40 mg/mL. As emulsões foram homogeneizadas com um Ultra Turrax por 1 min e administradas por gavagem aos camundongos imediatamente após o preparo.

3.4.4. Tratamento e análise

As emulsões foram administradas aos camundongos por via oral em dose única aos 4 grupos (10 mg/kg, 100 mg/kg, 1000 mg/kg e controle). Cada grupo era composto por 5 camundongos CD-1 fêmeas com peso corporal entre 18 e 22 g. O grupo controle recebeu a mistura de 0,5% de carboximetilcelulose em glicose à 5% e tween 80 à 0,5%. O comportamento dos animais e o número de mortes foi observado à 1 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h, 8 h e diariamente até o 14° dia. No último dia de observação, amostras de sangue foram coletadas para a análise bioquímica no aparelho Integra® (Roche Diagnostic). Para avaliar a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade, os níveis de creatinina, aspartato amino

transferase (ASAT), alanina amino transferase (ALAT) e colesterol foram mensurados.

3.4.3. Síntese do sal canfosulfônico do composto 1

Inicialmente, 6,5152 g (38×10^{-3} mol) do composto 1 foram dissolvidos em 20 mL de metanol e 60 mL de éter à 20 °C. Adicionou-se então 8,84 g (38×10^{-3} mol) de ácido canfosulfônico à solução que estava sob agitação. A solução foi levemente aquecida e, logo depois, resfriada à temperatura ambiente. Algumas gotas de éter diisopropílico foram adicionadas e observou-se a precipitação dos cristais que foram filtrados e lavados com éter diisopropílico. A reação de síntese do composto 1 está representada na Figura 19.

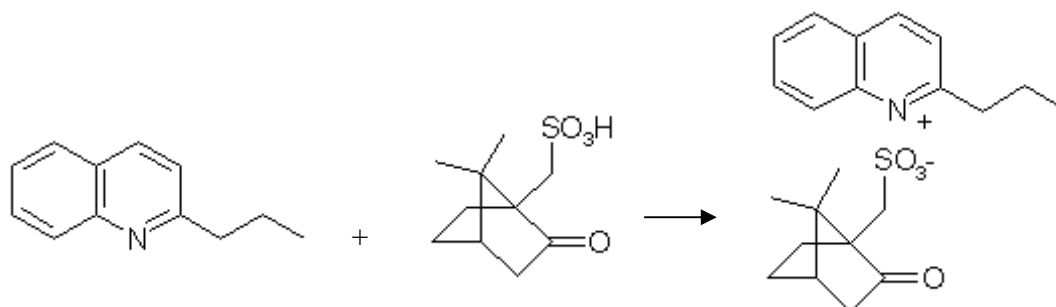


Figura 19: Reação de síntese do sal canfosulfônico do composto 1

3.4.4. Caracterização do sal canfosulfônico do composto 1

Os cristais obtidos (12,7439 g) foram caracterizados por microscopia ótica e difração de raios X. A difração de raios X foi realizada em um difractômetro Bruker AXS, modelo D8 Advance em configuração theta-theta,

equipado com um anti-cátodo de cobre, um porta-amostras em silício monocristalino e um detector linear de localização espacial. Quatro amostras foram depositadas no porta-amostras em silício sem trituração ou tratamento prévio e os difractogramas foram registrados segundo as condições apresentadas na Tabela 2.

Temperatura		Ambiente
Atmosfera		Ambiente
Geração de raios X	Tensão (kV)	40
	Intensidade (mA)	40
Fonte de raios X	Alvo	Cu
	Espectro de emissão: $K\lambda_1$ (nm)	0,15406
	$K\lambda_2$ (nm)	0,15444
	Razão $K\lambda_1$ (nm)/ $K\lambda_2$ (nm)	0,5
	Filtro do espectro $K\beta$	Ni
Fenda (mm)	Antidivergência	0,6
Goniômetro	Setor angular varrido ($^\circ$ em 20)	4-70
	Sem deslocamento ($^\circ$ em 20)	0,069
Velocidade de rotação do porta-amostras (tpm)		30
Detecção	Abertura angular ($^\circ$)	8
	Tempo de exposição por etapa da goniometria	6

Tabela 2: Condições operacionais para aquisição dos perfis de difração de raios X.

3.5. ESTUDO FARMACOCINÉTICO

3.5.9. Compostos

Estudos prévios de farmacocinética *in vitro* já haviam identificado os 3 metabólitos majoritários do composto 1 (compostos 4, 5 e 6 representados na

Figura 20). Então, as moléculas foram sintetizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Paris-Sud XI de Châtenay-Malabry/França para serem investigadas neste estudo de biodisponibilidade *in vivo*. Os esquemas de síntese de todos os compostos utilizados no trabalho estão representados no Anexo 1.

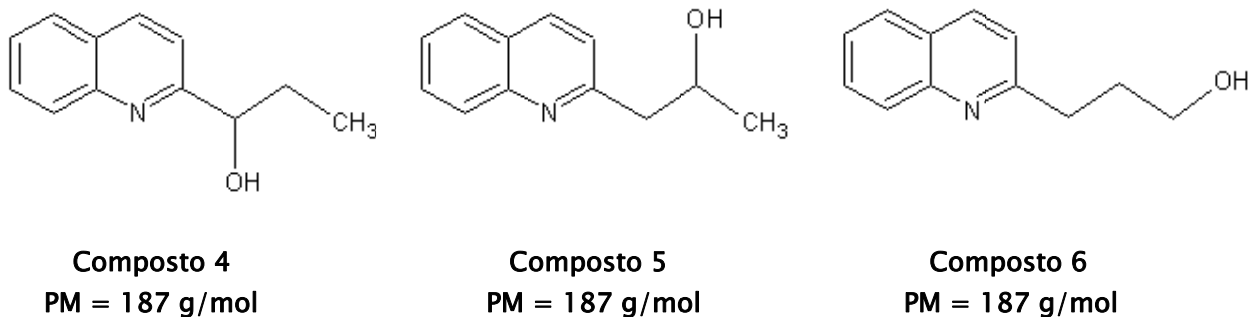


Figura 20: Metabólitos hidroxilados do composto 1. Composto 4 (1-quinol-2-il-propan-1-ol), composto 5 (1-quinol-2-il-propan-2-ol) e composto 6 (1-quinol-2-il-propan-3-ol).

3.5.10. Preparo das emulsões

As emulsões administradas por via endovenosa foram preparadas com 16,5 mg do composto 1 dissolvidos em 5 mL de β -ciclodextrina à 30%, concentração final de 3,3 mg/mL. As formulações foram mantidas à -20°C até o momento da administração.

As emulsões administradas por via oral foram preparadas extemporaneamente. O peso do animal era registrado no dia da cateterização,

ou seja, no dia anterior ao início das coletas. Neste mesmo dia, uma determinada quantidade do sal do composto 1 era pesada em um eppendorf de modo que, misturando-se à 1,5 mL de carboximetilcelulose à 5% fosse obtida a concentração final de 20 mg/mL, assim cada animal recebeu 50 mg/kg. Na manhã do dia seguinte, minutos antes do início das coletas, o composto pesado era misturado ao veículo e agitado até que a suspensão ficasse homogênea. A formulação era administrada logo após o preparo.

3.5.11. Animais

Treze ratos Wistar machos de aproximadamente 400 g foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia de Châtenay-Malabry / França. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e ficaram em sala climatizada com ciclo claro-escuro 12 h/ 12 h e temperatura e umidade controladas.

3.5.12. Cateterização

3.5.4.1. Materiais

- Cateter em polietileno, não estéril, N°. 3, com diâmetro interno = 0,58 mm e diâmetro externo = 0,96 mm
- Agulha 23 G x 1" de 0,6 x 25 mm sem ponta, usada para tampar a saída do cateter
- Seringa de 1 mL (insulina) para a coleta de sangue

- Heparina sódica 25.000 UI / 5 mL
- Soro fisiológico
- Glicose à 5%
- Tampa de rosca (inserida na agulha que tampa a saída do cateter)
- Haste metálica flexível para proteger o cateter
- Botão plástico
- Isqueiro
- Material cirúrgico
 - 2 pinças cirúrgicas Perry
 - 1 pinça Pean
 - 1 tesoura cirúrgica
- Fio cirúrgico de sutura azul não reabsorvível em polipropileno 4,0 de 13 mm 318c F1813 (Johnson & Johnson)
- Pentobarbital na dose de 50 mg/kg (0,1 mL/100 g)

3.5.4.2. Procedimento

- Preparar o soro fisiológico heparinizado misturando 200 µL de heparina sódica em q.s.p. 10 mL de soro fisiológico
- Inserir o cateter, cerca de 40 cm, dentro da haste metálica e conectar o botão plástico ao início da haste. A haste metálica fica inserida no botão para manter o conjunto (cateter e haste) preso ao dorso do animal

- Com o auxílio do isqueiro, aquecer a porção do cateter que fica à cerca de 2 cm da ponta que será introduzida na carótida. Então, deve-se moldar uma bolinha na parte aquecida que será usada para amarrar o cateter no músculo do pescoço.
- Injetar um pouco de soro fisiológico heparinizado para verificar se a bolinha não impede o fluxo do líquido no cateter. Preencher o cateter com soro heparinizado sem deixar bolhas de ar no cateter.
- Fazer um corte em diagonal na ponta correspondente à entrada do cateter (com cuidado para não deixar a ponta perfurante)
- Pesar e anestésiar o animal com pentobarbital intraperitoneal
- Fazer a tricotomia da face anterior do pescoço e da região dorsal
- Colocar o animal em decúbito ventral e fazer uma incisão na pele na face anterior do pescoço
- Virar o animal em decúbito dorsal e fazer uma incisão na pele da região dorsal
- Com o auxílio de uma pinça Pean, criar uma passagem subcutânea em volta do pescoço entre as incisões da face anterior do pescoço e da região dorsal
- Passar o cateter por dentro da passagem
- Dissecar os planos anatômicos até visualização do feixe carotídeo vículo-nervoso
- Individualizar a carótida
- Isolar o fluxo sanguíneo do segmento

- Realizar a secção parcial do vaso
- Introduzir o cateter no lúmen arterial
- Amarrar o cateter na musculatura cervical
- Suturar o local de incisão do cateter
- Prender o botão plástico conectado à haste metálica na musculatura do dorso do animal
- Suturar a incisão da região dorsal

Este procedimento foi realizado 24 h antes do início da coleta. Após a inserção do cateter, o animal foi colocado em uma gaiola metabólica (Figura 21).

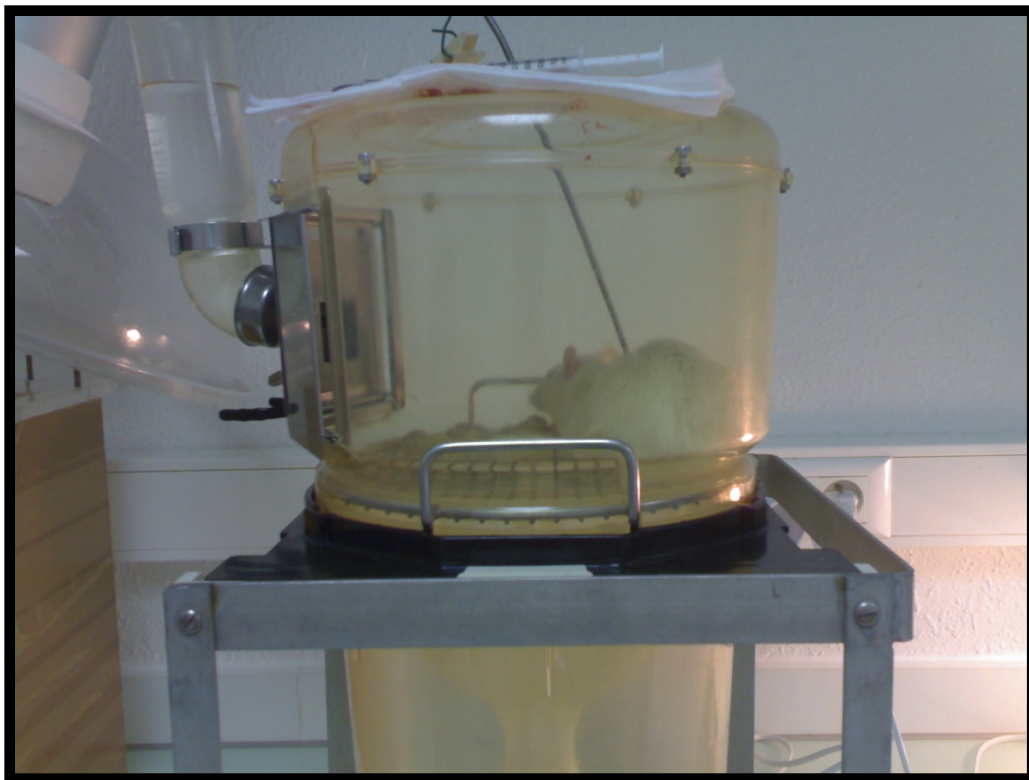


Figura 21: Rato Wistar cateterizado em gaiola metabólica

3.5.13. Administração do composto 1 e coleta das amostras

3.5.5.1. Materiais

- Eppendorfs (coleta de sangue)
- Tubos falcon (coleta de urina)
- Potes (coleta de fezes, fígado e baço)

Todo o material foi identificado antes da coleta

3.5.5.2. Procedimento

As primeiras coletas de sangue, urina e fezes (controles) foram realizadas antes da administração do composto.



Administração por via endovenosa	Administração por via oral
<p>Após a coleta dos controles, 1 mL da emulsão do composto 1 (10 mg/kg) foi administrado lentamente por via endovenosa através do cateter. Então, 0,3 mL de soro glicosilado foram infundidos imediatamente para lavar o cateter.</p>	<p>Após a coleta dos controles, 1 mL da emulsão do composto 1 (50 mg/kg) foi administrado por via oral.</p>



A hora exata da administração era registrada.



Administração por via endovenosa	Administração por via oral
Tempos de coleta após a administração: 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h	Tempos de coleta após a administração: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 30 min, 3 h, 5 h, 8 h e 24 h



250 μ L de sangue foram coletados (Figura 22) e imediatamente guardados no refrigerador do biotério à 4 °C até um período máximo de 4 h.



Figura 22: Coleta de sangue do animal através do cateter



A urina e as fezes foram novamente coletados 24 h após a administração do composto 1. Todas as amostras de urina e fezes foram mantidas no refrigerador do biotério à 4°C até um período máximo de 4 h. Posteriormente, foram levados ao laboratório e guardados à -20°C.



Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com 1 mL de pentobarbital. O fígado e o baço foram retirados e congelados à -20°C .

3.5.14. Recuperação do plasma

As amostras de sangue foram centrifugadas por 4 min à 8.000 rpm. O sobrenadante foi separado e congelado no laboratório à -20°C .

3.5.15. Extração sólido-líquido

O plasma e a urina foram descongelados à temperatura ambiente. 50 μL foram misturados com 50 μL do padrão interno (propilparabeno na concentração final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com 400 μL de ácido fosfórico (pH 2,5) / metanol 95:5 (v/v). Esta preparação foi utilizada na etapa 2 (carregamento da amostra). Foram utilizados cartuchos Sep Pak C18 (100 mg, 1 mL) da Waters.

Etapa 1 – Condicionamento dos cartuchos

1.1 – 1 mL de metanol grau HPLC

1.2 – 1 mL água milliQ / metanol 95:5 (v/v)



Obs: não deixar o cartucho secar!

Etapa 2 – Carregamento da amostra

2.1 – Amostra diluída à 1/10 em ácido fosfórico (pH 2,5) / metanol 95:5 (v/v)

Preparação: 50 µL de plasma + 50 µL do padrão interno + ácido fosfórico (pH 2,5) / metanol 95:5 (v/v) 400 µL)

Obs: deixar a amostra correr até o final

Etapa 3 – Lavagem

3.1 – 0,5 mL NH₄OH 2% / metanol 80:20 (v/v)

3.2 – 0,5 mL HCl 10⁻² M

Obs: deixar cada solução correr até o final

Etapa 4 – Eluição

4.1 – 100% metanol 0,5 mL

Obs: deixar a solução correr até o final

3.5.16. Curva de calibração

Preparo das soluções-mãe: 2,5 mg dos compostos 1, 4, 5 e 6 foram dissolvidos em 500 µL de metanol, concentração final de 5 mg/mL. As soluções eram preparadas a cada repetição das curvas. As curvas do composto 1 foram preparadas nas concentrações de 0,1953 / 0,3906 / 0,7813 / 1,563 / 3,125 / 6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100 e 200 mg/mL à partir da diluição seriada da solução-mãe. As curvas dos metabólitos hidroxilados (compostos 4, 5 e 6)

foram preparadas nas concentrações de 0,09765 / 0,1953 / 0,3906 / 0,7813 / 1,563 / 3,125 / 6,25 / 12,5 / 25 / 50 e 100 mg/mL. Cada uma destas concentrações testadas foi associada aos valores correspondentes às áreas dos picos dos cromatogramas (Anexo 2). A média das áreas dos picos em cada concentração foi dividida pela área do pico do padrão interno à 20 µg/mL para gerar a curva de calibração de cada composto. Foram feitas pelo menos 3 curvas de calibração para cada composto. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas fórmulas $LD = (SD \times 3)/IC$ e $LQ = (SD \times 10)/IC$ onde SD é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação da curva de calibração. A validação da metodologia seguiu as exigências da International Conference on Harmonisation (ICH, 2005).

3.5.9. Rendimento

Para observar o rendimento dos compostos nas matrizes biológicas, os compostos foram misturados ao plasma ou à urina de ratos Wistar saudáveis que não receberam nenhum tratamento em 3 concentrações diferentes, 100, 12,5 e 0,3906 mg/mL para o composto 1 e 100, 12,5 e 0,1953 mg/mL para os metabólitos hidroxilados. As misturas foram submetidas à extração sólido-líquido e as soluções eluídas foram injetadas no HPLC. As matrizes biológicas sem os compostos foram utilizadas como controles negativos. As amostras foram injetadas em triplicata.

3.5.10. Condições cromatográficas

O sistema foi o mesmo utilizado para o ensaio de estabilidade química das quinoleínas. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Sunfire™ C₁₈ 5 µm 150 x 4,6 mm com uma pré-coluna Sunfire™ C₁₈ 20 x 4,6 mm. A fase móvel isocrática consistiu na mistura de tampão acetato 10⁻² M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v). O fluxo foi de 1,2 mL/min e a temperatura de 35 °C. Os espectros de absorção em UV foram extraídos à 233 nm (compostos 1, 4, 5, 6 e padrão interno). Os 500 µL recuperados na etapa de eluição da extração sólido-líquido foram colocados nos vias e 100 µL desta solução foram injetados no HPLC.

3.5.10. Cálculos farmacocinéticos

A análise do perfil farmacocinético do composto 1 foi feita por análise não-compartmental e bi-compartmental utilizando o programa WinNonLin da Pharsight Corporation (Mountain View, California, 94041, USA). Para a análise da adequabilidade do modelo compartmental foram observados os valores do Aikake Information Criterion (AIC), coeficiente de correlação e ajuste gráfico.

4. RESULTADOS

4.1. AÇÃO *IN VITRO* DAS QUINOLEÍNAS SOBRE *LEISHMANIA DONOVANI*

Os resultados do teste da atividade *in vitro* dos compostos 1 a 6 e dos medicamentos de referência sobre cepas selvagens e resistentes de *Leishmania donovani* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: CI_{50} dos compostos e medicamentos de referência sobre formas promastigotas de *L. donovani*. Foram utilizadas cepas selvagens (LV9 WT e DD8 WT) e cepas resistentes à miltefosina (HePC-R) e à sitamaquina (Sita-160-R).

