

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-
PARASITÁRIAS, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Roberta Reis Soares

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE ANÁLOGOS DE 4-
AMINOQUINOLINAS E 6-MERCAPTOPURINAS EM MODELO
MURINO**

Juiz de Fora

2013

2013

PGCBIO

Roberta Reis Soares

ICB/UFJF

ROBERTA REIS SOARES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE ANÁLOGOS DE 4-AMINOQUINOLINAS E 6-MERCAPTOPURINAS EM MODELO MURINO

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Abramo

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva.

Juiz de Fora

2013

Soares, Roberta Reis .

Avaliação da atividade antimalárica de análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas em modelo murino /

Roberta Reis Soares. -- 2013.

70 p. : il.

Orientadora: Clarice Abramo

Coorientador: Adilson David Da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Malária. 2. atividade antimalárica. 3. 4-aminoquinolinas. 4. 6-mercaptopurinas. 5. Plasmodium berghei. I. Abramo, Clarice, orient. II. Da Silva, Adilson David, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-
PARASITÁRIAS, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE ANÁLOGOS DE 4-
AMINOQUINOLINAS E 6-MERCAPTOPURINAS EM MODELO
MURINO**

ROBERTA REIS SOARES

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Clarice Abramo- Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Kézia K. G. Scopel- Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti- Universidade Federal de São João Del Rey

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Clarice Abramo e do Prof. Dr. Adilson David da Silva, com o apoio financeiro do CNPQ e FAPEMIG.

Dedico este trabalho à minha mãe Rita, vó Stella e tio Paulo Roberto. Minha família, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever a dissertação é colocar no papel o quanto tenho a agradecer a todos que dela participaram, direta ou indiretamente.

Agradeço primeiramente a Deus que está comigo em todos os momentos de minha vida.

À minha família, que mesmo sabendo das muitas dificuldades que iríamos enfrentar rumo à realização deste sonho, estiveram sempre ao meu lado, me dando todo o apoio necessário.

À professora Clarice por ter me aberto às portas do Laboratório de Parasitologia, depositando em mim sua confiança mesmo sem me conhecer previamente, me orientando sempre com paciência e carinho.

Ao professor Adilson por ser tão prestativo, esclarecendo dúvidas e dando sugestões tão valiosas ao trabalho.

À professora Kézia a quem recorri inúmeras vezes, me dando a oportunidade de participar da cultura *in vitro* e com quem iniciarei o doutorado em uma área que muito me atrai que é a imunologia da malária.

À professora Jacy por ter me ajudado prontamente todas as vezes que dela precisei.

Às professoras Elaine e Florence por terem me acolhido tão gentilmente e pelo bom convívio no laboratório.

À professora Rosângela Abreu por ter sido um anjo no meu caminho.

Aos companheiros de laboratório Fernanda, Deise e Maiza pela ajuda e cumplicidade. Patrícia, Daniela, Ayla, Mariana, Juliana, Pollyana, Valdenir e Zé Márcio pela amizade e muitas risadas. À Luciana pelo auxílio nos testes de citotoxicidade e por ter sido tão próxima a mim.

Às técnicas Cristina e Ivone pela amizade e apoio nas tarefas do dia-a-dia.

À Nicolli por ter me acolhido gentilmente em sua casa em BH.

À professora Antoniana e Carol pelo treinamento recebido no CPqRR.

À Laura por ter me aconselhado carinhosamente sempre que precisei.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e à Pós-Graduação em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, Genética e Biotecnologia.

Enfim, palavras dificilmente traduziram a emoção deste momento.

RESUMO

A malária permanece ao longo dos anos como emergência global em saúde pública. São aproximadamente 87 milhões de casos e 106.820 mortes ocorridas anualmente no mundo. As principais estratégias atuais no controle da doença se baseiam no diagnóstico precoce e tratamento oportuno dos casos, devendo ser considerada a resistência dos parasitos a praticamente todos os fármacos atualmente em uso, o que torna urgente a busca por novos antimaláricos. Neste contexto, análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas contendo 1,2,3-triazol ou esteroide foram sintetizados e tiveram sua atividade antimalárica investigada utilizando o teste supressivo de Peters em modelo murino de infecção por *Plasmodium berghei* NK65. Dentre os 11 análogos avaliados, 5 exibiram atividade antimalárica significativa, alcançando percentuais de supressão de até 81% em relação ao controle não tratado. Além da atividade antimalárica, um composto promissor não pode apresentar efeitos indesejáveis às células do hospedeiro, sendo assim foram avaliadas a citotoxicidade e atividade hemolítica dos análogos. A maioria dos compostos foram considerados seguros às células do hospedeiro mesmo nas maiores concentrações avaliadas. Portanto, estes análogos merecem ser objeto de futuras investigações visando compor novos antimaláricos.