SUBSTÂNCIA	$CI_{50} \pm DP$ (μM)			
	LV9 WT	Sita-160-R	HePC-R	DD8 WT
Composto 1	122,3 \pm 32,5	157,8 \pm 88,5	160,4 \pm 46,5	137,0 \pm 45,26
Composto 2	15,7 \pm 4,4	3,6 \pm 0,3	19,9 \pm 2,4	14,1 \pm 4,5
Composto 3	7,8 \pm 3,1	3,2 \pm 0,9	18,6 \pm 7,1	10,9 \pm 5,6
Composto 4	129,2 \pm 17,5	NT	> 400	NT
Composto 5	344,0 \pm 48,1	NT	> 400	NT
Composto 6	250,8 \pm 31,9	NT	> 400	NT
Sitamaquina	37,2 \pm 19,5	184,5 \pm 24,3	51,0 \pm 8,8	68,2 \pm 7,1
Miltefosina	3,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,6	68,0 \pm 10,6	17,4 \pm 1,7
Anfotericina B	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02

NT = não testado

DP = desvio padrão

4.2. INTERAÇÃO *IN VITRO* DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA DONOVANI*

Os resultados do ensaio de interação *in vitro* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Índice de concentração inibitória fracional (FICI) e resultado do efeito encontrado para as associações *in vitro* do composto 1 com os compostos 2 e 3 e com os medicamentos de referência

SUBSTÂNCIA	SUBSTÂNCIA ASSOCIADA	FICI	RESULTADO
Composto 1	Composto 2	0,71	Efeito aditivo simples
	Composto 3	0,57	
	Sitamaquina	0,75	
	Miltefosina	0,65	
	Anfotericina B	0,52	

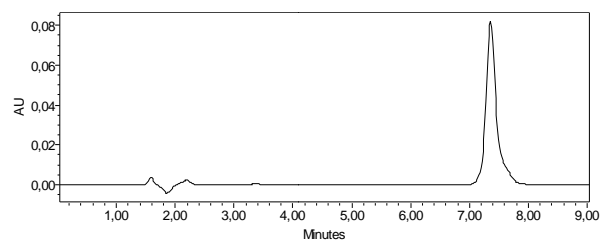
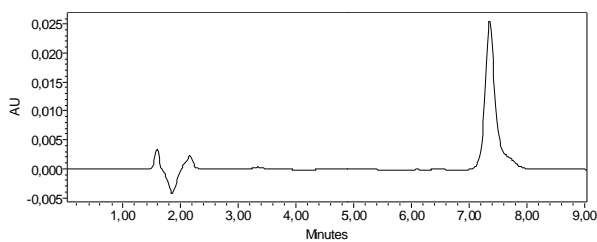
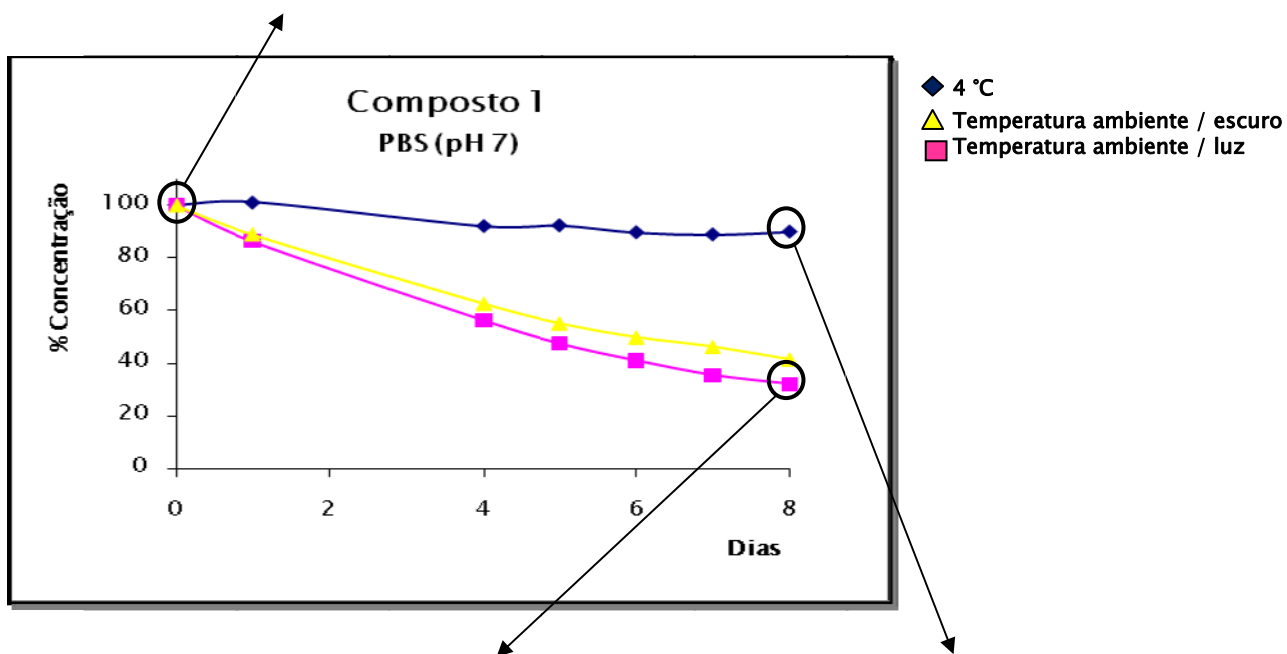
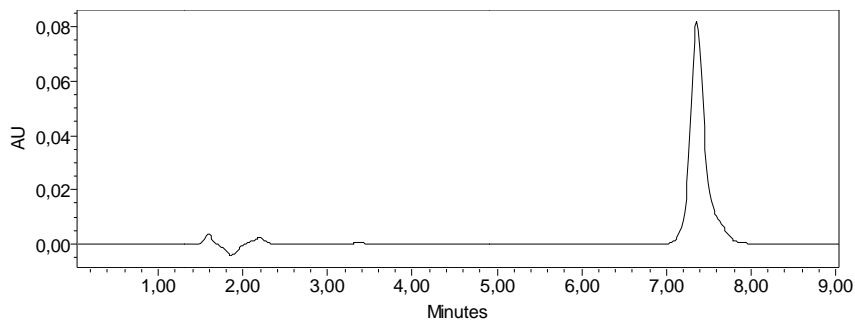
4.3. ESTABILIDADE QUÍMICA

Os tempos de retenção encontrados foram de 7,3 min para o composto 1, 3,9 min para o composto 2 e 3,2 min para o composto 3.

A Figura 23 mostra o gráfico das concentrações do composto 1 em PBS durante os 9 dias do estudo em três condições de temperatura e luminosidade (4 °C, em temperatura ambiente sob influência da luz e em temperatura ambiente no escuro). O cromatograma superior da Figura 23

representa o pico do composto 1 no primeiro dia do experimento nas três condições de temperatura e luminosidade. Os cromatogramas inferiores correspondem ao pico do composto 1 no último dia do experimento em temperatura ambiente sob influência da luz (à esquerda) e à 4 °C (à direita). Nestes cromatogramas, verifica-se que não houve formação de novos picos ao longo do ensaio, apenas uma diminuição da altura do pico no cromatograma esquerdo em comparação ao cromatograma superior, referente ao primeiro dia.

Cromatograma do primeiro dia do estudo de estabilidade química do composto 1 em PBS



Cromatogramas do último dia do estudo de estabilidade química do composto 1 em PBS

Figura 23: Gráfico da concentração do composto 1 em PBS (pH 7) e cromatogramas referentes ao primeiro e ao último dia do estudo de estabilidade química.

Todos os resultados obtidos com o composto 1 no estudo de estabilidade química seguem a lógica da Figura 23. Nenhum cromatograma do composto 1 apresentou alteração na forma do pico ou formação de novos picos ao longo do estudo de estabilidade química. Portanto, a diminuição na altura do pico estava relacionada apenas à redução na concentração do composto.

Os gráficos apresentados abaixo (Figura 24) correspondem à concentração do composto 1 nos demais solventes testados nas três condições de temperatura e luminosidade.

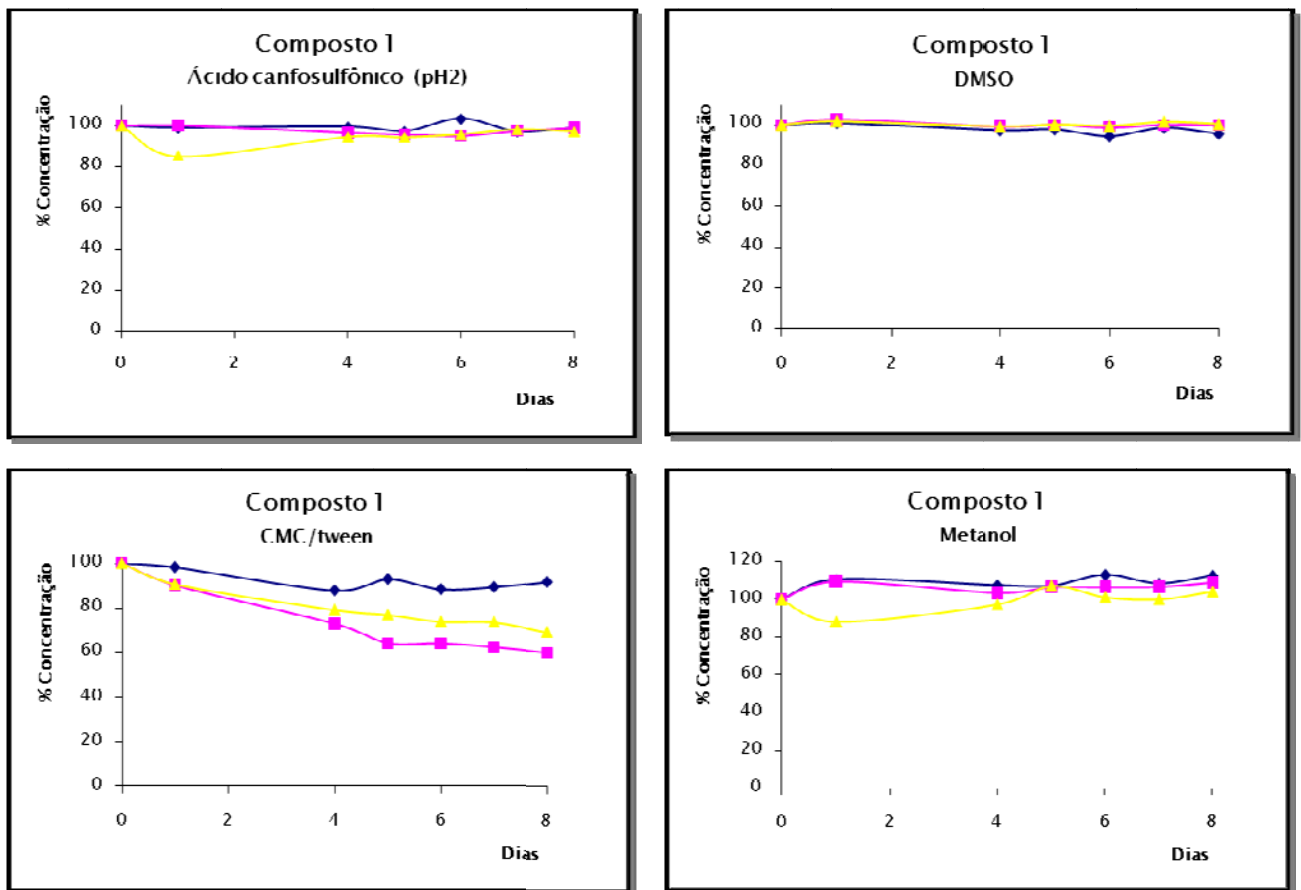


Figura 24: Gráficos da concentração do composto 1 nos demais solventes (ácido canfosulfônico (pH 2), DMSO, CMC/tween e metanol) à 4 °C (◆), em temperatura ambiente sob influência da luz (■) e em temperatura ambiente no escuro (▲).

O composto 2 foi o que apresentou maiores alterações nos cromatogramas ao longo do estudo. Os gráficos abaixo (Figura 25) mostram a concentração do composto 2 em todas as condições e solventes testados.

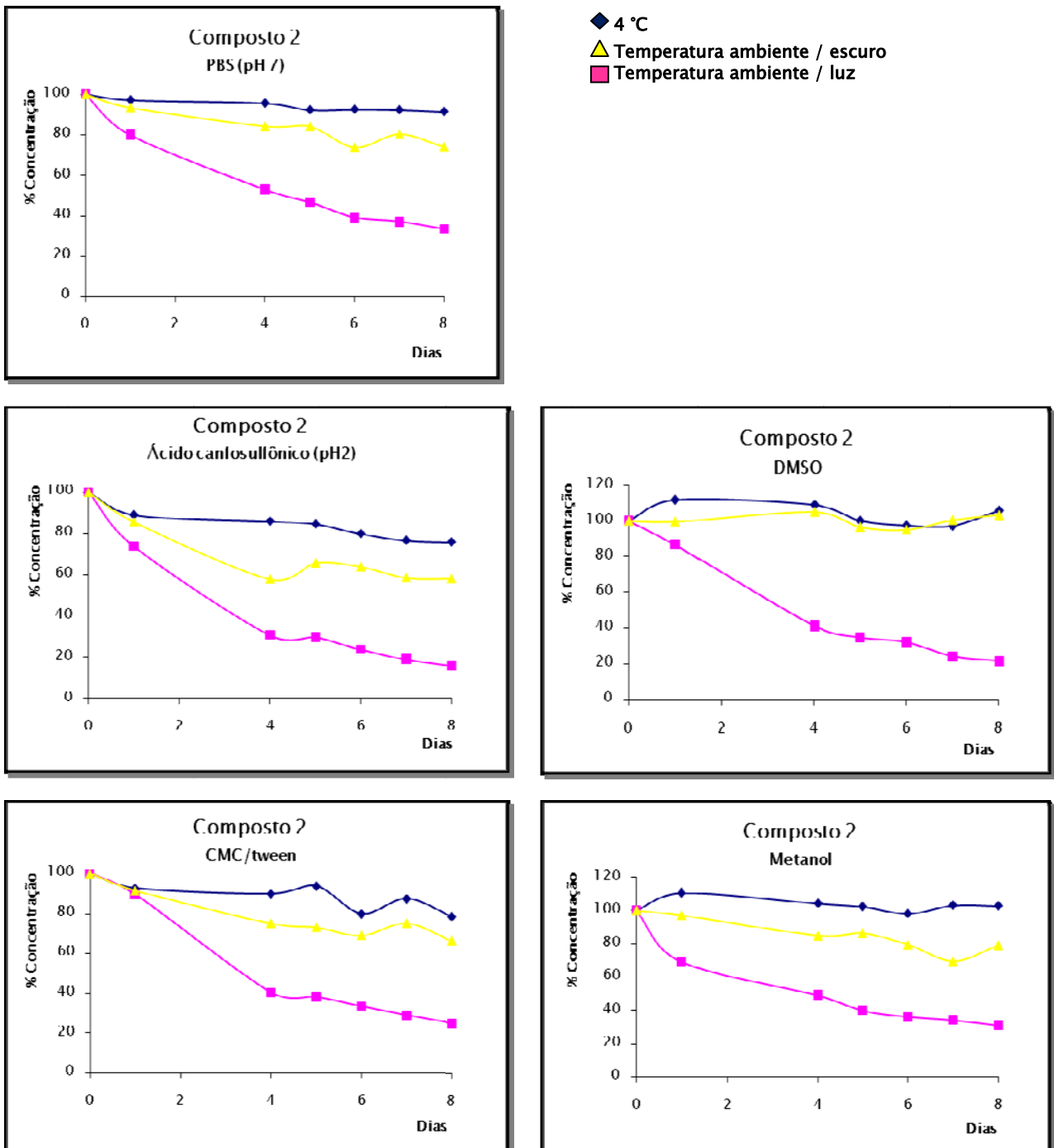


Figura 25: Gráficos da concentração do composto 2 em PBS (pH 7), ácido canfosulfônico (pH 2), DMSO, CMC/tween e metanol à 4 °C (◆), em temperatura ambiente sob influência da luz (■) e em temperatura ambiente no escuro (▲).

Mesmo mantendo a concentração final similar à concentração final em algumas condições (PBS à 4 °C; DMSO à 4 °C e em temperatura ambiente no escuro; e metanol à 4 °C) o composto 2 apresentou diferenças em todos os cromatogramas do estudo, sem exceção. Os cromatogramas abaixo (Figuras 26 e 27) representam alguns exemplos de alterações apresentadas por este composto.

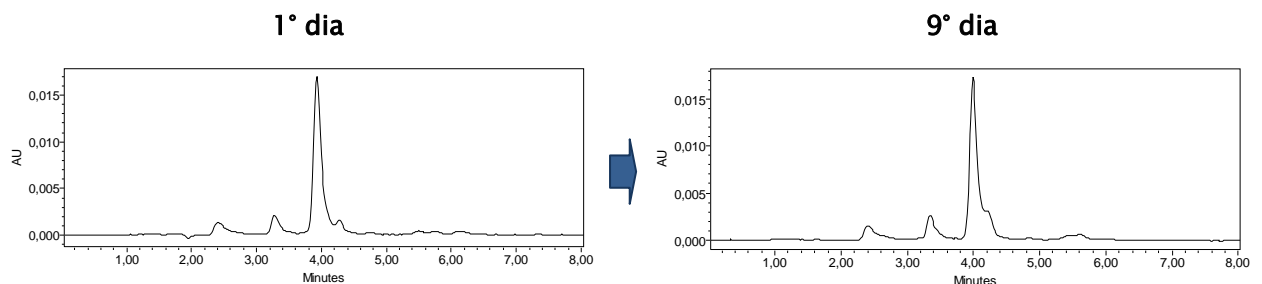


Figura 26: Composto 2 em metanol à 4 °C no primeiro e no 9° dia de estudo

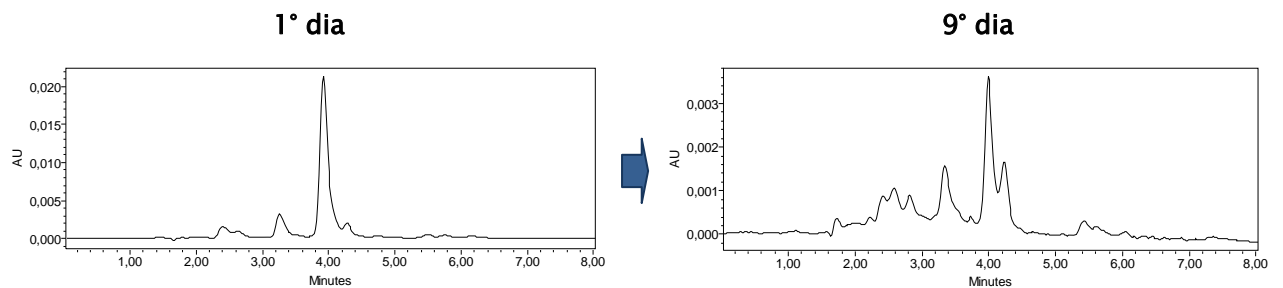


Figura 27: Composto 2 em ácido canfosulfônico (pH 2) em temperatura ambiente sob influência da luz no primeiro e no 9° dia de estudo

O composto 3 apresentou estabilidade química intermediária entre os compostos 1 e 2. Os gráficos da Figura 28 mostram as concentrações do composto em todas as soluções e condições estudadas.

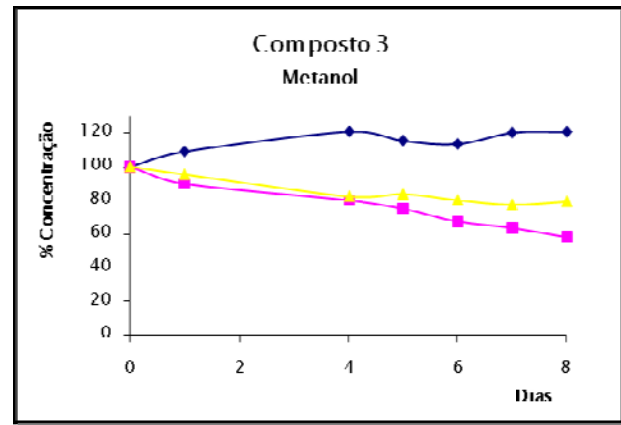
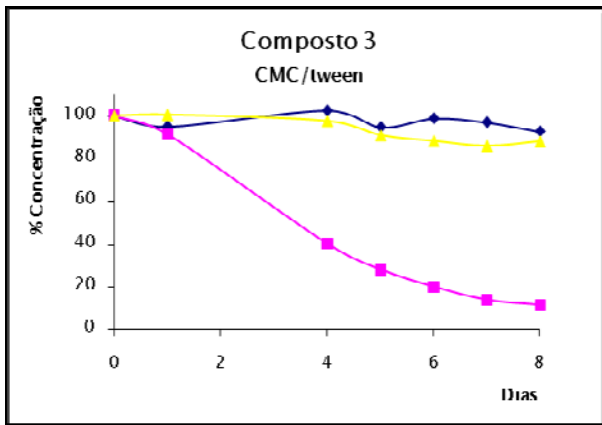
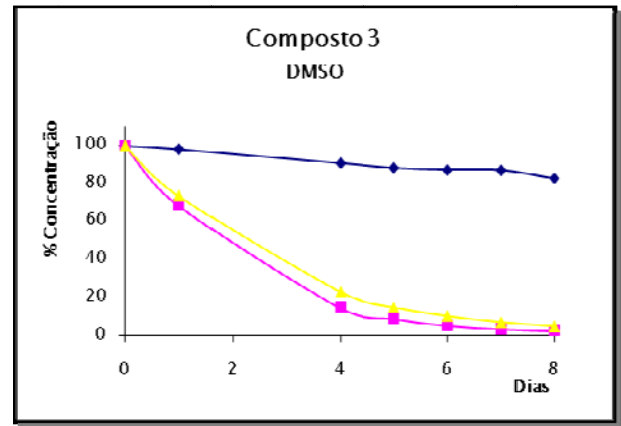
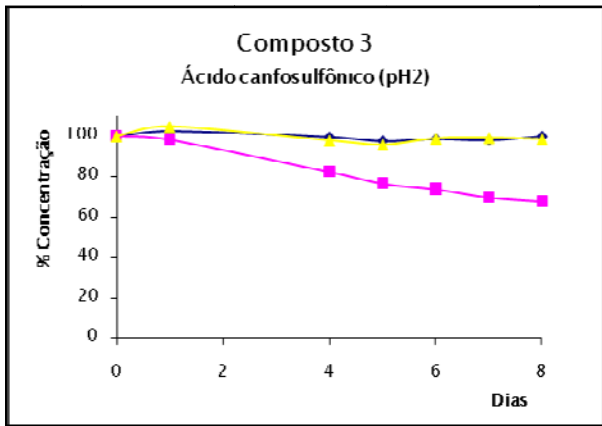
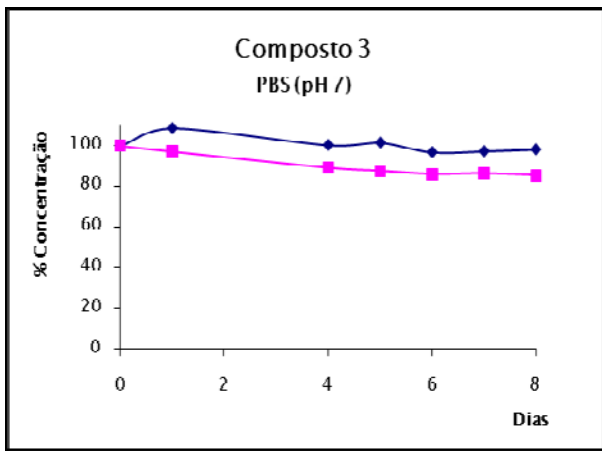


Figura 28: Gráficos da concentração do composto 3 em PBS (pH 7), ácido canfosulfônico (pH 2), DMSO, CMC/tween e metanol à 4 °C (◆), em temperatura ambiente sob influência da luz (■) e em temperatura ambiente no escuro (▲).

Em algumas condições, o composto foi estável, mantendo as concentrações e os cromatogramas do último dia semelhantes aos do primeiro dia de estudo (Figura 29).

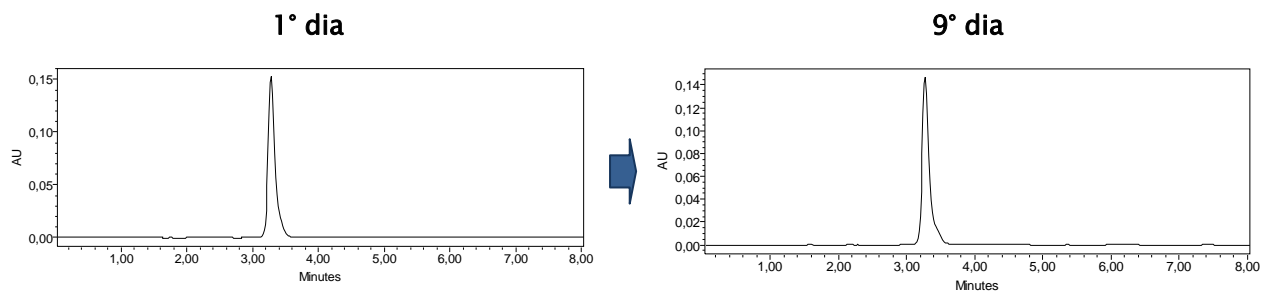


Figura 29: Composto 3 em PBS à 4°C no primeiro e no 9º dia de estudo

Entretanto, em outras condições, houve grandes alterações nos cromatogramas (Figura 30).

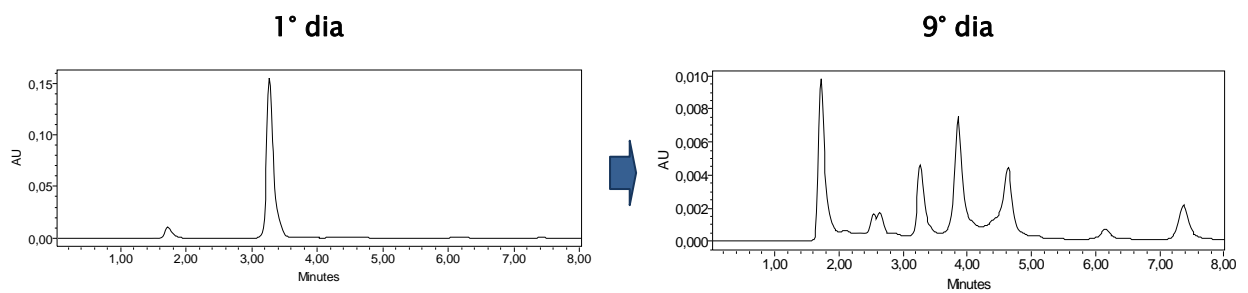


Figura 30: Composto 3 em DMSO em temperatura ambiente sob influência da luz no primeiro e no 9º dia de estudo

4.4. TOXICIDADE AGUDA

Os sinais de toxicidade de cada grupo tratado com os compostos 1 e 2 estão demonstrados na Tabela 5 e os resultados das análises bioquímicas estão na Tabela 6. Não houve nenhuma morte durante o experimento.

Tabela 5: Sinais de toxicidade nos grupos tratados com os compostos 1 e 2 e no grupo controle

COMPOSTO	N° ANIMAIS	DOSE ÚNICA V.O.	SINAIS DE TOXICIDADE
Composto 1	5	1g/kg	t15 min – 3 camundongos cambaleavam e estavam letárgicos t1h – 2 camundongos ainda letárgicos t4h – ausência de sinais
		100 mg/kg	ausência de sinais
		10 mg/kg	ausência de sinais
Composto 2	5	1g/kg	t15 min – 1 camundongo cambaleava e tinha o pêlo eriçado 1 camundongo estava excitado t1h – ausência de sinais
		100 mg/kg	ausência de sinais
		10 mg/kg	ausência de sinais
Controle	5	CMC/tween	ausência de sinais

t = tempo após a administração do composto

Tabela 6: Análises bioquímicas do sangue coletado no último dia de observação dos grupos tratados com os compostos 1 e 2 e do grupo controle

		MÉDIA ± DP			
COMPOSTO	DOSE	CREATININA (µM)	COLESTEROL (mM)	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)
Composto 1	1 g/kg	< 18	3,8 ± 0,4	422 ± 187	199 ± 89
	100 mg/kg	< 18	4,1 ± 0,5	515 ± 72	168 ± 67
	10 mg/kg	< 18	3,9 ± 0,3	410 ± 57	215 ± 123
Composto 2	1 g/kg	20,7 ± 3,1	3,4 ± 0,6	388 ± 70	260 ± 131
	100 mg/kg	< 18	4,6 ± 0,5	397 ± 202	247 ± 76
	10 mg/kg	< 18	3,9 ± 0,3	337 ± 80	223 ± 74
Controle	CMC / tween	< 18	3,5 ± 0,5	456 ± 276	304 ± 25

ASAT = aspartato amino transferase

ALAT = alanina amino transferase

DP = desvio padrão

A análise estatística foi realizada com a aplicação do U-Rank test.

4.5. SÍNTESE DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1

A quantidade de sal sintetizada foi de 12,7439 g. Os cristais obtidos eram homogêneos de coloração branca à ligeiramente bege. Como a intenção era realizar todos os estudos com o mesmo lote do sal, a quantidade sintetizada foi elevada. Os estudos planejados com o sal incluem estudos de farmacocinética, testes de atividade *in vitro*, modelos experimentais de leishmaniose e testes de mutagenicidade e toxicidade crônica.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1

As Figuras 31 e 32 apresentam os cristais do sal canfosulfônico do composto 1. A primeira imagem foi obtida por microscopia ótica em luz refletida com aumento de 40 x. A segunda foi obtida por microscopia ótica em luz polarizada com aumento de 81 x.

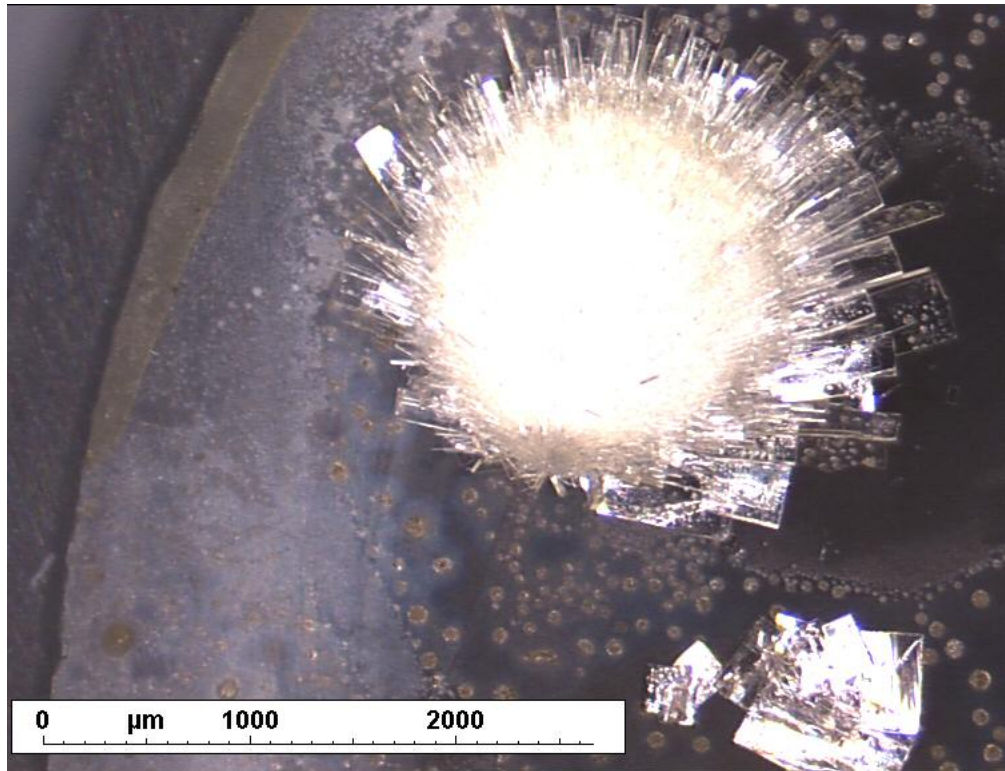


Figura 31: Imagem do sal canfosulfônico do composto 1 em microscopia ótica em luz refletida com aumento de 40 x.

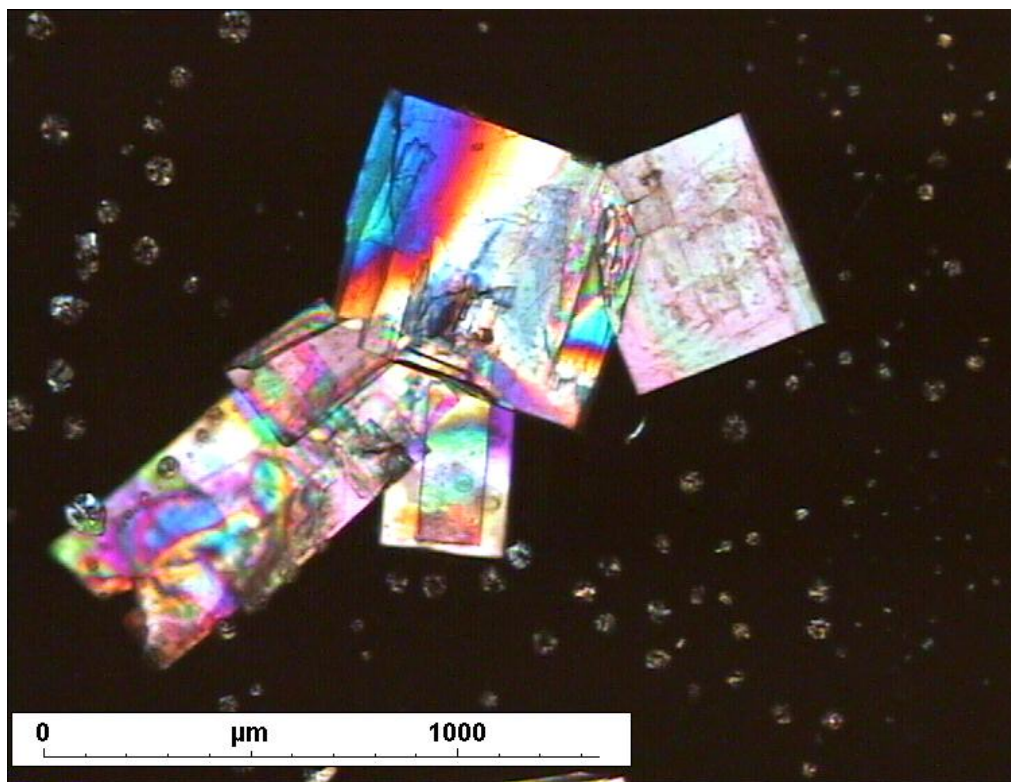


Figura 32: Imagem do sal canfosulfônico do composto 1 em microscopia ótica em luz polarizada com aumento de 81 x.

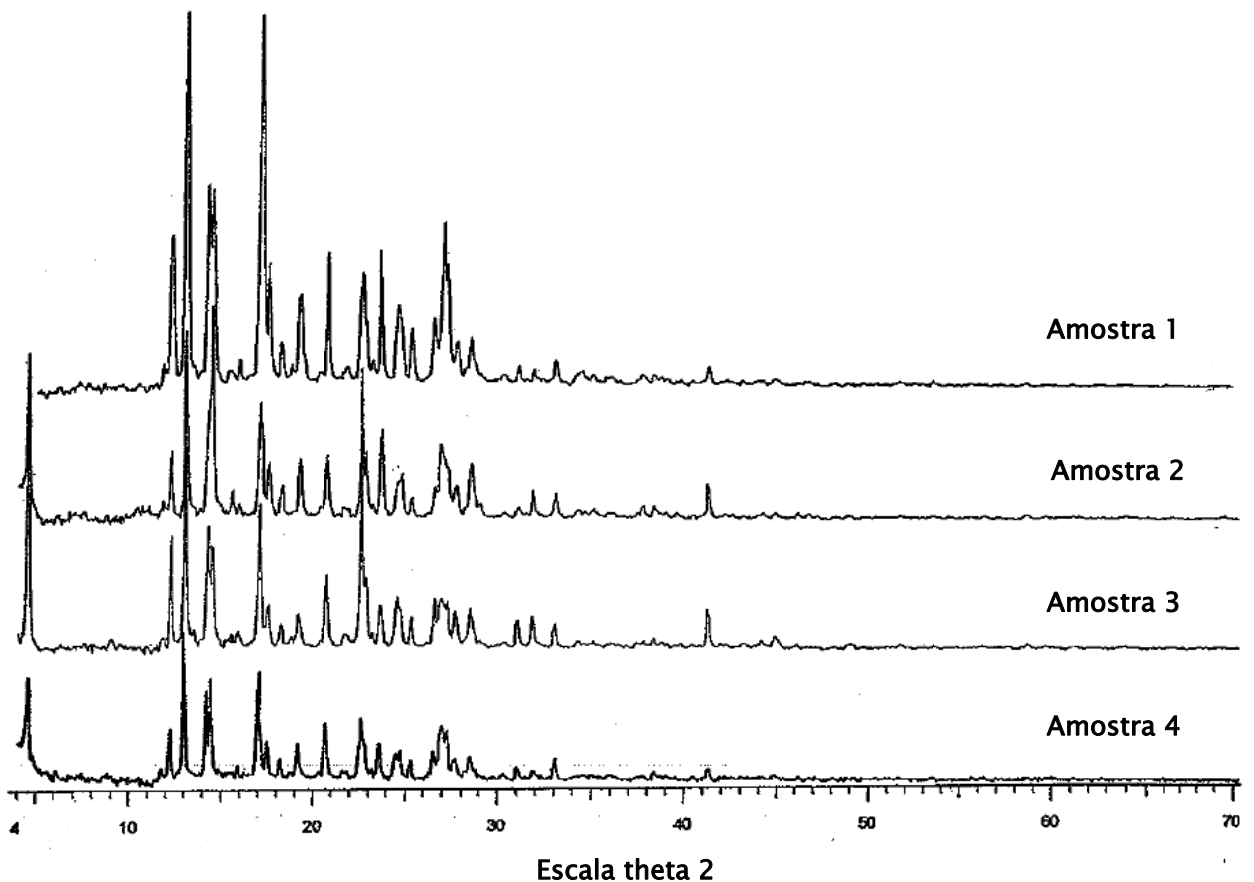


Figura 33: Superposição dos perfis de difração de raios X das amostras do sal canfosulfônico do composto 1

A Figura 33 representa a superposição dos perfis de difração de raios X das amostras 1 a 4. O perfil de difração indica a presença de matéria cristalina, sem detecção de fase amorfa. Também foi constatada a presença da mesma fase cristalina nos difractogramas das quatro amostras.

4.7. ESTUDO FARMACOCINÉTICO

Os tempos de retenção na coluna Sunfire em fase móvel isocrática foram de: 6,7 min para o composto 6, 7,5 min para o composto 5, 17,9 min para o composto 4, 26,3 min para o composto 1 e 37,0 min para o padrão interno (Figura 34).

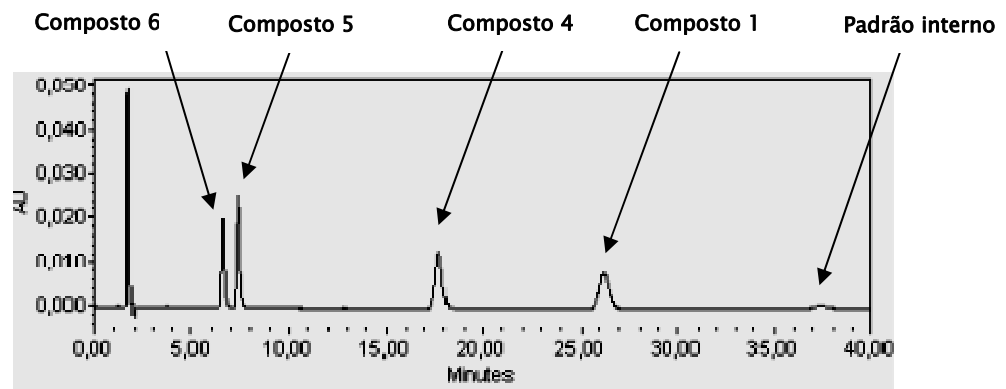


Figura 34: Cromatograma dos compostos 1, 4, 5, 6 e do padrão interno em coluna Sunfire™ em fase móvel isocrática constituída por tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol 60:40 (v/v). Leitura à 233 nm.

A próxima etapa da validação foi a preparação das curvas de calibração. Os compostos foram diluídos na fase móvel em diferentes concentrações e submetidos às etapas da extração sólido-líquido. A curva de calibração do composto 1 foi linear entre 0,1953 e 200 mg/mL. A curva de calibração do composto 4 foi linear entre 0,1953 e 100 mg/mL. As curvas de calibração dos compostos 5 e 6 foram lineares entre 0,09765 e 100 mg/mL. Todas as curvas de calibração com suas respectivas equações estão apresentadas nos Gráficos 3 a 6.

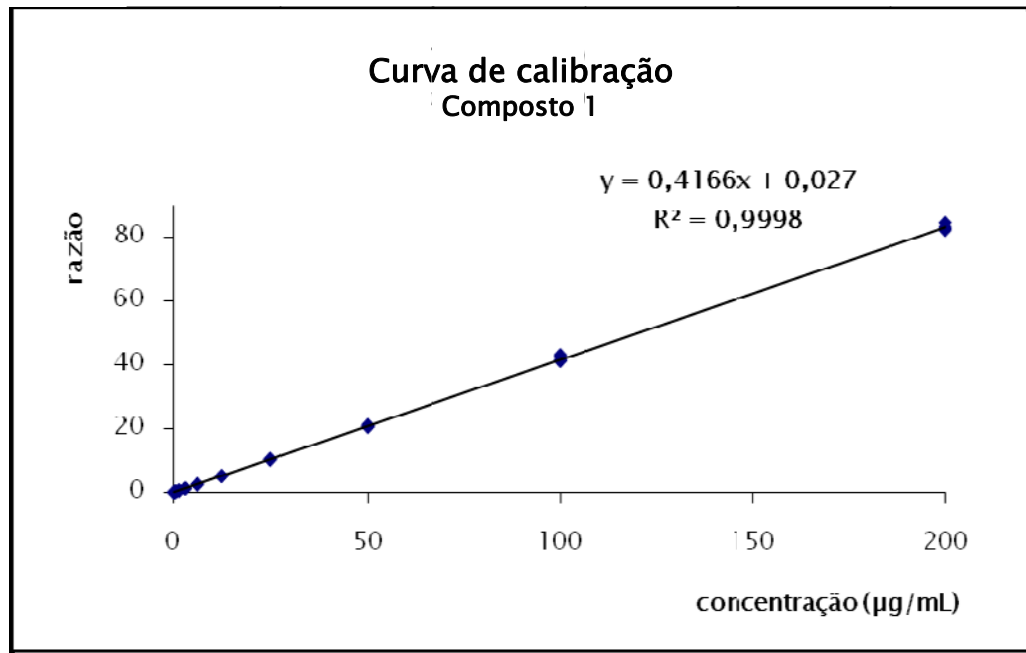


Gráfico 3: Curva de calibração do composto 1 (razão da área do composto 1 pela área do padrão interno à 20 µg/mL)

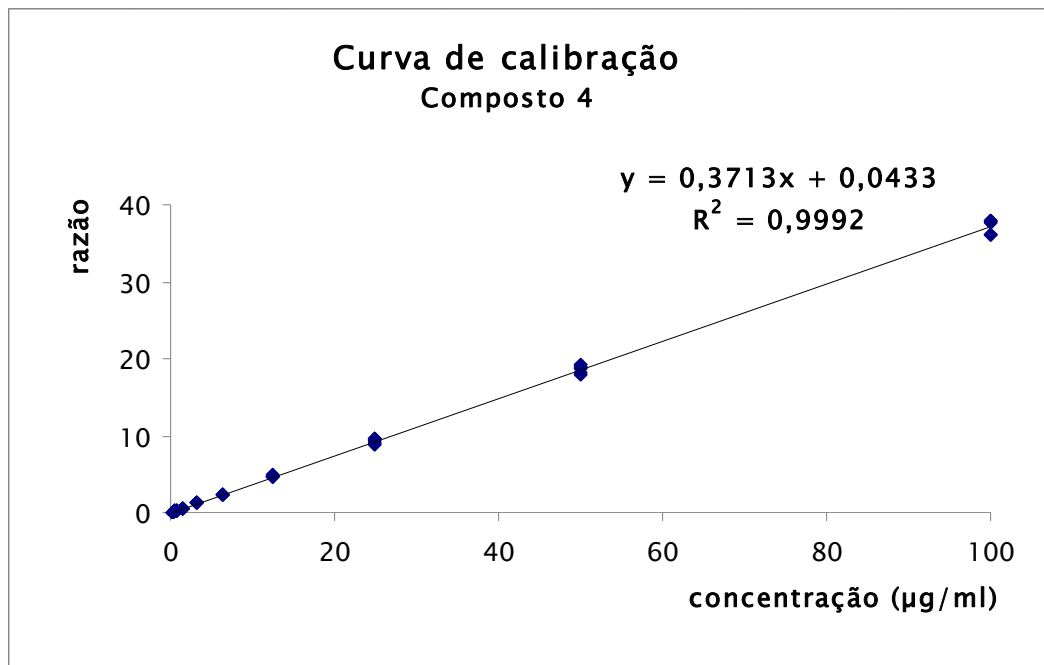


Gráfico 4: Curva de calibração do composto 4 (razão da área do composto 1 pela área do padrão interno à 20 µg/mL)