Palavras-chaves: Malária, *Plasmodium berghei*, atividade antimalárica, 4-aminoquinolinas, 6-mercaptopurinas, 1,2,3-triazol, esteroide.

ABSTRACT

Malaria remains over the years as a global public health emergency. There are approximately 87 million cases and 106.820 deaths worldwide each year. The main current strategies to control the disease are based on early diagnosis and appropriate treatment cases and should be considered the resistance of parasites to almost all drugs currently in use, which makes urgent the search for new antimalarials. In this context, analogs of 4-aminoquinolines and 6-mercaptopurines containing 1,2,3-triazole or steroid were synthesized and investigated for their antimalarial activity using the 4-day suppressive test described by Peters in a murine model of infection by *Plasmodium berghei* NK65. Among the 11 analogues evaluated, 5 exhibited significant antimalarial activity, reaching percentages of suppression up to 81% compared to untreated control. Besides antimalarial activity, a promising compound cannot have undesirable effects on host cells, thus was evaluated the cytotoxicity and hemolytic activity of analogs. Most compounds were considered safe to host cells even at the highest concentrations evaluated. So, this analogs deserve to be object of future investigations aiming compose new antimalarials.

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei*, antimalarial activity, 4-aminoquinolines, 6-mercaptopurines, 1,2,3-triazole, steroid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida dos plasmódios.....	16
Figura 2- Trânsito de esporozoítos nos hepatócitos, formação de vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do esquizonte.	18
Figura 3- Formação e liberação de merozoítos contendo os merozoítos.....	19
Figura 4- Países ou áreas de risco de transmissão da malária em 2011.....	23
Figura 5- Estrutura química dos principais antimaláricos.	25
Figura 6- Supressão da parasitemia de camundongos infectados por <i>P. berghei</i> , tratados com os análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nos dias pós-infecção.	42
Figura 7- Sobrevivência dos animais infectados por <i>P. berghei</i> , tratados com os análogos de 4-aminoquinolinas, CQ e H ₂ O + DMSO 5%, nos dias pós-infecção.....	43
Figura 8- Atividade citotóxica dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nas concentrações de 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 µM, frente a macrófagos peritoneais murinos.	43
Figura 9- Atividade hemolítica dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nas concentrações de 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL, frente a hemácias humanas não infectadas..	45
Figura 10- Supressão da parasitemia de camundongos infectados por <i>P. berghei</i> , tratados com os análogos de 6-mercaptopurinas e CQ, nos dias pós-infecção.....	46
Figura 11- Sobrevivência dos animais infectados por <i>P. berghei</i> , tratados com os análogos de 6-mercaptopurinas, CQ e H ₂ O + DMSO 5%, nos dias pós-infecção....	47
Figura 12- Atividade citotóxica dos análogos de 6-mercaptopurinas e CQ, nas concentrações de 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 µM, frente a macrófagos peritoneais murinos.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura dos análogos de 4-aminoquinolinas (compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6).	35
Tabela 2- Estrutura dos análogos de 6-mercaptopurina contendo 1,2,3-triazol (compostos 7, 8 e 9) ou esteroide (compostos 10 e 11).	36
Tabela 3- Supressão da parasitemia <i>in vivo</i> induzida pelo tratamento com os análogos de 4-aminoquinolinas contra <i>Plasmodium berghei</i> NK65	41
Tabela 4- Sobrevivência dos animais infectados por grupo.....	42
Tabela 5- Concentração citotóxica (CC ₅₀) dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ em macrófagos peritoneais murinos.	44
Tabela 6- Supressão da parasitemia <i>in vivo</i> induzida pelo tratamento com análogos de 6-mercaptopurinas contra <i>Plasmodium berghei</i> NK65	46
Tabela 7- Sobrevivência dos animais infectados por grupo.....	47
Tabela 8- Concentração citotóxica (CC ₅₀) dos análogos de 6-mercaptopurinas e CQ em macrófagos peritoneais murinos.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	<i>Artemisinin-Combination Therapies</i> (Terapias de combinação à artemisinina)
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CC50	Concentração citotóxica 50%
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CQ	Cloroquina
CR1	<i>Complement Receptor 1</i> (Receptor do complemento 1)
CSP	<i>Circumsporozoite protein</i> (Proteína circunsporozoíto)
DARC	<i>Duffy antigen/chemokine receptor</i> (Receptor de antígeno Duffy para quimiocinas)
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DHPS	Di-hidropteroato sintase
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático ligado à enzima)
FP-IX	Ferriprotoporfirina IX
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
G6PD	<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i> (Glicose-6-fosfato desidrogenase)
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Fator de crescimento de hepatócitos)
HGPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i> (Hipoxantina guanina fosforribosiltransferase)
MILD	Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração
MS	Ministério da Saúde