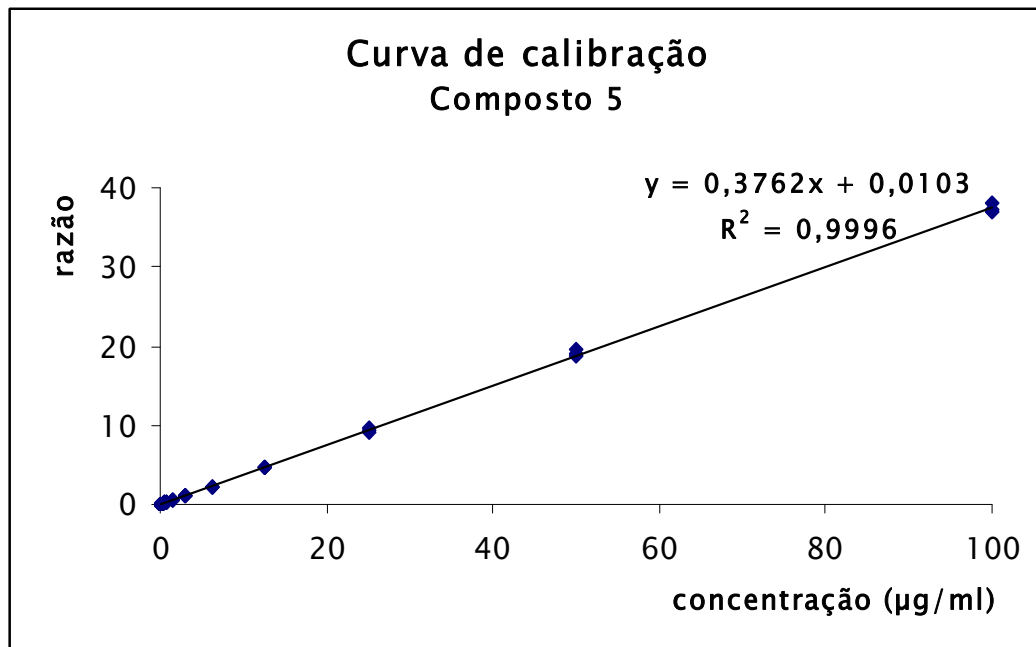


Gráfico 5: Curva de calibração do composto 5 (razão da área do composto 1 pela área do padrão interno à 20 µg/mL)

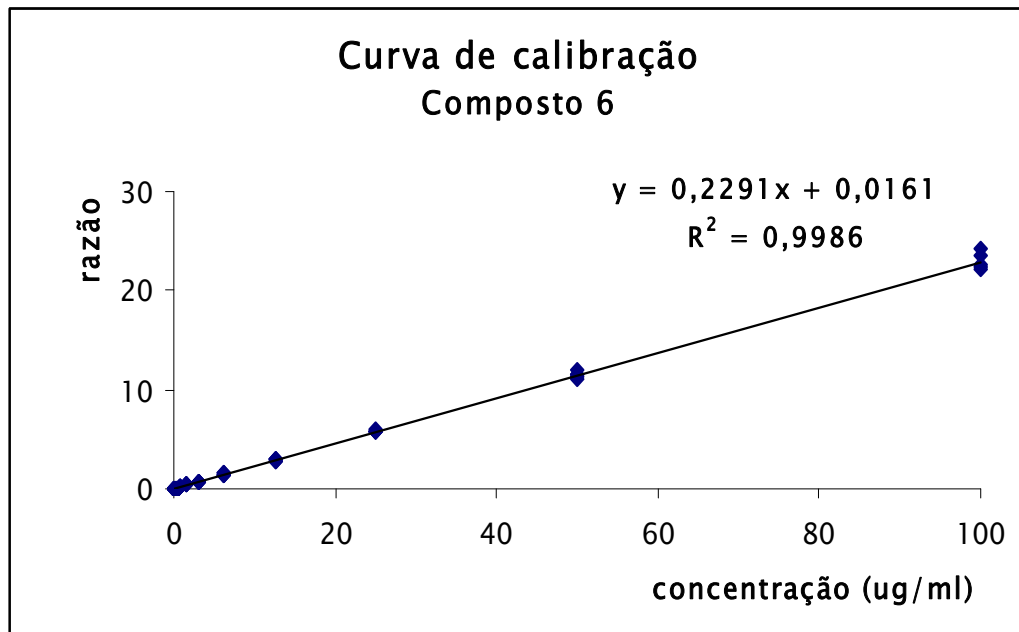


Gráfico 6: Curva de calibração do composto 6 (razão da área do composto 1 pela área do padrão interno à 20 µg/mL)

Os limites de detecção encontrados foram de 19 ng/mL para o composto 1, 20 ng/mL para o composto 4, 50 ng/mL para o composto 5 e 30 ng/mL para o composto 6 . Os limites de quantificação foram de 65 ng/mL para o composto 1, 70 ng/mL para o composto 4, 160 ng/mL para o composto 5 e 110 ng/mL para o composto 6.

Após o preparo das curvas de calibração, os compostos foram misturados ao plasma ou à urina e recuperados por extração sólido-líquido com os cartuchos SPE. As soluções eluídas foram injetadas no HPLC para avaliar o rendimento dos compostos nas matrizes biológicas (Tabela 7).

Tabela 7: Rendimento dos compostos 1, 4, 5 e 6 em plasma e urina

Composto	Concentração (µg/mL)	Rendimento %	
		Plasma	Urina
1	0,3906	86	81
	12,5	99	91
	100	98	91
4	0,1953	99	92
	12,5	98	89
	100	94	90
5	0,1953	94	94
	12,5	95	94
	100	92	94
6	0,1953	99	66
	12,5	99	99
	100	92	95

Os controles negativos – plasma ou urina de ratos saudáveis que não receberam tratamento – também foram submetidos à extração e injetados em HPLC. As matrizes biológicas usadas como controle negativo demonstraram que não havia formação de picos nos tempos de retenção dos compostos 1, 4, 5, 6 ou do padrão interno (Figuras 35 e 36).

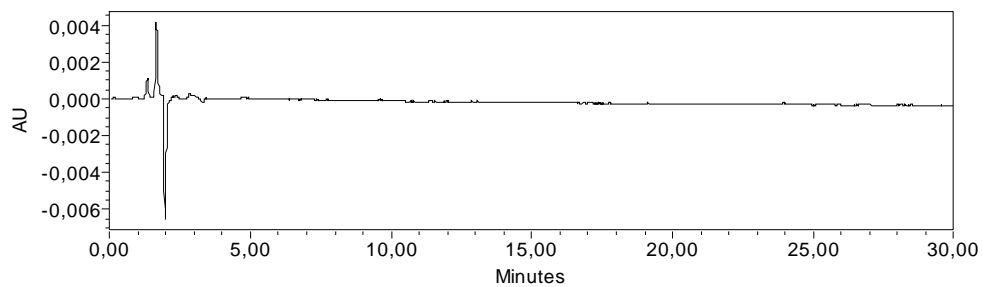


Figura 35: Cromatograma do controle negativo de plasma à 233 nm.

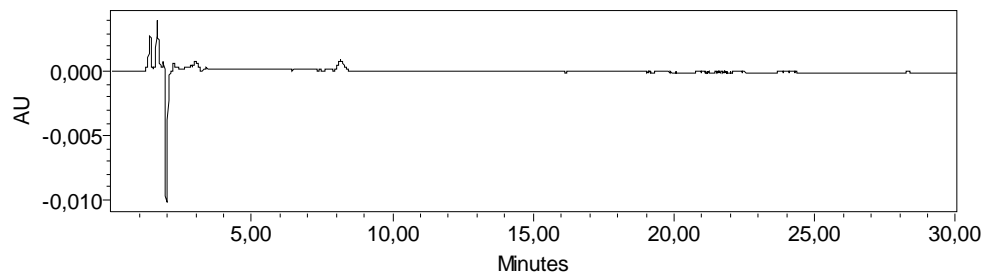


Figura 36: Cromatograma do controle negativo de urina à 233 nm.

Depois de obter as condições ideais de cromatografia, preparar as curvas de calibração e verificar os rendimentos dos compostos nas matrizes biológicas, o estudo farmacocinético foi iniciado.

Na primeira parte do estudo, o composto 1 foi administrado por via endovenosa através do cateter inserido na carótida dos animais. A carótida foi escolhida no lugar da jugular para não haver risco de colapamento. Nesta parte, um total de nove ratos machos Wistar foram cateterizados (um animal por dia). Os dois primeiros animais do estudo apresentaram valores de concentração plasmática distorcidos no primeiro tempo de coleta (5 min). Os valores eram muito mais altos do que os esperados. Após a análise destes resultados, concluiu-se que a injeção de 0,1 mL de soro fisiológico no cateter não estava sendo suficiente para lavagem do composto administrado. Então, a partir do terceiro animal, o volume de lavagem foi de 0,3 mL e o soro fisiológico foi substituído por glicose à 5% devido à sua viscosidade.

Dois animais tiveram perfuração da carótida e foram sacrificados. Em um animal, o cateter ficou obstruído logo após a administração do composto e não foi possível realizar as coletas. Finalmente, quatro animais apresentaram resultados homogêneos de concentrações plasmáticas do composto 1.

Os cromatogramas abaixo referem-se a injeção do plasma do rato identificado como número 4 antes da administração do composto 1 (Figura 37) e do plasma do mesmo animal coletado 5 min após a administração do composto 1 (Figura 38).

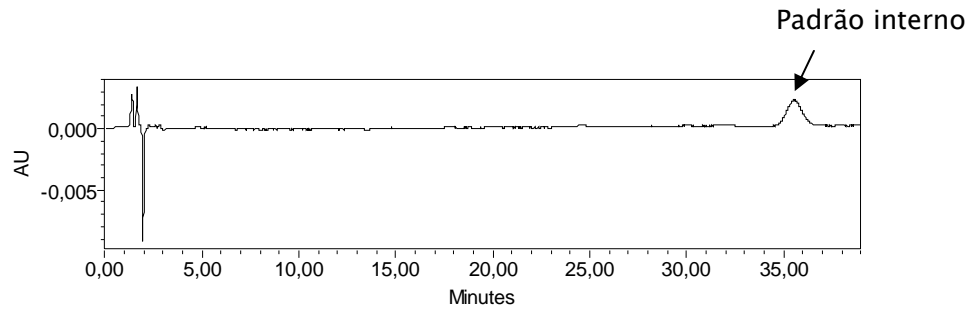


Figura 37: Cromatograma de plasma do rato identificado como número 4 antes da administração do composto 1 (controle) com o pico do padrão interno. Leitura à 233 nm.

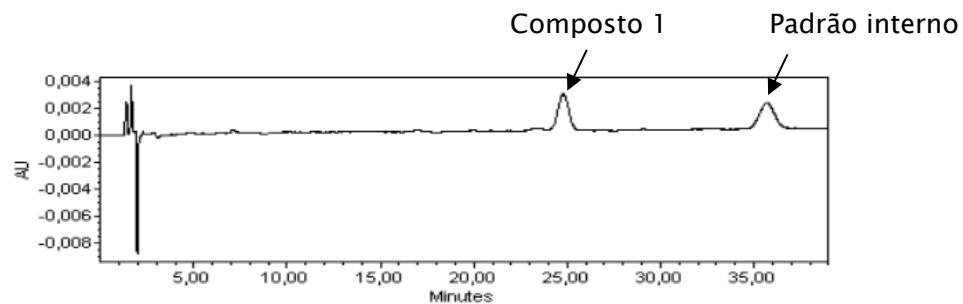


Figura 38: Cromatograma de plasma do rato identificado como número 4, 5 minutos após a administração do composto 1 com os picos do composto 1 e do padrão interno. Leitura à 233 nm.

Então, as áreas dos picos do composto 1 em cada cromatograma foram divididas pela área do pico do padrão interno à 20 µg/mL para obter o perfil plasmático médio (Gráfico 7). O peso dos animais foi de $411,3 \pm 4,99$ g.

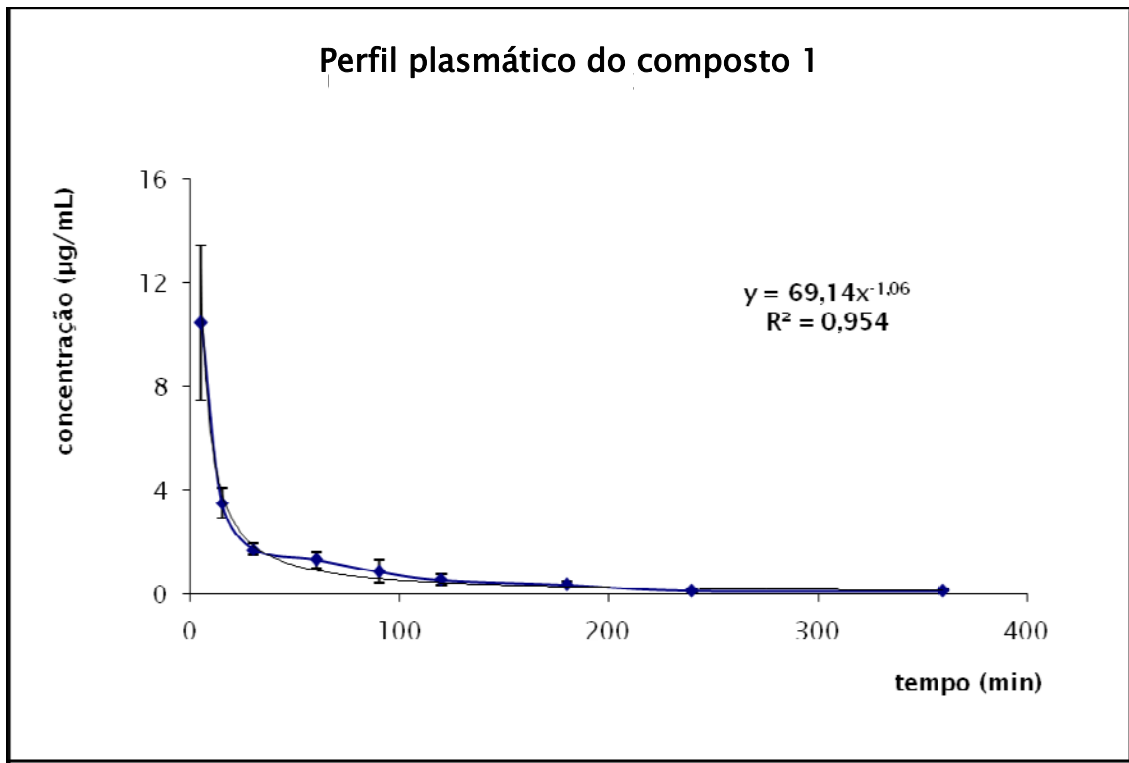


Gráfico 7: Perfil plasmático médio (n = 4) após administração intravenosa do composto 1

Os perfis individuais permitiram a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos médios por abordagem não-compartimental apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos em modelo não-compartimental do composto 1 administrado por via intravenosa.

Parâmetro	Valor estimado
Ke	0,013 l/min
meia-vida	53,1 min
Cmax	3,5 µg/mL
ASC _{0-∞}	165,4 µg/mL/min
ASC _{extrapolada}	5,09 %
CL	18,1 mL/min
Vdss	1.200,7 mL

Ke = constante de velocidade de eliminação; Cmax = concentração máxima; ASC_{0-∞} = área sobre a curva; ASC_{extrapolada} = área sobre a curva extrapolada; CL = clearance; Vd_{ss} = volume de distribuição no estado de equilíbrio dinâmico

Os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem compartimental empregando modelo aberto de 2 compartimentos aos dados plasmáticos resultantes da administração intravenosa do composto 1 estão apresentados abaixo (Tabela 9).

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos em modelo bi-compartimental do composto 1 administrado por via intravenosa.

Parâmetro	Valor estimado
ASC _{0-∞}	161,1 min.µg/mL
T _{1/2} α	4,6 min
T _{1/2} β	58,7 min
Cmax	5,6 µg/mL
CL	18,6 mL/min
Vd _{ss}	1.331,3 mL

ASC_{0-∞} = área sobre a curva; T_{1/2} α = meia-vida de distribuição; T_{1/2} β = meia-vida de eliminação; Cmax = concentração máxima; CL = clearance; Vd_{ss} = volume de distribuição no estado de equilíbrio dinâmico; DP = desvio padrão

O Gráfico 8 mostra o perfil de concentração plasmática do composto 1 após administração intravenosa a ratos (n = 4) em modelo de dois compartimentos. O perfil demonstra o rápido declínio da concentração plasmática do composto 1 de modo biexponencial. O coeficiente de correlação foi de 0,998 e o valor de AIC foi de -4,83423.

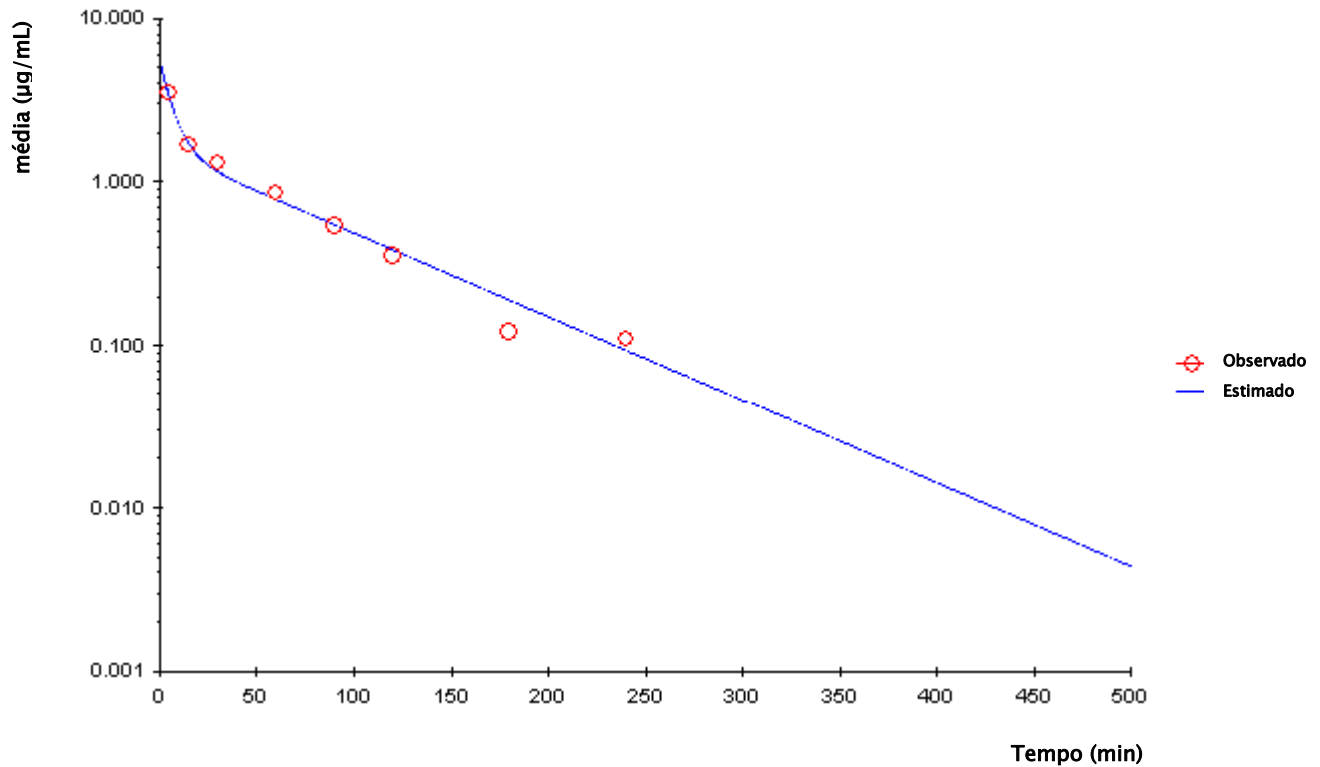


Gráfico 8: Perfil de concentração plasmática do composto 1 após administração intravenosa a ratos ($n = 4$) em modelo de dois compartimentos.

5. DISCUSSÃO

5.1. AÇÃO *IN VITRO* DAS QUINOLEÍNAS SOBRE *LEISHMANIA DONOVANI*

Neste estudo, quatro cepas diferentes de *Leishmania donovani* foram testadas, duas cepas selvagens e duas cepas resistentes. As cepas selvagens são oriundas de pacientes da Etiópia e da Índia. As cepas resistentes foram geradas à partir da pressão medicamentosa crescente nas cepas selvagens. Este

é o primeiro estudo que avalia a atividade *in vitro* das quinoleínas substituídas na posição 2 sobre cepas resistentes.

Os compostos 2 e 3 apresentaram valores de CI_{50} bem parecidos sobre todas as cepas. Estes compostos foram mais ativos que a sitamaquina, uma 8-aminoquinoleína, tanto sobre as cepas selvagens quanto nas resistentes; e ainda apresentaram boa atividade sobre a cepa resistente à miltefosina.

Estes resultados indicam que o mecanismo de ação das quinoleínas substituídas na posição 2 é diferente do mecanismo das quinoleínas substituídas na posição 8, como a sitamaquina. O modo de ação dos compostos 1 a 3 ainda não é conhecido mas já existem algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação da sitamaquina. Recentemente, foi demonstrado que a interação eletrostática da molécula carregada positivamente com os grupos polares negativos é um pré-requisito para a interação subsequente do anel aromático da sitamaquina e os fosfolipídeos da membrana plasmática do parasito, levando à inserção do fármaco na monocamada lipídica (Dueñas-Romero *et al.*, 2007). A sitamaquina também foi capaz de induzir o colapso do potencial de membrana da mitocôndria em formas promastigotas de *L. donovani* (Vercesi & Docampo, 1992).

A semelhança na atividade inibitória dos compostos 2 e 3 sobre todas as cepas pode estar relacionada à presença de uma dupla ligação na posição α - β

da cadeia de três carbonos ligada ao carbono de posição 2 do anel quinoléico (Fakhfakh *et al.*, 2003). Desrivot *et al.* (2007c) sugeriram que a habilidade do composto 3 de reagir com os grupamentos tiol poderia ser uma de suas vias de ação. A glutatona e a tripanotona são dois compostos de baixo peso molecular que apresentam um grupo tiol e participam da homeostase em cinetoplastídeos (Krauth-Siegel & Comini, 2008). Assim, a reação do composto 3 com os grupos tiol de moléculas como a glutatona e a tripanotona enfraqueceriam as defesas contra o stress oxidativo no parasito.

Testes anteriores já haviam demonstrado que o composto 1 apresentava uma fraca atividade *in vitro* com $CI_{50} > 300 \mu M$ sobre promastigotas de *L. donovani* e sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* (Desrivot *et al.*, 2007c). Neste trabalho, a atividade inibitória do composto 1 sobre todas as cepas também foi baixa se comparada aos compostos 2 e 3 ou aos medicamentos de referência. Entretanto, mesmo demonstrando fraca atividade leishmanicida *in vitro*, o composto 1 já demonstrou ótima atividade *in vivo* em modelos experimentais de LC (Fournet *et al.*, 1993a) e LV (Nakayama *et al.*, 2005), isto sugere que a molécula pode ser uma pró-droga.

Se a hipótese da pró-droga for correta, provavelmente a atividade *in vivo* do composto 1 estaria relacionada aos seus metabólitos. Os compostos 4, 5 e 6 são metabólitos hidroxilados majoritários do composto 1 de fase I que foram identificados em estudos prévios de biodisponibilidade *in vitro* (Belliard *et al.*,

2003a; Desrivot *et al.*, 2007a). Estes metabólitos foram testados *in vitro* no estudo de Fakhfakh *et al.* (2003) sobre amastigotas de *L. amazonensis* com $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (composto 4), $134 \mu\text{g/mL}$ (composto 5) e $67 \mu\text{g/mL}$ (composto 6) e sobre amastigotas de *L. infantum* com CI_{50} de $16 \mu\text{g/mL}$ (composto 4).

Neste trabalho, os metabólitos foram testados sobre formas promastigotas da cepa selvagem LV9 com CI_{50} de $129,2 \mu\text{g/mL}$ (composto 4), $344,0 \mu\text{g/mL}$ (composto 5) e $250,8 \mu\text{g/mL}$ (composto 6) e sobre a cepa resistente HePC-R com $CI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. Observando todos estes resultados, de modo geral, as atividades dos metabólitos *in vitro* também foram baixas, portanto, ainda não é possível prever qual ou quais metabólitos seriam responsáveis pela ação *in vivo*.

5.2. INTERAÇÃO *IN VITRO* DO COMPOSTO 1 COM OS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA E COM OS COMPOSTOS 2 E 3 SOBRE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA DONOVANI*

O uso de terapias combinadas já é o tratamento padrão em algumas infecções virais, bacterianas e parasitárias. A associação de medicamentos tem por objetivo retardar ou prevenir a emergência de casos resistentes, melhorar a eficácia ou ainda reduzir o tempo de tratamento (Seifert & Croft, 2006).

O uso de imiquimod em associação com os antimoniais para o tratamento da forma cutânea da doença (Miranda–Verastegui 2006) é um exemplo de como as terapias combinadas podem ser benéficas no tratamento da leishmaniose, acelerando o processo de cura e melhorando a qualidade na cicatrização das lesões.

Os medicamentos usados em terapias combinadas devem ter efeitos aditivos ou sinérgicos (Jha, 2006). Neste trabalho de tese, as associações mostraram um efeito aditivo simples, o que quer dizer que não há antagonismo ou sinergismo *in vitro* entre estes compostos. Os resultados encontrados precisam ser confirmados por estudos *in vivo*, já que as associações podem apresentar efeito diferenciado em animais (Seifert & Croft, 2006).

Como exemplo desta diferença, cita-se o estudo realizado por Seifert & Croft (2006) onde foram testadas várias associações *in vitro* e *in vivo* da miltefosina com outros medicamentos de referência, anfotericina B, estibogluconato de sódio, paromomicina e sitamaquina. Os autores utilizaram a mesma metodologia de nosso estudo para classificar as associações. Os resultados mostraram que os efeitos foram indiferentes para todas as associações testadas *in vitro*. Entretanto, quando as combinações foram administradas aos animais, os resultados apresentados foram bem diferentes, com potencialização da atividade da miltefosina associada à anfotericina B e paromomicina.

Um dos fatores que leva à resistência à miltefosina em células tumorais é a superexpressão da P-gp (Seifert *et al.*, 2003). Belliard *et al.* (2003b) demonstraram que o composto 1 exerce um efeito inibitório na atividade de efluxo da P-gp em íleo de rato e linhagem celular intestinal humana. Devido ao nitrogênio existente no anel quinoléico, à sua estrutura planar e à sua lipofilia, as quinoleínas são substratos da P-gp. Os derivados de quinoleínas já demonstraram a capacidade de reverter a resistência aos agentes antitumorais *in vitro* e *in vivo*. Portanto, o composto 1 poderia aumentar a eficácia do tratamento da leishmaniose, melhorando a biodisponibilidade dos medicamentos e/ou diminuindo o tempo de tratamento (Belliard *et al.*, 2003b)

5.3. ESTABILIDADE QUÍMICA

Neste estudo, dois aspectos principais foram levados em consideração: a concentração dos compostos 1, 2 e 3 e o perfil cromatográfico nas diferentes soluções e condições de temperatura e luminosidade.

O composto 1 demonstrou melhor estabilidade química em todas as condições avaliadas. Em seus cromatogramas, não houve aparecimento de novos picos ou alterações no pico do composto. A diminuição da concentração do composto em PBS e CMC/tween pode estar relacionada ao problema de solubilidade devido à sua alta lipofilicidade em pH fisiológico ($\log P = 3,19 \pm 0,16$ em pH 7,4) (Desrivot *et al.*, 2007c). Entretanto, todas as soluções

apresentavam aspectos homogêneos no primeiro dia do estudo e os cromatogramas eram similares. Além disso, a análise macroscópica ao longo do estudo não detectou a presença de precipitados nos tubos. Outro fator que pode estar envolvido com a redução de sua concentração em algumas amostras é a volatilidade deste composto em sua forma molecular.

A manutenção de uma concentração estável do composto 1 em solução ácida (ácido canfosulfônico pH 2) também corrobora com a hipótese de que a solubilidade do composto está associada à sua lipofilicidade. O pKa aparente deste composto é de aproximadamente 3,5, portanto, sua molécula se encontra na forma ionizada (polar) quando dissolvida em pH 2 ($\log P = -0,56 \pm 0,05$) (Desrivot, 2007e), favorecendo sua boa dissolução em meio aquoso.

O composto 1 também foi estável por um período de 6 meses em solução de etanol mantida à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no estudo de Iglarz *et al.* (1998) e em solução de metanol estocada à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 meses no estudo de Desrivot *et al.* (2007c). Este composto é o único, entre os compostos testados, de origem natural, além disso, ele apresenta uma cadeia saturada que poderia favorecer sua estabilidade química.

O composto 2 foi o composto mais instável com diferenças marcantes entre os cromatogramas iniciais e finais do estudo. Na observação macroscópica, as soluções do composto 2 em PBS pH 7, ácido canfosulfônico

pH 2 e CMC/tween 80 apresentaram precipitados em forma de gotículas pretas nas paredes dos tubos a partir do 2º dia de estudo. Todos os cromatogramas apresentaram algum tipo de variação. Houve união ou formação de novos picos, indicando a geração de produtos de degradação ou ainda a diminuição da altura do pico, representando uma redução na concentração do composto na solução.

O composto 3 foi o segundo composto mais estável, ele apresentou produtos de degradação em algumas condições mas se manteve estável em outras. O solvente que apresentou maiores problemas foi o DMSO onde houve formação de novos picos nas 3 condições testadas. Isto significa que não se deve manter um estoque de solução-mãe com o composto 3 neste solvente. O composto também demonstrou formação de produtos de degradação quando dissolvido em metanol e CMC/tween e estocado em temperatura ambiente. Em PBS e pH 2, só houve formação de novos produtos quando os tubos foram submetidos à influência da luz.

O frasco do composto 3 em PBS que estava submetido à temperatura ambiente no escuro quebrou no terceiro dia de experimento, mas os dados obtidos com os tubos à 4°C e sob influência da luz podem dar uma idéia dos resultados deste vial. À 4°C não houve diferença no cromatograma nem na concentração do composto e, sob influência da luz, houve a formação de um produto e um pequeno decréscimo na concentração do composto em solução.

A análise do comportamento dos compostos em vários solventes e condições de luminosidade e temperatura mostrou que o composto 1 é a molécula mais estável.

5.4. TOXICIDADE AGUDA

Avaliações preliminares de toxicologia das quinoleínas administradas à camundongos Balb/c mostraram que estas substâncias têm índices terapêuticos razoáveis, com uma DL₅₀ aguda intraperitoneal maior que 400 mg/kg (Fournet *et al.*, 1993a).

No estudo de Nakayama *et al.* (2005), não houve sinais de toxicidade ao longo do experimento após administração diária dos compostos durante os 10 ou 15 dias de tratamento nos estudos de modelos experimentais de LC e LV. Entretanto, as doses utilizadas nos estudos foram de 12,5 e 25 mg/kg e se tratavam apenas de observações do comportamento dos animais ao longo do experimento.

O composto 1 já havia sido testado até a dose de 100 mg/kg no estudo de Fournet *et al.* (1993a) por 14 dias e não demonstrou efeitos aparentes de toxicidade em camundongos tais como perda de peso ou de pêlos. Os compostos 2 e 3 não tinham estudos prévios de toxicidade, apenas observações dos animais durante o experimento de Nakayama *et al.* (2005) até a dose de 25

mg/kg. De qualquer modo, nenhum destes experimentos havia utilizado doses de 1000 mg/kg nem realizado análises bioquímicas.

Neste trabalho, os compostos 1 e 2 foram administrados nas doses de 1000, 100 e 10 mg/kg e seus efeitos agudos foram observados ao longo de 14 dias. O experimento mostrou sinais transientes sobre o comportamento dos animais nas doses mais elevadas. Os demais grupos não apresentaram sinais de toxicidade. Também não houve diferença estatística significativa nos resultados das análises bioquímicas entre os grupos tratados com os compostos 1 e 2 e o grupo controle. Nenhum animal morreu ao longo do experimento.

Os estudos com o composto 3 foram temporariamente suspensos devido aos resultados encontrados por Desrivot *et al.* (2007c). Durante o desenvolvimento de um método de extração sólido-líquido para o estudo farmacocinético das quinoleínas, os autores observaram que o composto 3 se fixava de modo irreversível aos eritrócitos mediante a ligação covalente à função tiol das proteínas (Desrivot, 2007c).

As interações covalentes entre as proteínas biológicas e os xenobióticos podem estar relacionadas ao aparecimento de toxicidade. O paracetamol é exemplo do que pode acontecer quando um medicamento reage fortemente com a porção sulfidril das proteínas do organismo. Seu princípio ativo, o acetaminofeno, é metabolizado em um metabólito reativo, a N-acetil-p-benzoquinoneimina pelas enzimas do citocromo P450. Uma vez formado, este

metabólito se conjuga e depleta os níveis de glutatona celular e depois se liga extensivamente aos grupos tiol das proteínas celulares. Este mecanismo está associado à hepatotoxicidade do medicamento (Timerstein, 1990).

Por um lado, a rápida ligação do composto 3 aos eritrócitos leva à diminuição de sua fração livre no plasma, o que poderia ter conseqüências *in vivo* já que somente a fração livre no sangue pode atingir os parasitos dentro das células hospedeiras. Por outro lado, os modelos experimentais com camundongos Balb/c mostraram uma boa ação do composto 3 (Nakayama *et al.*, 2005), sem sinais de toxicidade ao longo do tratamento, sugerindo que os eritrócitos poderiam exercer alguma função de transporte do princípio ativo ao local de ação. Os eritrócitos carregados seriam destruídos pelos macrófagos no fígado, no baço e na medula óssea (Beaumont & Canonne-Hergaux, 2005), liberando os compostos em órgãos-alvo onde se encontram formas amastigotas do parasito (Hamidi *et al.*, 2007).

Para elucidar se a ligação do composto 3 aos eritrócitos é prejudicial ao organismo, será preciso realizar estudos de toxicidade *in vivo* mais detalhados que identifiquem a formação dos adutos quinoleína-proteína e avaliem as conseqüências desta formação no organismo.

Ao contrário do que acontece com as quinoleínas de cadeia insaturada, o composto 1 não demonstrou afinidade pelos eritrócitos, nem aos grupamentos

tiol das proteínas. Esta molécula se liga aos componentes plasmáticos com baixa afinidade mas não se liga aos componentes sanguíneos. Portanto, seu mecanismo de transporte deve ser diferente dos compostos 2 e 3 (Desrivot *et al.*, 2007c).

5.5. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SAL CANFOSULFÔNICO DO COMPOSTO 1

Para permitir o desenvolvimento, além dos quesitos segurança e eficácia, a molécula deve ter qualidades físicas e físico-químicas que permitam a produção de uma formulação em condições satisfatórias, tais como, facilidade de manipulação, estabilidade e resistência às condições de estocagem.

Por razões econômicas, é desejável que os países endêmicos, maiores consumidores destes compostos, possam produzir os medicamentos destinados ao tratamento das doenças parasitárias. Assim, é preciso que as moléculas conservem todas as qualidades requeridas para a fabricação industrial, estocagem e distribuição nos países visados quando submetidas à condições climáticas adversas.

As formulações sólidas, como os comprimidos e as cápsulas, conferem melhor estabilidade aos princípios ativos, melhor condição de conservação e maior facilidade de utilização que as formulações líquidas, particularmente nos países tropicais. Mas a produção destas formas sólidas demanda algumas

propriedades dos princípios ativos e algumas quinoleínas com boa atividade biológica para o tratamento da leishmaniose (Nakayama *et al.*, 2005) apresentavam a inconveniência de serem pouco manipuláveis para a formulação de sólidos orais. Os compostos 1 e 2 estão incluídos nesta lista. O primeiro é uma base oleosa volátil (Iglarz *et al.*, 1998) e o segundo uma base amorfa.

A solução encontrada foi o desenvolvimento de formas salinas cristalinas que permitissem a formulação de sólidos orais em condições satisfatórias. Vários ácidos foram testados com cada um dos compostos e o ácido canfosulfônico foi o que apresentou melhores resultados na formação do sal do composto 1. Não foi possível sintetizar nenhum sal cristalino com o composto 2 e talvez isto esteja relacionado à instabilidade química desta molécula.

A caracterização por microscopia óptica e difração de raios X mostrou que o sal sintetizado apresenta forma cristalina que pode ser utilizada para o preparo de comprimidos e que também é adequada para o preparo de uma suspensão para administração oral. O procedimento de preparo do sal foi patenteado em colaboração com o IRD (Anexo 4).

Os resultados dos estudos de estabilidade química e toxicidade aguda indicaram que o composto 1 é uma molécula estável e aparentemente segura. E, diferente do que aconteceu com o composto 2, foi possível desenvolver um

protocolo de síntese de um sal cristalino com as características desejadas. Por estas razões, o desenvolvimento do composto 1 foi priorizado.

5.7. ESTUDO FARMACOCINÉTICO

Este é o primeiro estudo que avalia a biodisponibilidade do composto 1 por via intravenosa. A farmacocinética deste composto já havia sido estudada por via oral em camundongos CD-1 (Iglarz *et al.*, 1998). Os autores analisaram as concentrações do composto no plasma e no fígado dos animais e encontraram uma meia-vida de eliminação de 100 min. Os metabólitos do composto 1 não foram objetos do estudo de Iglarz *et al.* (1998).

Outro estudo de biodisponibilidade *in vitro* com o composto 1 mostrou meia-vida de 8,5 min com microssomas de fígado de rato e meia-vida de 6,8 min com microssomas de fígado humano (Desrivot *et al.*, 2007a).

Os metabólitos hidroxilados foram identificados pela primeira vez nos experimentos *in vitro* de Belliard *et al.* (2003a) (compostos 4 e 6) e depois por Desrivot *et al.* (2007a) (compostos 4, 5 e 6). Porém, estes compostos nunca foram estudados *in vivo*. Assim, um dos objetivos deste ensaio farmacocinético também foi identificar os metabólitos hidroxilados do composto 1 no organismo dos animais.

O primeiro passo para a realização do estudo farmacocinético foi a escolha da coluna e das condições cromatográficas com os compostos 1, 4, 5 e 6. Os testes foram realizados com soluções preparadas com os compostos puros, isolados ou misturados, dissolvidos em metanol. Três colunas foram testadas: Atlantis Waters dC18 3 μ M 3,0 x 150 mm; Symmetry Shield RP18 3,5 μ m 4,6 x 150 mm e Sunfire™ C₁₈ 5 μ m 150 x 4,6 mm.

A coluna Atlantis é uma coluna de fase reversa que permite uma boa retenção dos compostos polares sem retenção excessiva dos compostos não polares. Esta coluna seria uma boa candidata pois os compostos apresentaram os tempos de retenção de 4,8 min para o composto 6; 4,9 min para o composto 5; 6,4 min para o composto 4; 11,2 min para o composto 1 e 9,1 min para o padrão interno em fluxo de 0,3 mL/min em fase isocrática que consistiu na mistura de tampão acetato 10⁻² M pH 4,0 e metanol (40:60, v/v). Porém, ela apresentou problemas estruturais que a impediram de ser utilizada no estudo.

A coluna Symmetry Shield RP18 3,5 μ m 4,6 x 150 mm já havia sido utilizada no estudo de estabilidade química com os compostos 1, 2 e 3, todos de caráter apolar. Entretanto, quando testada para o estudo farmacocinético com a fase móvel isocrática que consistiu na mistura de tampão acetato 10⁻² M pH 4.0 e metanol (60:40, v/v), os compostos 4, 5 e 6 que são os metabólitos hidroxilados do composto 1, não foram retidos de forma satisfatória. Na tentativa de aumentar a retenção dos metabólitos, diversos gradientes foram

testados. Porém, a utilização de um gradiente apresenta desvantagens em relação ao uso de uma fase móvel isocrática. A fase móvel é mais simples, mais barata e os tempos de retenção são mais fáceis de reproduzir. O gradiente seria a última alternativa em caso de má resolução dos picos. Então, optou-se por testar outra coluna C18.

O primeiro teste realizado com a coluna Sunfire foi com a fase móvel isocrática que consistiu na mistura de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (40:60, v/v). Nesta fase móvel, os compostos 5 e 6 foram eluídos com tempos de retenção muito próximos, resultando na sobreposição dos picos. Então, diferentes proporções de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol foram testadas até a proporção ideal de 60:40 (v/v) que foi capaz de separar os picos dos compostos beta e gama hidroxilados (compostos 5 e 6).

Outros autores também tiveram problemas de separação com os compostos 5 e 6. Belliard *et al.* (2003a) não conseguiram identificar o composto 5 em fase móvel isocrática que consistiu na mistura de 45% de metanol e 65% de tampão pH 5,5. Provavelmente, o sistema cromatográfico escolhido não permitiu uma boa resolução entre os compostos 5 e 6.

Desrivot *et al.* (2007), testaram a mesma coluna Sunfire com a fase móvel isocrática que consistiu na mistura de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (40:60, v/v) e também não conseguiram uma separação satisfatória dos picos

dos compostos beta e gama hidroxilados. A solução encontrada foi o desenvolvimento de um gradiente de separação com tampão fosfato pH 5,2 e acetonitrila.

Neste trabalho de tese, foi possível obter uma boa resolução dos compostos 5 e 6 com a coluna Sunfire e a fase móvel isocrática que consistiu na mistura de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v). Provavelmente, Desrivot *et al.* (2007b) optaram pelo desenvolvimento do gradiente sem antes testar diferentes proporções dos solventes em fase móvel isocrática.

A próxima etapa para a validação da metodologia foram os testes com os cartuchos de extração sólido-líquido (SPE). Desrivot *et al.* (2007b) validaram esta técnica de separação para o composto 1 com ótimos resultados. O mesmo não foi observado para o composto 3 que se liga de forma irreversível aos eritrócitos e portanto, não pode ser recuperado. A metodologia de extração foi desenvolvida apenas para análise de plasma, os autores não testaram o método para quantificação na urina. Portanto, este trabalho de tese mostrou que a metodologia de extração sólido-líquido também é adequada para recuperação do composto 1 a partir da urina de ratos.

A etapa final do método de extração consistiu na eluição da amostra com 500 μ L de metanol. O procedimento foi feito com o auxílio do vácuo e isso

resultou na evaporação do solvente. Para corrigir a alteração na concentração dos compostos, a curva de concentração plasmática foi feita a partir da razão entre as áreas dos compostos e a área do padrão interno à 20 µg/mL.

Os valores dos limites de detecção e quantificação do composto 1 entre 19 e 65 ng/mL foram próximos aos encontrados por Desrivot *et al.* (2007b).

Após completar a validação da metodologia, que consistiu nas etapas de seleção das condições de cromatografia, preparação das curvas de calibração lineares e verificação do rendimento nas matrizes biológicas, o estudo farmacocinético foi iniciado.