MSP1	<i>Merozoite Surface Protein-1</i> (Proteína 1 de superfície dos merozoítos)
MTT	3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico
PABA	Ácido paraminobenzóico
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Solução salina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PfLDH	<i>P. falciparum Lactate Dehydrogenase</i> (Lactato desidrogenase do <i>P. Falciparum</i>)
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
RDT	<i>Rapid Diagnostic Tests</i> (Testes de diagnóstico rápido)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura)
SBF	Soro Bovino Fetal
SERCA	<i>Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium-dependent ATPase</i> (Ca ⁺² -ATPase do retículo sarcoplasmático)
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TRAP	<i>Thrombospondin-Related Anonymous Protein</i> (Proteína anônima relacionada à trombospondina)
VD	Vacúolo digestivo
VP	Vacúolo parasitóforo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Malária	15
1.1.1 Transmissão da Malária	15
1.1.2 Aspectos clínicos da Malária	20
1.2 Distribuição da doença no mundo e no Brasil	22
1.3 Quimioterapia antimalárica	24
1.4 Busca pela ampliação do arsenal de antimaláricos	29
1.5 Compostos testados neste estudo	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Síntese dos compostos químicos analisados	34
4.2 Testes <i>in vivo</i>	34
4.2.1 Animais.....	34
4.2.2 <i>Plasmodium berghei</i>	34
4.2.3 Solubilização dos compostos para testes <i>in vivo</i>	37
4.2.4 Teste de drogas	37
4.2.5 Contagem da parasitemia	37
4.2.6 Percentual de Inibição da Multiplicação dos Parasitos.....	38
4.2.7 Sobrevida dos animais	38
4.3 Ensaio de citotoxicidade	38
4.4 Análise da atividade hemolítica dos compostos.....	39
4.5 Análise estatística	40

5 RESULTADOS	41
5.1 Análogos de 4-aminoquinolinas	41
5.1.1 Supressão da parasitemia.....	41
5.1.2 Sobrevivência.....	42
5.1.3 Ensaio de citotoxicidade (MTT)	43
5.1.4 Atividade hemolítica dos compostos	44
5.2 Análogos de 6-mercaptopurinas contendo 1,2,3-triazol ou esteroide	45
5.2.1 Supressão da parasitemia.....	45
5.2.2 Sobrevivência.....	46
5.2.3 Ensaio de citotoxicidade (MTT)	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	69
ANEXO A – Artigo submetido (produto direto)	69
ANEXO B – Depósito de pedido de patente (produto indireto)	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Malária, ao lado de HIV/AIDS e tuberculose, permanece até o momento como um dos maiores desafios de saúde pública mundial (WHO-ROLL BACK MALARIA, 2012), representando grande impacto negativo nos países onde é endêmica, contribuindo para um ciclo de pobreza e limitando seu desenvolvimento econômico (SACHS e MALANEY, 2002; DERBYSHIRE, MOTA e CLARDY, 2011). Por exemplo, apenas na África é estimado uma perda, por razões diretamente relacionadas à doença, de pelo menos 12 bilhões de dólares ao ano (WHO-ROLL BACK MALARIA, 2008).

A malária, conhecida popularmente como paludismo, febre intermitente, maleita, sezão, tremedeira ou batedeira, é uma doença parasitária, causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Sabe-se hoje que existem aproximadamente 150 espécies do parasito causadoras da doença em diferentes hospedeiros vertebrados, mas apenas cinco espécies infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e, mais recentemente, *P. knowlesi*, que era considerado infectante apenas para primatas não-humanos (COX-SINGH e SINGH 2008; COX-SINGH et al., 2010). No Brasil, três espécies de plasmódio podem causar a doença: *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae* (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Estas espécies do parasito se diferem em sua distribuição geográfica, aspectos morfológicos, características clínicas da infecção e potencial resistência aos antimaláricos, não apresentando grandes variações em seu ciclo biológico (WHO, 2012).

1.1.1 Transmissão da Malária

A malária é naturalmente transmitida para o ser humano através da picada de um mosquito vetor. Existem dezenas de espécies, conhecidas popularmente como anofelinos, com potencial de transmitir a malária. No Brasil, cerca de cinco espécies são importantes: *Anopheles darlingi* (principal), *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An.*

cruzi e *An. bellator*. Esses mosquitos se desenvolvem em águas limpas e sombreadas de remansos de rios, córregos, igarapés, lagoas, represas, açudes, valetas de irrigação, alagados e pântanos. A malária também pode ser transmitida acidentalmente por transfusão de sangue contaminado, pelo compartilhamento de seringas ou por acidente com agulhas contaminadas. Há, ainda, a possibilidade de transmissão neonatal (MS-SVS, 2005).