A análise farmacocinética de perfis plasmáticos tem como pré-requisito a realização de coletas de amostras por um tempo que corresponda a, pelo menos, 80% da $ASC_{0-\infty}$ calculada com base nesse perfil. Para garantir que tal requisito fosse cumprido, foram realizadas coletas por até 240 minutos após a administração do derivado propil assegurando a confiabilidade no cálculo dos parâmetros, especialmente aqueles relacionados à fase de eliminação das substâncias. Como se determinou um tempo de meia-vida de aproximadamente 1h, as coletas corresponderam a pelo menos três tempos de meia-vida e a $ASC_{extrapolada}$ foi de aproximadamente 5%, assegurando o cumprimento do critério.

Os resultados obtidos após administração intravenosa mostraram um decaimento biexponencial ou em 2 etapas. Outras substâncias que possuem o anel quinoléico em sua estrutura (análogos de cloroquina, quinina e quinidina) também apresentaram perfis semelhantes (Ridley *et al.*, 1996; Brosen *et al.*, 1990; White *et al.*, 1983).

A adequabilidade ao modelo foi avaliada pelo ajuste dos perfis plasmáticos à equação do modelo bi-compartimental e pelo coeficiente de correlação calculado a partir da regressão linear. Os valores de coeficiente de correlação ficaram próximos de 0,998, indicando um ajuste adequado dos dados experimentais ao modelo e o valor de AIC mostrou-se negativo.

A comparação entre os parâmetros farmacocinéticos calculados pelas análises não-compartimental e bi-compartimental é uma ferramenta para comprovar a adequação ao modelo compartimental escolhido. Quando avaliados os parâmetros $ASC_{0-\infty}$, Vd_{ss} , Cl e $t_{1/2}$ não foram observadas grandes diferenças entre estes valores, assim, o modelo aberto de 2 compartimentos é considerado adequado para descrever os dados experimentais.

A primeira fase que corresponde à distribuição do composto 1, fixação às proteínas e aos elementos do sangue bem como à captação tecidual, apresentou meia-vida de 4,6 min. Efetivamente, no estudo de Desrivot *et al.*, (2007b) foi demonstrado que o composto 1 se liga amplamente às proteínas

plasmáticas (89,4%), principalmente à albumina. Esta ligação às proteínas está correlacionada à lipofilicidade do composto 1 em pH fisiológico. Porém, este composto parece não se ligar aos elementos sanguíneos, como os eritrócitos (Desrivot *et al.*, 2007c).

A segunda etapa, mais lenta, correspondeu à fase de eliminação do composto e teve meia-vida de 58,7 min. Este resultado difere dos valores encontrados para a quinina (11 h) (White *et al.*, 1983), quinidina (11 a 12 h) (Brosen *et al.*, 1990) e cloroquina (8 a 58 dias) (Wetsteyn *et al.*, 1995).

O volume de distribuição no estado de equilíbrio dinâmico ($V_{d_{ss}}$) do composto 1 em ratos encontrado neste trabalho de tese em modelo bi-compartimental foi de 1.331,3 mL. Este valor indica uma ampla distribuição do composto nos tecidos. A cloroquina também possui um volume de distribuição aparente excepcionalmente grande devido às altas concentrações em órgãos e tecidos, em particular nos leucócitos. Este volume excede a concentração do fármaco encontrada no plasma (Labro & Babin-Chevaye, 1988).

O clearance do composto 1 encontrado neste trabalho foi de 18,63 mL/min/kg. Estudos com outras quinoleínas demonstram diferenças consideráveis no clearance. A quinina demonstrou um baixo clearance médio de 1,92 mL/min/kg (White *et al.*, 1983), ao passo que os análogos da cloroquina

apresentaram valores elevados com variações significativas, de 27 a 69 mL/min/kg (Ridley 1996).

A meia-vida após administração oral (100 min) encontrada no estudo de Iglarz *et al.* (1998) parece ser um pouco maior do que a meia-vida IV encontrada neste trabalho, embora ainda seja pequena. O composto mostrou ainda boa distribuição hepática e a curva plasmática apresentou um segundo pico 4 h após a administração oral que pode estar relacionado ao efeito de segunda passagem (Iglarz *et al.*; 1998).

Se, por um lado, uma meia-vida de eliminação longa tem sido associada ao desenvolvimento de resistência e toxicidade nos tratamentos com a miltefosina e a anfotericina B (Sundar, 2001; Croft & Coombs, 2003), por outro lado, é preciso manter concentrações mínimas do composto ativo no sangue para assegurar a eficácia do tratamento (Pukrittayakamee *et al.*, 2003; Rath *et al.*, 2003). A questão é que ainda não se sabe qual metabólito é responsável pela atividade da 2-n-propilquinoleína. Então, será preciso descobrir este composto e determinar seu limite eficaz de concentração plasmática, para então avaliar se a meia-vida do composto I encontrada é satisfatória para o tratamento.

Os metabólitos hidroxilados não apareceram nos primeiros cromatogramas. O volume inicial injetado para cada amostra era de 10 µL.

Então, o volume de injeção foi alterado para 50 μL e depois para 100 μL na tentativa de visualizar os picos dos metabólitos hidroxilados. Finalmente, um pico abaulado começou a aparecer entre os tempos de retenção do composto 5 e do composto 6, porém, sua má resolução impediu o cálculo de quantificação dos compostos. O pico do composto 4 não foi identificado nas amostras de plasma, mas parece estar presente na amostra de urina.

A segunda parte do estudo farmacocinético consistiu na administração oral do composto 1 à quatro animais. Os resultados preliminares ainda não são suficientes para o cálculo dos parâmetros de biodisponibilidade oral. Um estudo complementar será conduzido para concluir esta etapa.

Ainda há uma longa trajetória pela frente nos estudos de biodisponibilidade com as quinoleínas substituídas na posição 2. Para se ter uma idéia, mesmo após 50 anos de uso da cloroquina, uma 4-aminoquinoleína usada no tratamento da malária, sua farmacocinética permanece pouco definida.

Outros estudos de biodisponibilidade *in vivo* com o composto 1 serão necessários para identificar os metabólitos de fase I e II e melhorar o entendimento sobre o metabolismo e a ação desta quinoleína no organismo. Assim que os devidos ajustes forem feitos, a metodologia poderá ser utilizada em estudos farmacocinéticos clínicos.

6. CONCLUSÕES

O composto 1 apresenta boa atividade leishmanicida *in vivo*, baixa toxicidade, estabilidade química, facilidade de síntese e bom rendimento, ou seja, este composto atende aos critérios exigidos para produção de um medicamento. O preparo do sal canfosulfônico solucionou os problemas relacionados à solubilidade e volatilidade que o composto 1 apresentava em sua forma oleosa natural.

O conjunto de resultados deste trabalho somados ao histórico das quinoleínas substituídas na posição 2 indicam que o composto 1 é o mais promissor entre os três compostos estudados para o desenvolvimento clínico.

7. PERSPECTIVAS

Avaliar a eficácia do sal canfosulfônico do composto 1 para confirmar que não houve perda de atividade biológica *in vivo*.

Realizar estudos de mutagenicidade e toxicidade crônica para avaliar a segurança da nova formulação.

Avaliar as conseqüências da afinidade do composto 3 pelos grupos tiol das proteínas *in vivo* no que diz respeito a uma possível toxicidade.

Dar seguimento ao estudo de biodisponibilidade com o composto 1 para validar a metodologia para os ensaios clínicos.

Prosseguir com a validação do modelo experimental de leishmaniose visceral.

Dar continuidade ao estudo químico-biológico dos extratos vegetais das espécies *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae) e *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) do Banco de Extratos de Plantas do Cerrado do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (Anexo 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOS-CUENTAS, A. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1847-1851, 2001.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 143-153, 2007.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, p. 24-34, 2005.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Biochemical Journal**, v. 315, p. 631-634, 1996.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, MA.; ROBERT-GERO, M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Acta Tropica**, v. 70, p. 43-61, 1998.

BASSELIN, M.; COOMBS, G.H.; BARRETT, M.P. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, p. 37-46, 2000.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G.H.; BARRETT, M. Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 3731-3738, 2002.

BEAUMONT C, CANONNE-HERGAUX F. Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 12, p. 123, 2005.

BELLIARD, A.M.; BAUNES, B.; FAKHFAKH, M.; HOCQUEMILLER, R.; FARINOTTI, R. Determination of the human cytochrome P450s involved in the metabolism of 2-n-propylquinoline. **Xenobiotica**, v. 33, p. 341-355, 2003a.

BELLIARD, A.M.; LEROY, C.; BANIDE, H.; FARINOTTI, R.; LACOUR, B. Decrease of intestinal P-glycoprotein activity by 2n-propylquinoline, a new oral treatment for visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 103, p. 51-56, 2003b.

BHATTACHARYA, S. K.; SINHA, P.K. ; SHYAM, S. ; THAKUR, C.P. JHA, T.K. *et al.* Phase IV trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 591-598, 2007.

BILLO, M.; FOURNET, A.; CABALION, P.; WAIKEDRE, J.; BORIES, C.; LOISEAU, P.; PRINE, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; YALUFF, G.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 569-575, 2005.

BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 1221-1234, 2008.

BORIES, C.; COJEAN, S.; HUTEAU, F.; LOISEAU, P.M. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 164-167, 2008.

BROSEN, K.; DAVIDSEN F.; GRAM L.F. Quinidine kinetics after a single oral dose in relation to the sparteine oxidation polymorphism in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 248-253, 1990.

BUTLER, M.S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 22, p.162–195, 2005.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar. **Endemias /Artigos**, v. 55, p. 34–37, 2003.

CARDENAS, R.; SANDOVAL, C.M.; RODRÍGUEZ–MORALES, A.J.; FRANCO–PAREDES, C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 273–277, 2006.

CATORZE, M.G.B. Leishmaniose e SIDA. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 33. p. 237–250, 2005.

CHAN–BACAB, M.J.; PEÑA–RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 674–688, 2001.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873–82, 2007.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug Discovery From Natural Sources. **AAPS Journal**; v. 8, p. E239–E253, article 28, 2006 (<http://www.aapsj.org>).

CROFT, S.L. & COOMBS, G.H. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502–508, 2003.

CROFT, S.L. ; BARRETT, M.P.; URBINA, J.A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.21, p. 508–512, 2005.

- CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399–410, 2006.
- CUNNINGHAM, M.L.; ZVELEBIL, M.J.J.M.; FAIRLAMB, A.H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, p. 285–295, 1994.
- DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, v. 326, p. 377–382, 2003.
- DELGADO J, MACIAS J, PINEDA JA, CORZO, J.E.; GONZALEZ–MORENO, M.P.; DE LA ROSA, R.; SANCHEZ–QUIJANO, A.; LEAL, M.; LISSEN, E. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1–infected patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 766–769, 1999.
- DELORENZI, C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, A.T.; BOU–HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M.B. Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1349–1354, 2001.
- DE MESQUITA, M.L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J.E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 783–787, 2005.
- DE PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.; SAMPAIO, R.N.R. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N–methyl–glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365–371, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DESRIVOT, J.; EDLUND, P.; SVENSSON, R.; BARANCZEWSKI, P.; FOURNET, A.; FIGADÈRE, B.; HERRENKNECHT, C. Metabolism of 2-substituted quinolines with antileishmanial activity studied *in vitro* with liver microsomes, hepatocytes and recombinantly expressed enzymes analyzed by LC/MS. **Toxicology**, v. 235, p. 27–38, 2007a.

DESRIVOT, J.; MOUSSA, F.; CHAMPY, P.; FOURNET, A.; FIGADÈRE, B.; HERRENKNECHT, C. Development of a SPE/HPLC/DAD method for the determination of antileishmanial 2-substituted quinolines and metabolites in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 854, p. 230–238, 2007b.

DESRIVOT, J.; HERRENKNECHT, C.; PONCHEL, G.; GARBI, N.; PRINA, E.; FOURNET, A.; BORIES, C.; FIGADERE, B.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P.M. Antileishmanial 2-substituted quinolines: *in vitro* behavior towards biological components. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 61 (2007c) 441–450.

DESRIVOT, J.; WAIKEDRE, J.; CABALION, P.; HERRENKNECHT, C.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 7–12, 2007d.

DESRIVOT, J. Étude de la biodisponibilité de quinoléines antileishmaniennes. Tese de Doutorado. Université Paris Sud–XI, Châtenay–Malabry, 2007e.

DIETZE, R.; CARVALHO, S. F. G.; VALLI, L. C.; BERMAN, J.; BREWER, T.; MILHOUS, W.; SANCHEZ, J.; SCHUSTER, B.; GROGL, M. Phase 2 Trial Of Wr6026, An Orally Administered 8-Aminoquinoline, in the Treatment of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 685–689, 2001.

DUEÑAS-ROMERO AM, LOISEAU PM, SAINT-PIERRE-CHAZALET M. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 246–252, 2007.

DUJARDIN, JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 4–6, 2005.

DURET, P.; FAKHFAKH, M.A.; HERRENKNECH, C.; FOURNET, A.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R. Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 55-65, 2003.

DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. *In vitro* and *in vivo* activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1235-1242, 2008.

ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; PISANGO, M.T.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 254-259, 2007.

FAKHFAKH, M.A.; FRANCK, X.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. FIGADÈRE, B. Expedient preparation of 2-substituted quinolines. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 3847-3850, 2001a.

FAKHFAKH, M.A.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R. FIGADÈRE, B. Iron catalyzed hydrodebromination of 2-aryl-1,1-dibromo-1-alkenes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 624, p. 131-135, 2001b.

FAKHFAKH, M.A.; FOURNET, A.; PRINA, E.; MOUSCADET, J.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R.; FIGADÈRE, B. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Quinolines: Potential Treatment of Protozoal and Retroviral Co-infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 5013-5023, 2003.

FEITOSA, M.A.C.; CASTELLON, E.G. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. **Acta Amazonica**. v. 34, p. 121 - 127, 2004.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; FILHO, L.G.; PINTO, L.H.B.; DE OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial Activity of Alkaloidal

Extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99. p. 325–327, 2004.

FOKIALAKIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; TEKWANI, B.L.; SKALTSOUNIS, A.L.; DUKE, S.O. Antileishmanial Activity of Natural Diterpenes from *Cistus* sp. and Semisynthetic Derivatives Thereof. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1775–1778, 2006.

FOURNET, A. Bolivie: plantes chimanes contre leishmaniose. Disponível em: http://www.mpl.ird.fr/suds-en-ligne/fr/plantes/pdf/1G_chiman.pdf.

FOURNET, A.; VAGNEUR, B.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 2116–2118, 1989.

FOURNET, A., ANGELO BARRIOS, A., MUÑOZ, V., HOCQUEMILLER, R., ROBLOT, F., BRUNETON, J. *et al.* Quinoléines 2-substituées pour le traitement des leishmanioses. **French Patent 91, L12174**, 1991.

FOURNET, A., ANGELO BARRIOS A., MUÑOZ V., HOCQUEMILLER R., ROBLOT F., BRUNETON J., RICHOMME P., GANTIER J. C. Quinoléines 2-substituées pour le traitement des leishmanioses. **Brevet PCT/FR92/00903**, 1992.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BRUNETON, J. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 859–863, 1993a.

FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVE, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Les Chimanines, Nouvelles Quinoléines Substituées en 2, Isolées d'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1547–1552, 1993b.

FOURNET, A.; GANTIERB, J. C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS, M. H.; MAYRARGUE, J.; MOSKOWITZ', H.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R. The activity of

2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 537–544, 1994.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; DE ARIAS, A.R.; DE ORTIZ, S.T.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; HOCQUEMILLER, R. In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2447–2451, 1996.

FOURNET, A.; MUÑOZ, V. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1215–1237, 2002.

FOURNET, A.; MAHIEUX, R. ; FAKHFAKH, M.A. ; FRANCK, X. ; HOCQUEMILLER, R., FIGADÈRE, B. Substituted Quinolines Induce Inhibition of Proliferation of HTLV-1 Infected Cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 891–894, 2003.

FRIEDRICH, K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniato de meglumina. Tese de Doutorado em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FUCHINO, H.; SEKITA, S.; MORI, K.; KAWAHARA, N.; SATAKE, M.; KIUCHI, F. A New Leishmanicidal Saponin from *Brunfelsia grandiflora*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, p. 93–96, 2008.

GANTIER, J.C.; FOURNET, A.; MUNOS, M.H.; HOCQUEMILLER, R. The Effect of Some 2-Substituted Quinolines Isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* Infected Mice. **Planta Medica**, v. 62. p. 285–286, 1996.

GERMONPREZ, N.; MAES, L.; PUYVELDE, L.V.; TRI, M.V.; TUAN, D.A.; DE KIMPE, N. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-Leishmanial Activity of Triterpenoid Saponins Isolated

from *Maesa balansae* and Some Chemical Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 32–37, 2005.

GONTIJO, C.M.F. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004.

HAILU, A.; MUSA, A.M.; ROYCE, C.; WASUNNA, M. Visceral Leishmaniasis: New Health Tools Are Needed. **PLoS Medicine** (www.plosmedicine.org), v. 2, p. 0590–0594, 2005.

HAMIDI, M.; ZARRIN, A.; FOROOZESH, M.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. **Journal of Controlled Release**, v. 118, p. 145–160, 2007.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191–199, 1999.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J. SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.

ICH Expert Working Group. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Current *Step 4* version / Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).

IGLARZ, M.; BAUNE, B.; GANTIER, J.C. ; HOCQUEMILLER, R.; FARINOTTI, R. Determination of 2-n-propylquinoline in mouse plasma and liver by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 714, p. 335–340, 1998.

JHA, T.K.; OLLIARO, P.; THAKUR, C.P.N.; KANYOK, T.P.; SINGHANIA, B.L.; SINGH, I.J.; SINGH, N.K.P.; ANKHOORY, S.; JHA, S. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral

leishmaniasis in North Bihar, India. **British Medical Journal**, v. 316, p. 1200–1205, 1998.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; FELTON, J.M.; SABIN, A.J.; HORTON, J. A Phase II Dose-Ranging Study of Sitamaquine for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 1005–1011, 2005.

JHA, T.K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 389–398, 2006.

JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUIGOU, A.; PRÉVOST, M.; SAUVAINA, M. New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5065–5070, 2005.

KHALID, F.A.; ABDALLA, N.M.; MOHOMED, H.E.O.; TOUM, A.M.; MAGZOUN, M.M.A.; ALI, M.S. *In vitro* Assessment of Anti – Cutaneous Leishmaniasis Activity of Some Sudanese Plants. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 29, p. 3–6, 2005.

KAPOOR P.; SACHDEV, M.; MADHUBALA, R. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, p. 438–442, 2000.

KAYSER, O.; KIDERLEN A.F.; CROFT S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p. S55–S62, 2003.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 4, p. 206–220, 2005.

[KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COMINI, M.A.](#) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1236–48, 2008.

KRAUSE, Notizbl. K. Bot. Gart. Berlin, 6, 143, 1914.

LABRO, M.T.; BABIN-CHEVAYE, C. Effects of Amodiaquine, Chloroquine, and Mefloquine on Human Polymorphonuclear Neutrophil Function *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 1124-1130, 1988.

LIPOLDOVÁ, M.; & DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 294-305, 2006.

LIU, Y.; WANG, M.W. Botanical drugs: Challenges and opportunities. Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, p. 445-449, 2008.

MARTÍNEZ-GRUEIRO, M. GIMÉNEZ-PARDO, C.; GÓMEZ-BARRIO, A.; FRANCK, X.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. FIGADÈRE, B.; CASADO-ESCRIBANO, N. Nematocidal and trichoonacidal activities of 2-substituted quinolines. **II Farmaco**, v. 60, p. 219-224, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde. NEDAscomFunasa Manual de Controle da leishmaniose tegumentar Americana. Brasília/DF, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. leishmaniose visceral grave - Normas e Condutas. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Ed. MS, Brasília-DF, 2006.

MIRANDA-VERÁSTEGUI, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; ARÉVALO, I.; WARD, B.J.; MATLASHEWSKI, G. Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1395-1403, 2005.

MUÑOS, M.H.; MAYRARGUE, J.; FOURNET, A.; GANTIER, J.C.; HOCQUEMILLER, R.; MOSKOWITZ, H. Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora* and of related compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1914-1916, 1994.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MURRAY, H.W. Suppression of Posttreatment Recurrence of Experimental visceral Leishmaniasis in T-Cell-Deficient Mice by Oral Miltefosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3235–3236, 2000.

NAKAYAMA, H.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; TORRES DE ORTIZ, S.; SCHININI, A.; SERNA, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; FAKHFAKH, M.A.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Efficacy of Orally Administered 2-Substituted Quinolines in Experimental Murine Cutaneous and visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4950–4956, 2005.

NAKAYAMA, H.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A.; LOISEAU, P.M. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 186–188, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, C.C.G.; LACERDA, H.G.; MARTINS, D.R.M.; BARBOSA, J.D.A.; MONTEIRO, G.R.; QUEIROZ, J.W.; SOUSA, J.M.A.; XIMENES, M.F.F.M.; JERÔNIMO, S.M.B. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban–rural interface. **Acta Tropica**, v. 90, p. 155–162, 2004.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257–266, 2004.

PALUMBO, E. Oral Miltefosine Treatment in Children With visceral Leishmaniasis: a Brief Review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 2–4, 2008

PARIS, C.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 852–859, 2004.

PATERSON, I.; ANDERSON, E.A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, p. 451–453, 2005.

PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; PEREIRA, P.V.S.; ARAGAO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZAO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 313–319, 2008.

PERAZA-SÁNCHEZ, S.R.; CEN-PACHECO, F.; NOH-CHIMAL, A.; MAY-PAT, F.; SIMÁ-POLANCO, P.; DUMONTEIL, E.; GARCÍA-MISS, M.R.; MUT-MARTÍN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v. 78, p. 315–318, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WANWIMOLRUK, S.; STEPNIEWSKA, K.; JANTRA, A.; HUYAKORN, S.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Quinine Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships in Uncomplicated Falciparum Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3458–3463, 2003.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P.M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1661, p. 212–218, 2004.