O ciclo biológico dos plasmódios humanos compreende duas fases: uma fase assexuada ou esquizogônica que se passa no ser humano e outra sexuada ou esporogônica, que se passa nas fêmeas do mosquito vetor do gênero *Anopheles* (Figura 1).

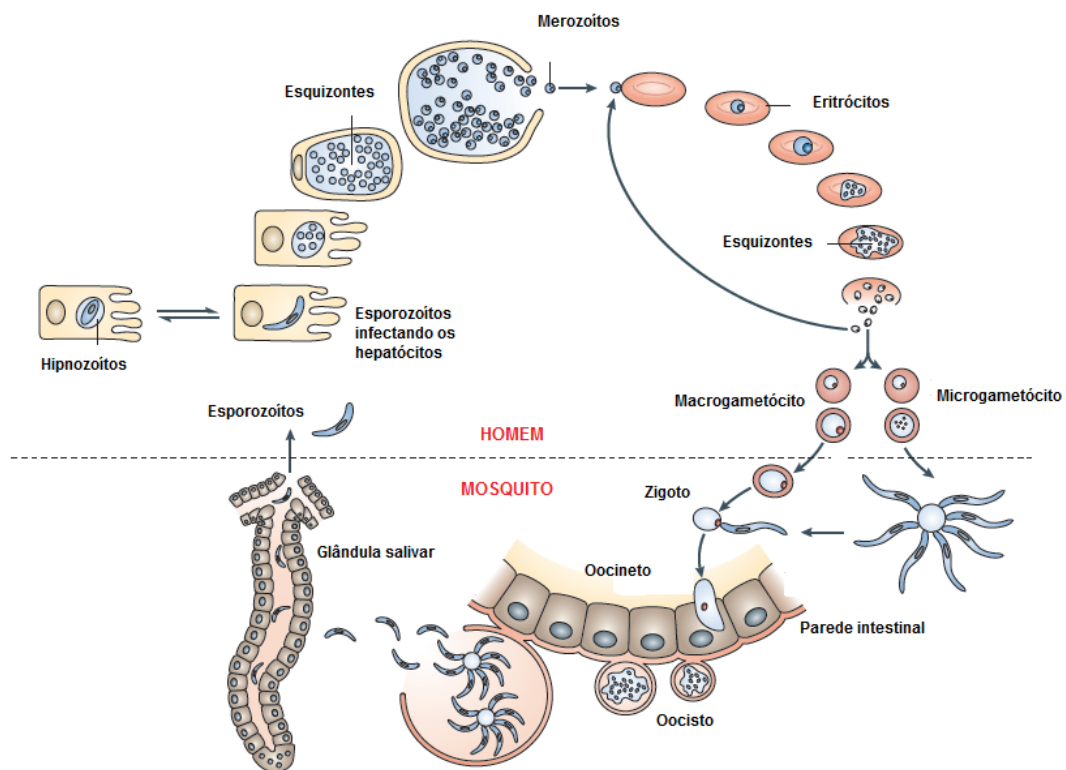


Figura 1- Ciclo de vida dos plasmódios.
(Adaptada de: WELLS, ALONSO e GUTTERIDGE, 2009).

O ciclo se inicia quando esporozoítos de *Plasmodium* são injetados na pele durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, juntamente com substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras. Cerca de 15 a 200 esporozoítos são injetados por um único mosquito infectado. Evidências sugerem que nem toda a picada infectante resulta em doença clínica, e que alguns esporozoítos são drenados pela circulação linfática, atingindo o linfonodo mais próximo, onde são encontrados em

forte associação com células dendríticas. Entretanto, os parasitos não parecem atingir o fígado por esta via (AMINO et al., 2006). Recentemente, foi proposto que cerca de 10% dos esporozoítos inoculados permanecem e evoluem na pele para trofozoítos, no sítio da inoculação (GUEIRARD et al., 2010). Grande parte destes parasitos inoculados na pele são degradados por linfócitos intraepidérmicos, mas os que atingem o sistema circulatório podem chegar ao fígado se desenvolvendo em formas exo-eritrocíticas.