RAKOTOMANGA, M.; BLANC, S.; GAUDIN, K.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P.M. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1425–1430, 2007.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; DE JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550–555, 2003.

REIGH, G.; MCMAHON, H.; ISHIZAKI, M.; OHARA, T.; SHIMANE, K.; ESUMI, Y.; GREEN, C.; TYSON, C.; NINOMIYA, S. Cytochrome P450 species involved in the metabolism of quinoline. *Carcinogenesis*, v.17, p.1989–1996, 1996.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 581–596, 2007.

RIDLEY, R.G.; HOFHEINZ, W.; MATILE, H.; JAQUET, C.; DORN, A.; MASCIADRI, R.; JOLIDON, S.; RICHTER, W.F.; GUENZI, A.; GIROMETTA, M.A.; URWYLER, H.; HUBER, W.; THAITHONG, S.; PETERS, W. 4-Aminoquinoline Analogs of Chloroquine with Shortened Side Chains Retain Activity against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 1846–1854, 1996.

ROBERTS, L.J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S.J. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *British Medical Journal*, v. 321, p. 801–804, 2006.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 1895–1901, 2003.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, v. 103, p. 1–10, 2008.

SARKAR, A.; SEN, R.; SAHA, P.; GANGULY, S.; MANDAL, G.; CHATTERJEE, M. An ethanolic extract of leaves of *Piper betle* (Paan) Linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis. *Parasitology Research*, v. 102, p. 1249–1255, 2008.

SEIFERT, K., MATU, S., JAVIER PEREZ-VICTORIA, F., CASTANYS, S., GAMARRO, F., CROFT, S.L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 380–387, 2003.

SEIFERT, K; CROFT, S.L. *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 73–79, 2006.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* Used as an *In Vitro* Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 3097–3102, 1998.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, JL. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2064–2069, 2001.

SIBLEY, C.H.; HUNT, S.Y. Drug resistance in parasites: can we stay ahead of the evolutionary curve? **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 532–537, 2003.

SINGH, N.; KUMAR, A.; GUPTA, P.; CHAND, K.; SAMANT, M.; MAURYA, R.; DUBE, A. Evaluation of antileishmanial potential of *Tinospora sinensis* against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, p. 561–565, 2008.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 139–149, 2004.

SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEGA JC, DIAZ A, LUZ M, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, BERMAN JD, JUNGE K, ENGEL J, SINDERMANN H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1266–72, 2004.

SOTO J, TOLEDO J, VALDA L, BALDERRAMA M, REA I, PARRA R, ARDILES J, SOTO P, GÓMEZ A, MOLLEDA F, FUENTELES C, ANDERS G, SINDERMANN H, ENGEL J, BERMAN J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 350–356, 2007a.

SOTO, J.; TOLEDO, J.T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. v. 7, 2007b. Disponível em <http://infection.thelancet.com>.

SUDHANDIRAN, G.; SHARA, C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca^{2+} through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 25120–25132, 2003.

SUN, H.; YAN, S.C.; CHENG, W.S. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. Implication for its mode of action. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5450–5457, 2000.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, p. 849–854, 2001.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RUEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: *In Vitro*, *In Vivo*, Structure–Activity Relationship, and Quantitative Structure–Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1352–1364, 2006.

TDR, – Leishmaniasis – Seventeenth Programme Report | Progress 2003–2004. p. 19–23, 2005.

THAKUR, C.P.; KANYOK, T.P.; PANDEY, A.K.; SINHA, G.P.; MESSICK, C. ; OLLIARO, P. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-11 clinical study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 432–433, 2000a.

THAKUR, C.P.; KANYOK, T.P.; PANDEY, A.K.; SIUHA, G.P.; ZANIEWSKI, A.E.; HOULIHAN, H.H.; OUIARO, P. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 429–431, 2000b.

TIMERSTEIN, M.A.; NELSON, S.D. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 3059–3065, 1990.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; FILHO, B.P.D.; MORGADO-DIAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 176–182, 2005.

VERCESI AE, DOCAMPO R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochemical Journal**, v. 284, p. 463–467, 1992.

VERMA, N.K.; DEY, C.S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3010–3015, 2004.

VICKERS, T.J.; FAIRLAMB, A.H. Trypanothione S-Transferase Activity in a Trypanosomatid Ribosomal Elongation Factor 1B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 27246–27256, 2004.

VIEIRA, M.L.; JACOBINA R.R.; SOARES, N.M. Casos de leishmaniose em pacientes atendidos nos centros de saúde e hospitais de Jacobina-BA no período de 2000 a 2004. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 31, p. 102–114, 2007.

WATKINS, B.M. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and Development. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 477–478, 2003.

WASUNNA, M.K.; RASHID, J.R.; MBUI, J.; KIRIGI, G.; KINOTI, D.; LONDENYO, H.; FELTON, J.M.; SABIN, A.J.; HORTON, J. A PHASE II DOSE-INCREASING STUDY OF SITAMAQUINE FOR THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN KENYA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 871–876, 2005.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193–200, 2001.

WETSTEYN, J.C.F.M.; DE VRIES, P.J.; OOSTERHUIS, B.; BOXTEL, C.J.V. The pharmacokinetics of three multiple dose regimens of chloroquine: implications for malaria chemoprophylaxis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 696–699, 1995.

WHITE, N.J.; CHANTHAVANICH, P.; KRISHNA, S.; BUNCH, C.; SILAMUT K. Quinine Disposition Kinetics, **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 399–403, 1983.

WHO, Report of the Fifth Consultative Meeting On *Leishmania*/HIV Coinfection – Addis Ababa, Ethiopia, march 2007a.

WHO, Control of leishmaniasis Sixtieth World Health Assembly – Provisional agenda, march 2007b.

WHO, Cutaneous Leishmaniasis – Why are you neglecting me?, 2007c.

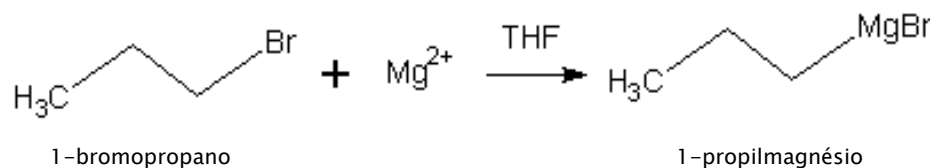
WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M.L., FAIRLAMB, A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 39925–39932, 2004.

YAN, S.; DING, K.; ZHANG, L.; SUN, H. Complexation of Antimony (III) by Trypanothione. **Angewandte Chemie**, v. 112, p. 4430–4432, 2000.

Síntese do composto 1 (base)

Etapa 1 – síntese do organomagnésio

Reação:



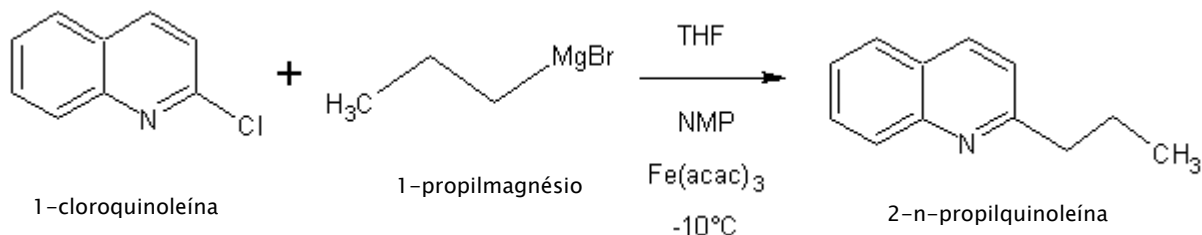
Modo operatório:

1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético sob N₂, colocar 1,45 g de Mg anidro
2. Adicionar 5 mL de tetrahidrofurano (THF) e resfriar em banho de gelo
3. Adicionar lentamente e simultaneamente 4,5 mL de 1-bromopropano e 25 mL de THF
4. Deixar agir durante 45 minutos
5. Adicionar 15 mL de THF para retardar a precipitação do 1-propilmagnésio
6. Dosar o 1-propilmagnésio em um balão de 5 mL com a bi-quino como indicador colorimétrico e o butanol como titulador reativo
7. A concentração obtida foi de 0,78 mol/L

Síntese do composto 1 (base)

Etapa 2 – acoplamento do organomagnésio à 2-cloroquinoleína com N-metilpirrolidinona (NMP)

Reação:



Modo operatório:

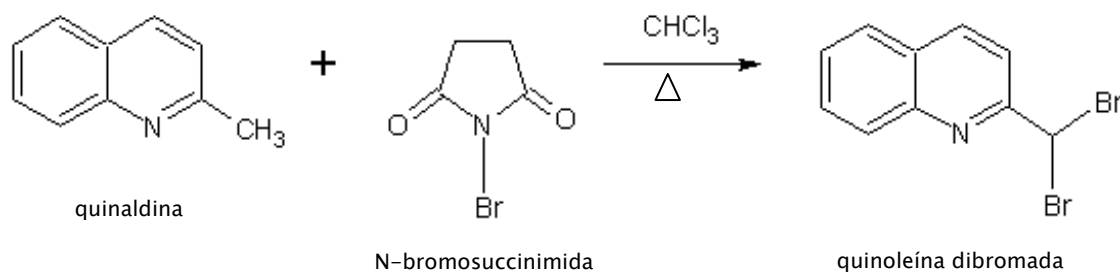
1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético sob N₂, 2,0 g de 2-cloroquinoleína foram dissolvidos em 15 mL de THF
 2. A mistura foi colocada em banho de gelo para atingir a temperatura de -10 °C (-7 °C experimental)
 3. Adicionou-se 0,215 g de Fe(acac)₃ que ficou 30 min na estufa. A solução ficou vermelha
 4. Adicionou-se 23,5 mL do 1-propilmagnésio lentamente. A solução escureceu
 5. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (100% CH₂Cl₂)
 6. Após 2 h de reação, ainda restou um pouco do produto inicial. Hidrolisou-se lentamente com água
 7. Extraíu-se com acetato de etila e NaCl saturado. Secar e evaporar
- Produto bruto: 3,9377 g

O produto foi purificado em coluna (ciclohexano/acetato de etila/ 9/1) – 42 frações obtidas

Fração N°. [18-31] m = 1,3791 g (rendimento = 66%).

Síntese do composto 2
Etapa 1 - síntese da quinoleína dibromada

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 1000 mL com um agitador magnético, 67 mL de quinaldina foram dissolvidos em 300 mL de CHCl_3
2. Então, 197,3 g de N-bromosuccinimida foram adicionados. A solução ficou laranja. As paredes do balão foram limpas com 50 mL de CHCl_3
3. A solução foi aquecida em refluxo de CHCl_3 (ponto de ebulição = 61°C)
4. A reação é acompanhada por cromatografia em camada delgada
5. Após 5 horas de refluxo, a reação terminou. A solução foi hidrolisada com NH_4Cl saturado
6. O produto final foi extraído com CH_2Cl_2 . Secar e evaporar

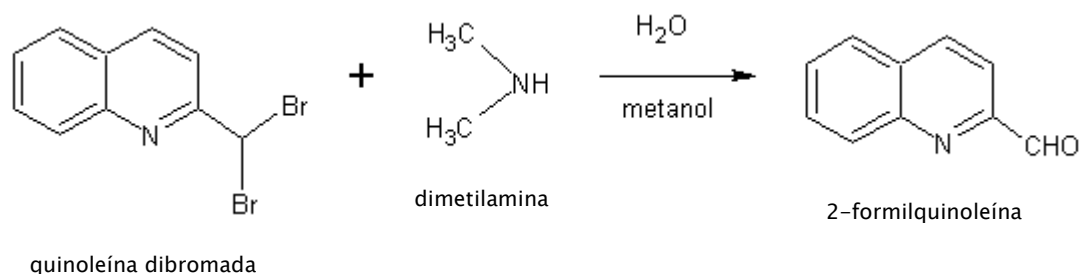
Produto bruto: 157 g

Recristalização com CH_2Cl_2 /pentano.

Síntese do composto 2

Etapa 2 – síntese da 2-formilquinoleína

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 1000 mL com um agitador magnético montado em refluxo, 9 g de quinoleína dibromada foram dissolvidos em 120 mL de metanol
2. 75 mL de dimetilamina foram adicionados. A solução ficou laranja
3. A solução foi aquecida sob refluxo de metanol (ponto de ebulição = 65°C)
4. Após 24 h de refluxo, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (7/3//ciclohexano/acetato de etila). Ainda restou um pouco de quinoleína dibromada
5. Na manhã seguinte, o refluxo continuou durante 4 h à 65 °C
6. A solução foi hidrolisada com CH₂Cl₂
7. O produto foi extraído com CH₂Cl₂. Secar e evaporar

Produto bruto: 2,8875 g

Purificação (7/3//ciclohexano/ acetato de etila).

Obtenção de 10 frações.

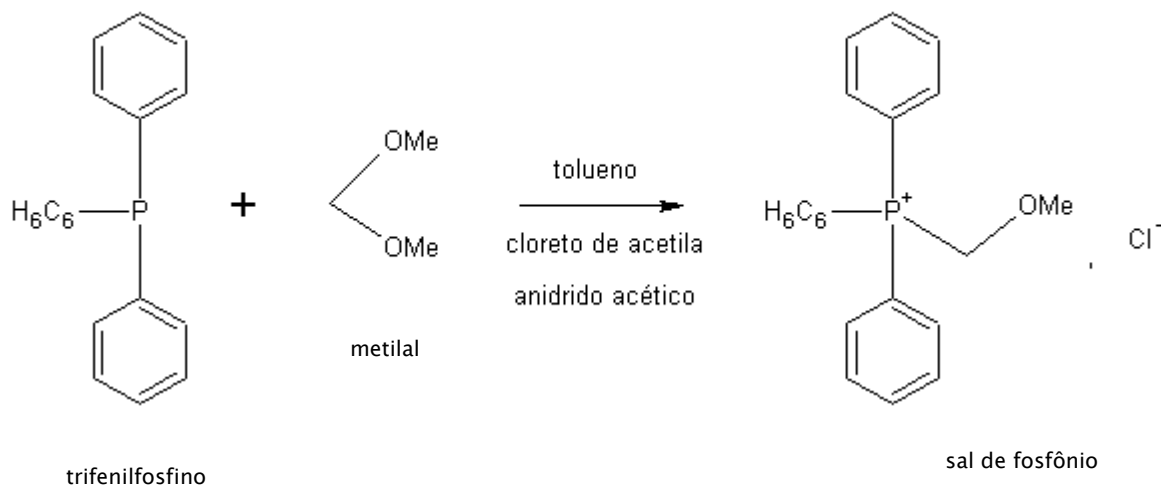
Frações [4-5-6] m = 1,9207 g

A RMN confirmou que correspondia ao produto desejado, pó amarelo-alaranjado. Rendimento de 40,95%.

Síntese do composto 2

Etapa 3 – síntese do sal de fosfônio

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 250 mL com um agitador magnético sob N₂, foram adicionados 13,13 g de trifenilfosfino dissolvidos em 100 mL de tolueno
2. Depois, foram adicionados 6,2 mL de metilal, seguidos de 3,9 mL de cloreto de acetila e 0,5 mL de anidrido acético como catalisador
3. A solução foi submetida ao refluxo
4. Após 1 h, cristais brancos começaram a se formar
5. A solução ficou 2 noites em temperatura ambiente
6. A mistura foi filtrada para recuperar o sal de fosfônio

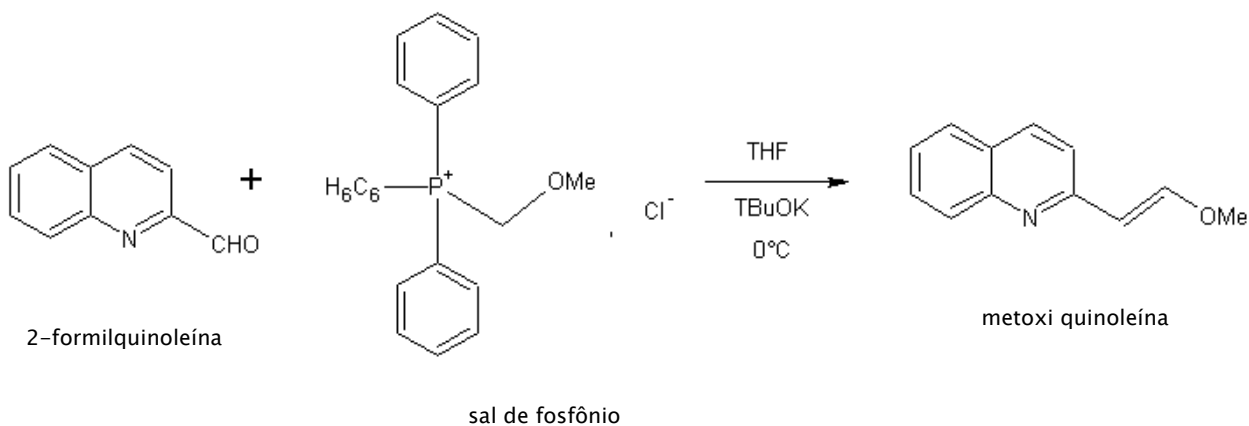
Produto: 10,3228 g

Rendimento: 60,22%

Síntese do composto 2

Etapa 4 - síntese da metoxi quinoleína

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 250 mL com um agitador magnético sob N_2 , 2,355 g da quinoleína aldeído foram dissolvidos em 60 mL de THF. A solução ficou laranja claro
2. A mistura foi resfriada à 0°C em banho de gelo
3. 6,17 g de sal de fosfônio foram adicionados. Depois, 2,016 g de *tert*-butanolato de potássio (TBuOK) foram adicionados lentamente. A solução ficou marrom e depois preta
4. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (5/5//ciclohexano/acetato de etila)
5. Após 2 h de reação, não havia mais quinoleína aldeído. Então, a solução foi hidrolisada com NH_4Cl saturada
6. O produto foi extraído com acetato de etila. Secar e evaporar

Síntese do composto 3

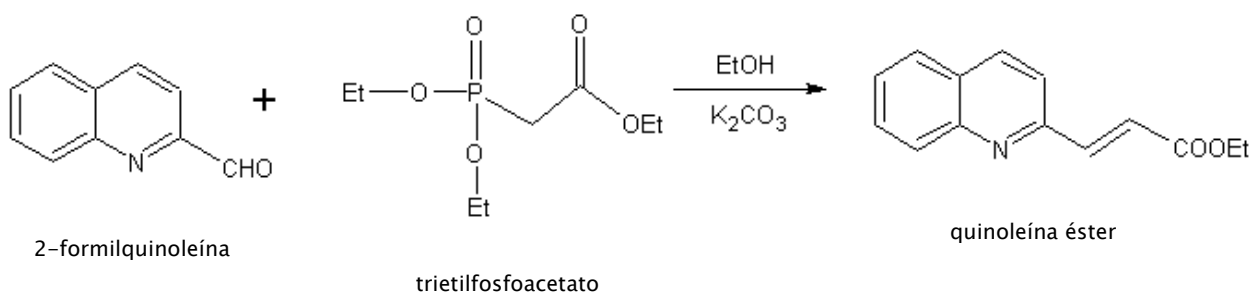
As etapas 1 e 2 são as mesmas do composto 2.