Os hepatócitos não são diretamente acessíveis aos parasitos, mas separados do lúmen sinusoidal por uma camada de células sinusoidais, células de Kupffer e células estelares hepáticas. Não se sabe o mecanismo exato envolvido no tráfego dos esporozoítos até alcançarem finalmente os hepatócitos, mas sabe-se que a passagem dos parasitos por várias destas células antes da invasão parece ser fundamental para o ciclo de vida dos plasmódios (**Figura 2**). Isso induz a secreção de uma substância chamada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção (MOTA et al., 2001; CARROLO, 2003). O processo de reconhecimento e invasão da célula hospedeira envolve uma série de interações do tipo ligante-receptor. A principal proteína de superfície dos esporozoítos, a proteína circusporozoíto (CSP), se liga aos proteoglicanos dos hepatócitos e esta interação determina o rápido sequestro do parasito. Auxiliam também as proteínas transmembrana, que mediam sua locomoção, denominadas proteína anônima relacionada à trombospondina (TRAP) (KAPPE et al., 2010).

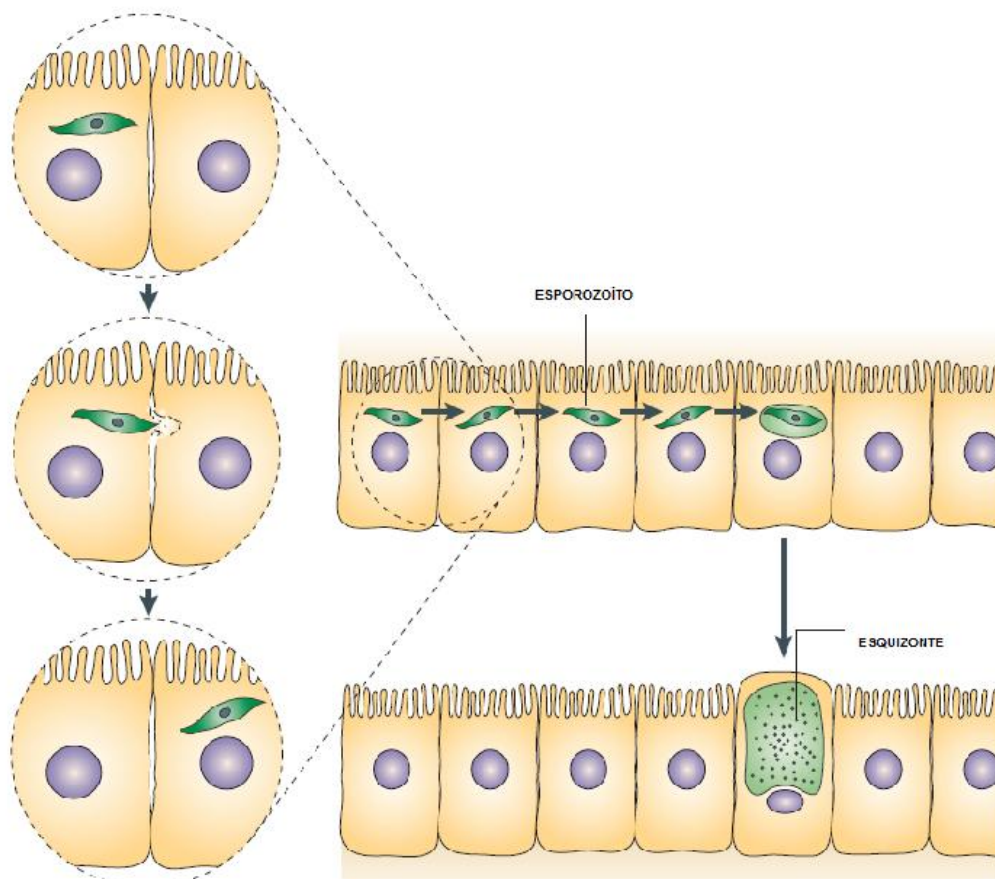


Figura 2- Trânsito de esporozoítio nos hepatócitos, formação de vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do esquizonte.
(Adaptada de: PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006).

A formação do vacúolo parasitóforo (VP) nos hepatócitos inicia-se com uma junção íntima entre parasito-célula hospedeira, através da qual o parasito se projeta para dentro de uma invaginação da membrana plasmática celular (RENNENBERG et al., 2010). A membrana do VP se deriva primariamente da membrana plasmática da célula do hospedeiro, mas é rapidamente remodelada pela inserção de proteínas do parasito. A formação do VP é fundamental para proteger o parasito das defesas do indivíduo, permitindo também a aquisição de nutrientes que são fundamentais para seu desenvolvimento (ISET et al., 2011). Uma vez dentro do vacúolo, o parasito se reproduz por esquizogonia, culminando na liberação de milhares de merozoítos dentro de vesículas denominadas merosomas (**Figura 3**). Após o rompimento da membrana, os merozoítos hepáticos invadem os eritrócitos e iniciam o estágio sanguíneo, responsável pelas manifestações clínicas da doença (STURM et al., 2006). O desenvolvimento nas células hepáticas requer aproximadamente uma

semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula distintas populações de esporozoítos, algumas se desenvolvem rapidamente enquanto outras ficam em estado de latência no fígado, sendo denominados hipnozoítos (KROTOSKI, 1985). Estes hipnozoítos são os responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação.

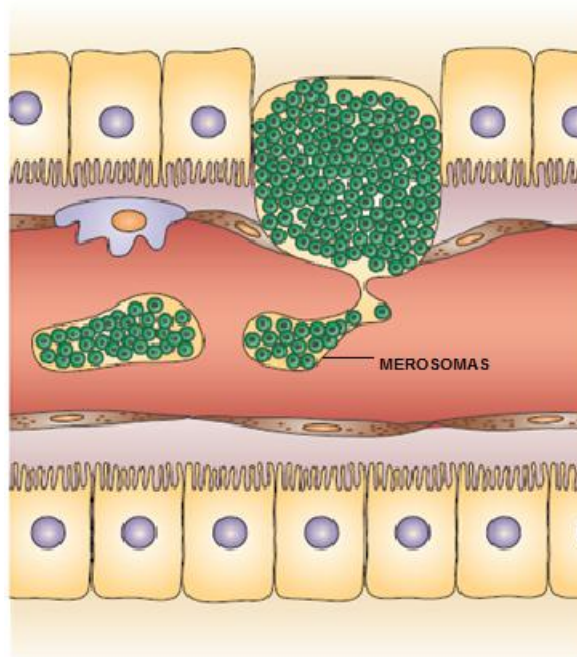


Figura 3- Formação e liberação de merozôitos contendo os merozoítos.
(Fonte: PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006).

A invasão das hemácias pelos merozoítos é um processo que também envolve diversos receptores, como moléculas de ácido siálico e glicoforinas A, B e C. Mais recentemente, o receptor do complemento 1 (CR1) foi identificado como outro receptor de eritrócito para *P. falciparum*. Em contraste, *P. vivax* utiliza o receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) como principal porta de entrada em eritrócitos (MILLER et al. 2002; HANS et al., 2005; LACERDA et al., 2012). Da mesma forma que a CSP dos esporozoítos desempenha papel fundamental na invasão destes aos hepatócitos, acredita-se que a proteína 1 de superfície dos merozoítos (MSP1) é a molécula central de reconhecimento dos merozoítos às hemácias (PIZARRO et al., 2003).

Após diversos ciclos de replicação, os merozoítos eritrocíticos se desenvolvem em formas sexuadas, que são os gametócitos femininos e masculinos. Em infecções por *P. falciparum*, eles são formados mais tardiamente se comparado à *P. vivax* (BRUCE-CHWATT, 1985; PHIMPRAPHI et al., 2008).

Os gametócitos são ingeridos pela fêmea do mosquito vetor durante o repasto sanguíneo. Dentro de seu estômago, gametócitos masculinos sofrem exflagelação e se fundem com o gameta feminino formando o zigoto que dará origem ao oocineto, que se aloja na parede intestinal do mosquito formando o oocisto. Inicia-se o processo de multiplicação esporogônica, e em aproximadamente duas semanas, o oocisto maduro se rompe liberando esporozoítos. Ao invadir a hemolinfa, os esporozoítos migram até atingir as glândulas salivares do vetor, completando o ciclo evolutivo dos plasmódios no hospedeiro invertebrado (WELLS, ALONSO e GUTTERIDGE, 2009; HAFALLA, SILVIE e MATUSCHEWSKI, 2011).

1.1.2 Aspectos clínicos da Malária

A gravidade dos casos clínicos da infecção nos indivíduos é influenciada por diversos fatores, incluindo a espécie do parasito, cepa, número de parasitos inoculados, imunidade e idade do paciente (COURA, SUAREZ-MUTIS e LADEIA-ANDRADE, 2006). Duas principais espécies de plasmódios se destacam como responsáveis pela maior parte dos casos da doença: *P. falciparum* e *P. vivax*. *P. falciparum* é considerado o responsável pela febre terçã maligna, vitimando principalmente crianças menores de cinco anos, idosos, grávidas e indivíduos primoinfectados, sendo tradicionalmente responsável por casos de malária grave (WHO, 2008). Até recentemente, *P. vivax* era associado apenas à febre terçã benigna, mas já se têm descrito casos de malária grave ocasionados por esta espécie (DHANPAT et al., 2009; ALEXANDRE et al., 2010; ANDRADE et al., 2010).