Síntese do composto 3

Etapas 3 – síntese da quinoleína éster

Reação de Wittig

Reação:



Modo operatório:

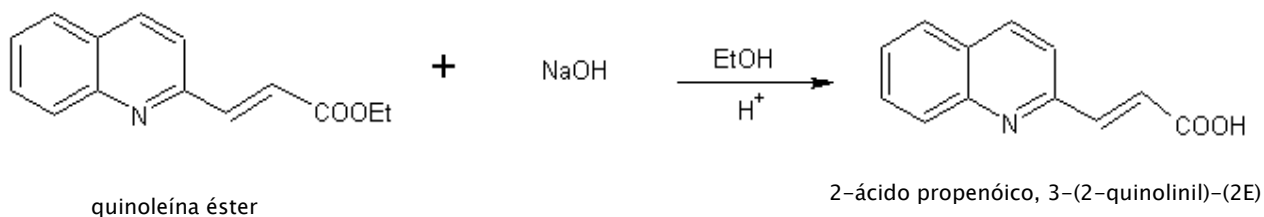
1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético, 4 g de 2-formilquinoleína foram dissolvidos em 50 mL de etanol absoluto. A solução ficou amarela
2. Então, 6,1 mL de trietilfosfoacetato foram adicionados
3. Adicionou-se 4,57 g de K_2CO_3
4. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (95/5//diclorometano/ciclohexano). Mesmo após 2 h a reação não terminou

- Foram adicionados 2 mL de trietilfosfoacetato e 2 g de K_2CO_3
- A reação continuou durante a noite
- No dia seguinte, após 6 h de reação, a solução foi hidrolisada com NH_4Cl saturado
- O produto foi extraído com CH_2Cl_2 e NH_4Cl . Secar e evaporar

Síntese do composto 3

Etapa 4 – saponificação do éster

Reação:



Modo operatório:

- Em um balão de 250 mL com um agitac quinoleína éster foram dissolvidos em 40 mL de etanol à 95%
- Foram adicionados 19 mL de NaOH 2 N
- A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (7/3//ciclohexano/acetato de etila).
- Após 1 h de reação, foram adicionados mais 19 mL de NaOH 2 N pois a reação não havia terminado

5. Depois de 1 h a reação terminou
6. O produto final foi extraído com CH_2Cl_2 (como o produto desejado estava na forma ionizada, ele estava na fase aquosa, $\text{pH} = 10$)
7. A fase aquosa foi recuperada e misturada à um ácido fraco (ácido cítrico) em pó para acidificar o meio ($\text{pH} = 4$)
8. Houve formação de um precipitado amarelo
9. A solução é filtrada para recuperar o precipitado

Precipitado bege-esbranquiçado = 4,0308 g

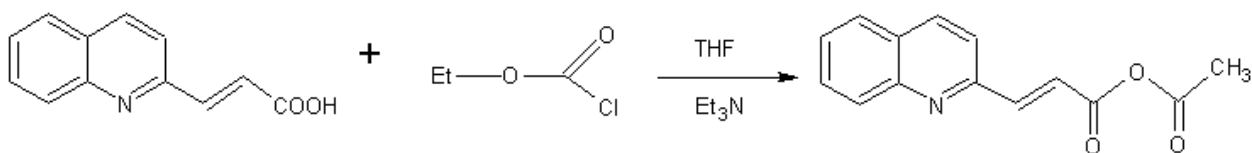
Rendimento = 79,66%

Síntese do composto 3

Etapa 5 – síntese do anidrido

Redução do ácido

Reação:



2-ácido propenóico, 3-(2-quinolinil)-(2E)

etilcloroformiato

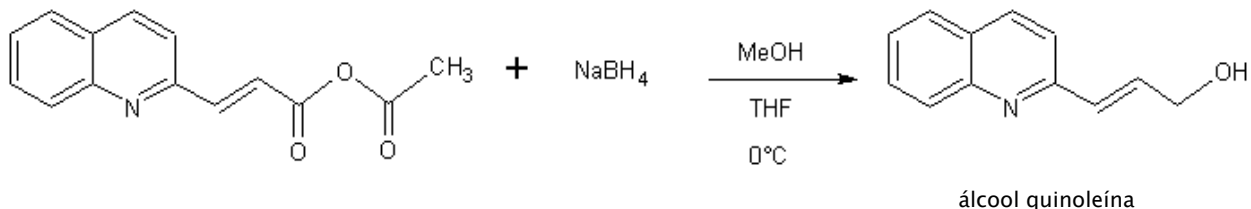
Modo operatório:

1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético sob N_2 , 4,0308 g de 2-ácido propenóico, 3-(2-quinolinil)-(2E) foram dissolvidos em 20 mL de THF. A solução ficou branca
2. Então, 2,8 mL de trietilamina foram adicionados. A solução ficou verde clara
3. A mistura foi colocada em banho de gelo com NaCl para ficar à $-10\text{ }^\circ\text{C}$
4. Quando a temperatura atingiu $-2\text{ }^\circ\text{C}$, 1,9 mL de etilcloroformiato foram adicionados. A solução ficou preta
5. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (7/3//ciclohexano/acetato de etila).
6. Após 1 h de reação, a solução foi filtrada para eliminar o sal (precipitado) que é lavado com 50 mL de THF
7. A solução verde foi recuperada para a etapa seguinte

Síntese do composto 3

Etapa 6 – redução do anidrido à álcool com NaBH₄

Reação:



Modo operatório:

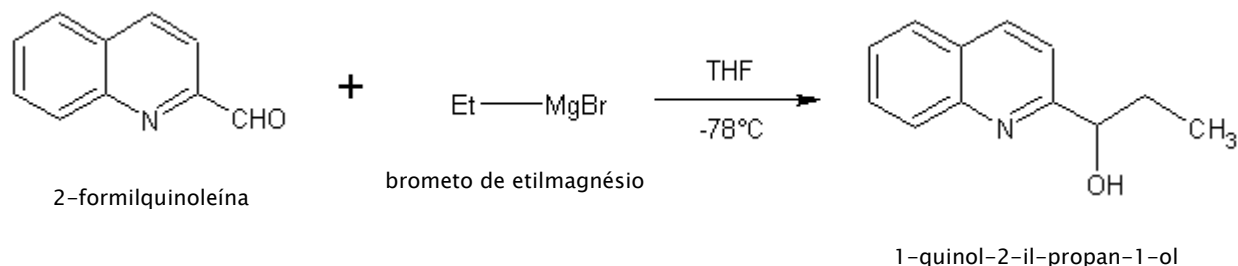
1. A solução verde da etapa anterior foi colocada em um erlenmeyer em banho de gelo (0 °C)
2. Depois, 2,91 g de NaBH₄ foram adicionados
3. Adicionou-se lentamente 12,8 mL de metanol
4. A solução ficou reagindo durante a noite
5. Na manhã do dia seguinte, a solução foi lentamente hidrolisada com água
6. O produto final foi extraído com acetato de etila. Secar e evaporar
7. Foi feita uma recristalização à frio em CH₂Cl₂/ciclohexano. Um precipitado verde se formou. O precipitado foi filtrado

Massa do precipitado = 1,5711 g

Rendimento = 41,90%

Síntese do composto 4
Etapa 1 - síntese do 1-quinol-2-il-propan-1-ol

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético sob N₂, 0,3 g da 2-formilquinoleína foram dissolvidos em 20 mL de THF
2. A solução laranja foi resfriada à -78 °C
3. Depois, 4,3 mL de brometo de etilmagnésio foram adicionados gota à gota. A solução foi escurecendo e ficou marrom
4. Após 1 h, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (7/3//ciclohexano/acetato de etila)
5. A solução ficou reagindo durante a noite
6. Na manhã seguinte, não havia mais 2-formilquinoleína
7. A solução foi hidrolisada com água lentamente à frio. A solução ficou laranja.
8. Esperar a solução voltar à temperatura ambiente

9. O produto foi extraído com acetato de etila e lavado com NaHCO_3 saturado. Evaporar e secar

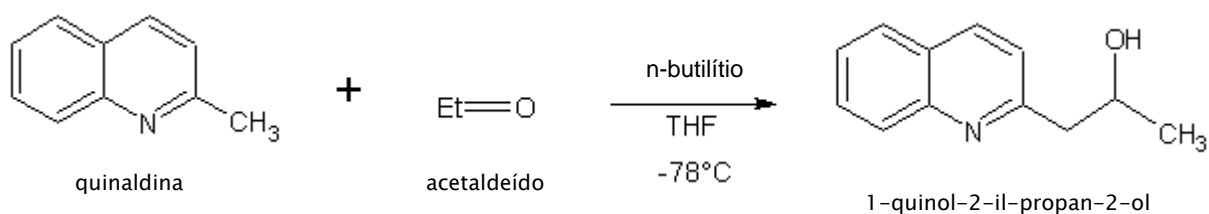
10. Após passar pela RMN, verificou-se que ainda havia 2-formilquinoleína. Então, o produto final foi purificado em coluna (7/3//ciclohexano/acetato de etila). Foram obtidas 52 frações:

Fração 16-21 = 0,0953 g

Rendimento = 26,7%

Síntese do composto 5
Etapa 1 - síntese do 1-quinol-2-il-propan-2-ol

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 100 mL com um agitador magnético sob N₂, 1,35 mL de quinaldina foram dissolvidos em 20 mL de THF. A solução era incolor
2. A solução foi resfriada à -78 °C em banho de gelo seco
3. Depois, 4,5 mL de n-butilítio foram misturados gota à gota. A solução ficou vermelho escuro
4. Após 1 h de deprotonação, a solução é mantida à -78 °C
5. O acetaldeído foi adicionado gota à gota. A solução ficou amarela
6. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (6/4//ciclohexano/acetato de etila)
7. A solução foi então hidrolisada com 15 mL de água à -78°C. A solução é deixada durante toda à noite para voltar à temperatura ambiente
8. Na manhã do dia seguinte, a solução era de coloração laranja

9. O produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com NaCl saturado. Evaporar e secar

Produto bruto = 2,1482 g

Após a análise pela RMN, verificou-se que ainda havia quinaldina. Então, o produto bruto foi purificado em coluna de sílica (6/4//ciclohexano/acetato de etila).

Foram obtidas 83 frações:

Fração 49-78 = 1,4399 g

Rendimento = 77%

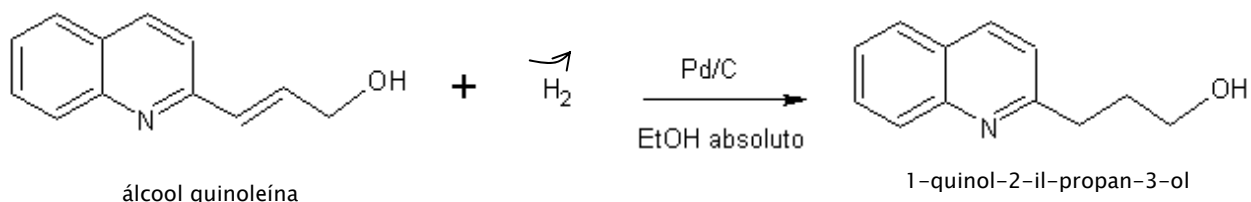
Síntese do composto 6

As etapas de 1 a 6 são as mesmas da síntese do composto 3

Síntese do composto 6

Etapa 7 – hidrogenação

Reação:



Modo operatório:

1. Em um balão de 50 mL com um agitador magnético, 0,4048 g da álcool quinoleína foram dissolvidos em 8 mL de etanol absoluto. A solução ficou marrom clara
2. Então, 0,020 g de paládio em carbono (Pd/C) foram adicionados
3. Dois balões cheios de H_2 foram instalados e deixados durante a noite
4. Na manhã seguinte, a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (96/4// CH_2/MeOH). Os produtos têm o mesmo Rf
5. A solução foi filtrada em celite para eliminar o paládio em carbono. O balão foi limpo com acetato de etila.

Massa do produto bruto = 0,2728 g

Após a RMN, verificou-se que seria preciso purificar o produto

Foi feita uma purificação em coluna de sílica

Fração 6-7 = 0,0660 g } o produto encontrado estava livre de impurezas
Fração 8-9 = 0,0261 g } rendimento = 37,3%

Tabela I: Concentrações do composto 1 com os valores correspondentes das áreas dos picos dos cromatogramas (os valores das áreas dos picos foram usados para fazer a curva de calibração do composto 1)

Concentração Composto 1	Área do pico					MÉDIA	DP	CV
	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5			
200	17554775	17809238	17424240	17462831	17327221	17515661	183287	1,0
100	8761600	9112363	8671196	9009498	8701874	8851306	197479	2,2
50	4410897	4477671	4333145	4408514	4352625	4396570	56743	1,3
25	2227249	2222048	2161740	2195231	2235583	2208370	30129	1,4
12,5	1111951	1096023	1076822	1123005	1069523	1095465	22645	2,1
6,25	540106	542842	533578	550260	543055	541968	6012	1,1
3,125	270079	267073	270415	283117	264668	271070	7133	2,6
1,563	134887	136216	137538	139031	137385	137011	1553	1,1
0,7813	69952	67931	69840	71983	70342	70010	1445	2,1
0,3906	36644	36128	35777	34042	35024	35523	1016	2,9
0,1953	17114	15986	16104	18130	16454	16758	884	5,3
0,09765	ND	ND	ND	ND	ND			

ND = não detectado

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Obs: O composto 1 foi diluído em fase móvel constituída de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v) e injetado no HPLC para gerar os cromatogramas. A área do pico correspondente a cada concentração é usada para gerar a curva de calibração.

Tabela II: Concentrações do composto 4 com os valores correspondentes das áreas dos picos dos cromatogramas (os valores das áreas dos picos foram usados para fazer a curva de calibração do composto 4)

Concentração Composto 4	Área do pico					MÉDIA	DP	CV
	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5			
100	7927632	7972003	7601804	7623849	7990433	7823144	193502	2,5
50	3932152	4020829	3833666	3787349	4065573	3927914	118577	3,0
25	1957233	2030715	1937131	1887360	2025604	1967609	60873	3,1
12,5	963148	1008605	1004626	1005149	1036674	1003640	26262	2,6
6,25	484729	516351	511613	505594	508096	505277	12176	2,4
3,125	247432	260712	257364	263613	264342	258693	6870	2,7
1,563	125056	131389	128416	121414	128064	126868	3785	3,0
0,7813	60107	59370	62058	58803	62362	60540	1597	2,6
0,3906	31266	30697	30355	29043	30214	30315	819	2,7
0,1953	13878	14660	14776	14511	16163	14798	838	5,7
0,09765	7207	6103	6061	6907	7870	6830	766	11,2
0,048825	ND	ND	ND	ND	ND			

ND = não detectado

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Obs: O composto 4 foi diluído em fase móvel constituída de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v) e injetado no HPLC para gerar os cromatogramas. A área do pico correspondente a cada concentração é usada para gerar a curva de calibração.

Tabela III: Concentrações do composto 5 com os valores correspondentes das áreas dos picos dos cromatogramas (os valores das áreas dos picos foram usados para fazer a curva de calibração do composto 5)

Concentração Composto 5	Área do pico			MÉDIA	DP	CV
	curva 1	curva 2	curva 3			
100	7805179	8016880	7854880	7892313	110703	1,4
50	3927863	4150153	4027128	4035048,0	111356	2,8
25	1986790	2004837	1941151	1977592,7	32824	1,7
12,5	973087	1001049	984322	986152,7	14071	1,4
6,25	485161	487356	492493	488336,7	3763	0,8
3,125	241041	245135	250819	245665,0	4910	2,0
1,563	119003	122477	122519	121333,0	2018	1,7
0,7813	59708	65194	60837	61913,0	2897	4,7
0,3906	29369	32553	30908	30943,3	1592	5,1
0,1953	14400	15156	15852	15136,0	726	4,8
0,09765	7954	7249	7400	7534,3	371	4,9
0,048825	2962	3625	3897	3494,7	481	13,8
0,0244125	ND	ND	ND			

ND = não detectado

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Obs: O composto 5 foi diluído em fase móvel constituída de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v) e injetado no HPLC para gerar os cromatogramas. A área do pico correspondente a cada concentração é usada para gerar a curva de calibração.

Tabela IV: Concentrações do composto 6 com os valores correspondentes das áreas dos picos dos cromatogramas (os valores das áreas dos picos foram usados para fazer a curva de calibração do composto 6)

Concentração Composto 6	Área do pico					MÉDIA	DP	CV
	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5			
100	4938488	5094352	4742405	4723476	4648374	4829419	182796	3,8
50	2421416	2529956	2407792	2334757	2357983	2410381	75649	3,1
25	1210406	1251873	1230050	1192090	1197470	1216378	24647	2,0
12,5	613857	623836	620395	581855	594316	606852	18048	3,0
6,25	317290	314205	321493	302860	311447	313459	7003	2,2
3,125	155843	154968	157971	156478	150290	155110	2909	1,9
1,563	76950	77126	80053	78080	79096	78261	1318	1,7
0,7813	39366	42383	40012	38871	38912	39909	1458	3,7
0,3906	18864	19572	19720	19818	18421	19279	608	3,2
0,1953	9320	9745	8870	9853	9240	9406	399	4,2
0,09765	5351	5214	4912	4544	5077	5020	312	6,2
0,048825	2349	2013	2209	1625	1968	2033	275	13,5
0,0244125	ND	ND	ND	ND				

ND = não detectado

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Obs: O composto 6 foi diluído em fase móvel constituída de tampão acetato 10^{-2} M pH 4,0 e metanol (60:40, v/v) e injetado no HPLC para gerar os cromatogramas. A área do pico correspondente a cada concentração é usada para gerar a curva de calibração.

ANEXO 1

Cultura de formas promastigotas de *Leishmania* ssp.

Promastigotas de *L. braziliensis* (cepa HOM/BR/01/BA788) e *L.(L.) amazonensis* (cepa (L)L)a–MHOM/BR/PH8) do Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina foram mantidas em meio de cultura McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN) a 22 °C por uma semana e, posteriormente, em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina.

Ação de extratos sobre promastigotas de *L. braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*

Inicialmente, em uma placa de cultura celular de 96 escavações foi colocado, em cada poço, meio de cultura estéril seguido de uma suspensão de 10⁶ formas promastigotas dos parasitos. Em seguida, foi adicionado 100 µg/mL de extrato nos primeiros poços. Foi realizada a diluição seriada dos extratos e a placa foi incubada por 48 h. Então, 10 µl de uma solução de MTT de 5 mg/mL foram adicionados a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4 h à 22 °C protegida da luz. Depois deste período, foram adicionados 100 µl de DMSO para liberação dos cristais de formazan. A placa foi lida em leitor de placa de Elisa à 570 nm. Estes experimentos foram realizados em triplicata. O CI₅₀ foi determinado através de equações de gráficos do programa Excel®.

Teste de citotoxicidade sobre fibroblastos

Fibroblastos Wish foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de SBF (v/v), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina à 37 °C e 5% de CO₂. As culturas foram dissociadas com tripsina 0,4% + EDTA 0,01% diluídos em salina.

Placas de 96 poços foram semeadas com 2×10^4 fibroblastos/poço com 100 µl de RPMI completo e incubados “overnight” à 37 °C e 5% de CO₂. O meio de crescimento foi removido e depois repostado num volume total de 192 µl para os primeiros poços e 100 µL para os demais poços. Então, 8 µL dos extratos (concentração inicial de 400 µg/mL) foram adicionados aos primeiros poços e foi realizada a diluição seriada. O controle positivo foi feito com miltefosina e o controle negativo com DMSO, ambos em diluições seriadas. Após 24 h de exposição, 20 µl de MTT (concentração de 2,5 mg/ml) foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas por 4 h à 37 °C e 5% de CO₂. Após este período de incubação o meio foi removido. Os cristais de formazan foram solubilizados adicionando 100 µl de isopropanol ácido em cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm em leitor de placa de ELISA.

ANEXO 2

**SCREENING COM O BANCO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO SOBRE PROMASTIGOTAS
DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS* E *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

E

TOXICIDADE SOBRE FIBROBLASTOS

Tabela I. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Apocynaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Aspidosperma tomentosa</i>	R	He	NT	NT	NT
	CC	He	~ 50	NT	NT
	CC	Di	~ 100	NT	NT
	CC	Hi	~ 50	33,20	~ 25
	MC	He	~ 200	225,58	NT
	Fo	Di	> 200	93,17	~ 25
	Fo	Hi	> 200	NT	~ 100
	Fo	He	> 200	NT	~ 100

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela II. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Bignoniaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Arrabidaea florida</i>	Fo	Et	> 200	65,28	NT
	Fo	He	> 200	NT	NT
	FS	He	> 100	NT	NT
<i>Anemopaegma chamberlaynii</i>	C	Et	> 200	NT	> 100
	C	He	> 100	74,24	~25

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela III. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Zingiberaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Renealmia alpinia</i>	Fo	Et	> 200	NT	~ 100
	Fo	He	> 100	40,58	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela IV. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Solanaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Solanum licocarpum</i>	Fo	He	> 200	NT	~ 50

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela V. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Vochysiaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Qualea grandiflora</i>	Fo	He	> 50	74,78	~ 25
	Fo	Di	~ 200	NT	~ 50
	Fo	Hi	~ 200	NT	> 100
	C	He	NT	NT	NT
	C	Di	~ 50	NT	~ 100
	R	He	~ 12,5	> 100	NT
	R	Et	~ 100	NT	> 100
	MC	Di	~ 50	NT	> 100
	MC	He	~ 6,25	NT	> 100
<i>Qualea parviflora</i>	CR	Hi	NT	NT	> 100
	CR	He	NT	NT	NT
	MR	He	~ 6,25	352,73	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela VI. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Clusiaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Kielmeyera coriacea</i>	Fo	Di	> 200	NT	~ 50
	Fo	He	> 200	56,41	NT
	Fr	He	~ 100	NT	~ 100
	CC	He	~ 25	247,40	~ 25
	MC	He	> 25	37,17	~ 12,5
	MR	Di	~ 100	NT	~ 50
	MR	He	> 50	80,00	NT
	CR	He	~ 25	NT	~ 50
<i>Calophyllum brasiliense</i>	R	He	~ 100	NT	~ 50
	R	Hi	~ 100	11,72	~ 12,5
	R	Di	> 200	30,25	~ 12,5
	CC	He	~ 100	NT	NT
	MC	He	> 100	NT	~ 100
	MC	Di	> 200	NT	> 100
	Fo	Di	> 50	43,52	~ 12,5
	Fo	He	> 100	53,80	~ 25

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela VII. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Rubiaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Palicourea rigida</i>	C	He	> 200	NT	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela VIII. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Malpighiaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Byrsonima crassa</i>	Fo	Di	> 100	80,99	~ 25
	Fo	Hi	> 200	> 100	NT
	Fo	He	> 200	NT	~ 50

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela IX. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Anacardiaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Schinus terebinthifolius</i>	C	Di	~ 100	NT	> 100
	C	He	~ 12,5	NT	> 100
	MR	Di	> 200	> 100	NT
	MR	He	~ 25	NT	> 100
	Fo	Di	> 50	22,46	~ 25
	Fo	He	> 50	21,25	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela X. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Mimosaceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Enterolobium ellipticum</i>	Fo	Di	~ 50	NT	~ 100
	Fo	Hi	~ 200	NT	NT
	Fo	He	~ 100	NT	NT
	MR	Hi	NT	NT	> 100
	MR	He	~ 25	NT	NT
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Fo	Di	~ 100	NT	NT
	Fo	He	~ 200	NT	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado

Tabela XI. Concentração inibitória dos extratos de plantas da família Alismataceae sobre fibroblastos, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Solvente</i>	<i>Fibroblastos</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>Cl₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Fo	Hi	~ 200	NT	NT
	Fo	Di	~ 25	NT	NT

Fo = Folha; Fr = Fruto; FS = Fruto + Semente; C = Caule (M + C); CC = Casca do Caule; MC = Madeira do Caule; R = Raiz (M + C); MR = Madeira da Raiz.

He = Hexano; Et = Etanol; Hi = Solução Hidroalcoólica; Di = Diclorometano.

NT = não testado