O período de incubação da malária varia de 7 a 30 dias, podendo, contudo, chegar a vários meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* e *P. malariae*. Os sintomas clássicos da malária envolvem a tríade febre, calafrio e dor de cabeça, mas sintomas inespecíficos como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura podem preceder ou acompanhar a tríade sintomática. As manifestações clínicas da malária ocorrem quando substâncias tóxicas ao hospedeiro como a hemozoína (pigmento malárico) e glicosilfosfatidilinositol (GPI) são liberadas na

circulação no momento em que a hemácia infectada se rompe, liberando os merozoítos. Macrófagos e outras células do hospedeiro são então estimulados a produzirem citocinas e outros fatores solúveis que atuam na patologia da infecção (NAIK et al., 2000). Como os parasitos se multiplicam sincronicamente, se justifica o ciclo de febre que se manifesta a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a cada 72 horas para *P. malarie* (ALVES et al., 2007). Nos casos de não infecções, esse quadro clássico pode ser amenizado pelo uso de drogas profiláticas ou aquisição de imunidade contra a doença. Por outro lado, nos casos mais complicados da infecção, como na malária grave, ocorre o acometimento e disfunção de vários órgãos e sistemas, como sistema nervoso central, aparelho respiratório, rins e coagulação sanguínea (MS-SVS, 2005). Neste estágio da doença, óbitos podem ocorrer em até 20% das pessoas que receberem tratamento. Se não tratada, a malária grave conduzirá ao óbito na maior parte dos casos (PARISE, 2009; WHO, 2010b).

Tendo em vista a gravidade do quadro clínico que a doença pode alcançar, é fundamental o acesso universal, gratuito e rápido ao diagnóstico parasitológico que oriente o início imediato da quimioterapia antimalárica adequada. Como técnicas disponíveis se encontram gota espessa, esfregaço fino, reação em cadeia da polimerase (PCR) e testes de diagnóstico rápido (RDT) (ABBA et al., 2011). A técnica considerada padrão-ouro no diagnóstico da malária é a gota espessa, que permite a identificação microscópica da espécie do parasito, estágio de evolução e determinação da carga parasitária. É de fácil e rápida execução e baixo custo, mas exige a presença de um microscopista experiente (COSTA et al., 2008; MS, 2010).

O tratamento precoce adequado da malária visa tanto curar o indivíduo, diminuindo o risco de perdas e complicações a sua saúde, como proporcionar a redução na produção de gametócitos (forma evolutiva capaz de infectar o mosquito vetor), interrompendo assim a cadeia de transmissão da doença. A resistência dos parasitos à quimioterapia surge como um grande revés ao tratamento dos doentes (HASTINGS e DONNELLY, 2005).

Como estratégias no controle ao avanço da malária recomendam-se, aliadas ao rápido diagnóstico e quimioterapia eficaz, a adoção de medidas de proteção contra o mosquito vetor, principalmente em áreas de risco de contrair a moléstia. Podem ser citadas como medidas individuais a utilização de telas nas portas e janelas, emprego de mosquiteiro impregnado com inseticida e evitar a exposição em

horário de pico. Como medidas de proteção coletivas podem ser citadas a drenagem, obras de saneamento para eliminação de criadouros do vetor, aterro, melhoramento de moradias e informação à população (MS, 2012).

Apesar do conhecimento disponível sobre a doença, o que se vê na prática são as altas taxas de morbidade e mortalidade que persistem ao longo dos anos. Constituem as maiores causas deste quadro a falta de progresso no desenvolvimento uma vacina eficaz (BOYLE et al., 2010), o diagnóstico que, muitas vezes, é tardio ou inacessível e a resistência dos mosquitos transmissores aos inseticidas disponíveis (NA-BANGCHANG e KARBWANG, 2009). É importante se destacar a resistência dos parasitos ao arsenal de drogas para tratamento dos doentes e o pouco interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver fármacos eficientes e acessíveis, tendo em vista que a malária acomete principalmente populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, localizadas, majoritariamente, nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Esta série de fatores associados à doença permite entender o porquê de a malária se destacar como principal flagelo da humanidade (FOYE, LEMKE e WILLIAMS, 1995; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

1.2 Distribuição da doença no mundo e no Brasil

A malária atinge cerca de 104 países tropicais e subtropicais (WHO, 2012), ocorrendo principalmente na África, no sudeste da Ásia e na América do Sul. Sua incidência maior é no continente africano, ao sul do deserto do Saara, onde ocorrem 80% do total de casos e mortes por malária do mundo (REINERS et al., 2010) (**Figura 4**). Cerca de 3,1 bilhões de pessoas vivem em área de risco de transmissão da doença, sendo 86.848.568 casos confirmados e 106.820 mortes (WHO, 2012).

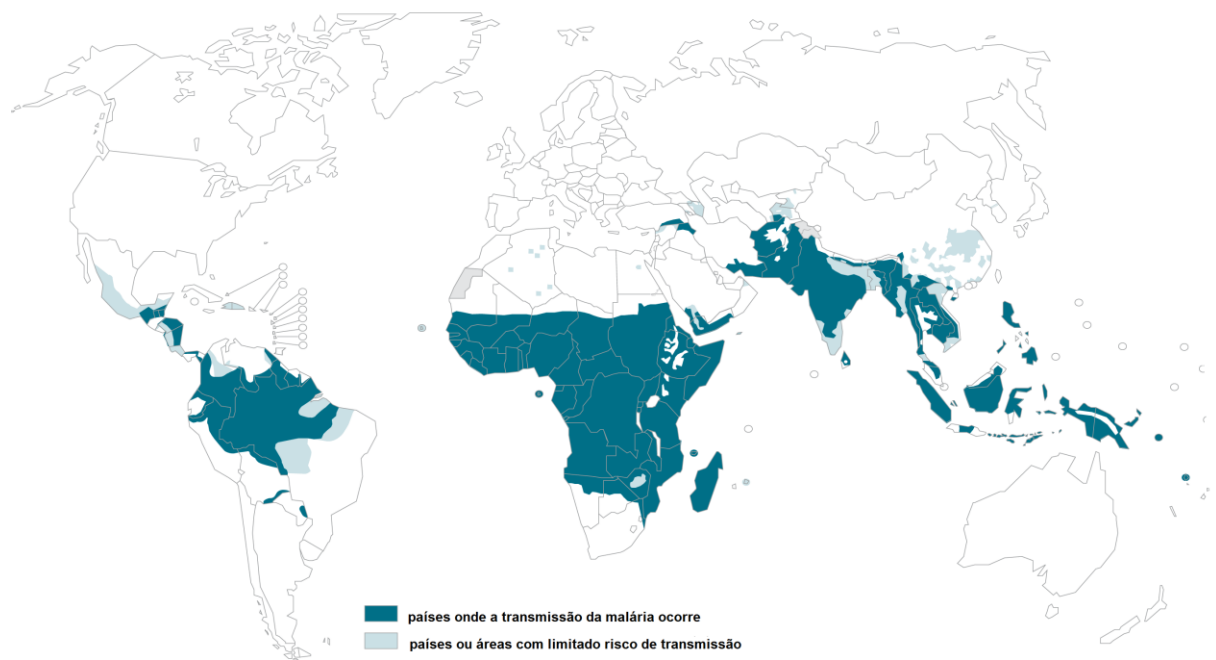


Figura 4- Países ou áreas de risco de transmissão da malária em 2011.
(Adaptada de: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2011.png).

No Brasil, o desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, extração de madeira e mineração. Nesta região, as precárias condições socioeconômicas determinaram a rápida expansão da doença, cujo número de casos passou de 52.469 ocorrências em 1970, para 169.871, em 1980. Na década de 90, o número de episódios de malária aumentou de forma preocupante, atingindo sua maior incidência em 1996, quando 632.813 casos clínicos foram registrados. Destes, 99,7% ocorreram na Amazônia Legal (que compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (TAUIL et al., 1985; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Diante da gravíssima situação, no ano de 2000, o Ministério da Saúde adequou suas ações de controle para a doença nos estados e municípios brasileiros, com a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) (MS-SVS, 2003). Em 2002, observou-se o maior declínio dos casos de malária dos últimos 40 anos. Foram 349.896 casos, uma queda de 45,1% em relação a 1999. Em 2003, o número de casos continuou diminuindo, com 13% de redução. No entanto, no ano de 2004, voltou-se a observar aumento nos números da doença no país, com 459.000 casos e este número continuou a aumentar em 2005, quando foram registrados 597.000 episódios clínicos e dezenas de mortes (MS, 2008).

Apesar dos números de casos notificados permanecerem alarmantes, porém em declínio em relação ao ano de 2005, a WHO (2012) enquadrou o Brasil como em fase de controle da doença, apresentando no ano de 2011, 267.045 casos confirmados e 70 mortes, sendo grande parte destas na região extra-amazônica. Atualmente, as estratégias do governo brasileiro no combate à malária concentram-se em diagnóstico rápido, tratamento precoce e efetivo, além de distribuição de mosquiteiros impregnados de longa duração (MILD) (BRASIL, 2012; BRASILSUS, 2012). A doença continua a ocorrer predominantemente na Amazônia Legal (99% dos casos), prevalecendo episódios de infecções por *P.vivax* (87%), seguido de *P.falciparum* (~13%) e por último infecções mistas e casos de infecção por *P.malariae* que, juntos, totalizam cerca de 0,05% dos casos (WHO, 2012).

1.3 Quimioterapia antimalárica

O tratamento da malária tem sido realizado há anos utilizando drogas em grande parte tóxicas para o homem. Além disso, a cada ano o parasito apresenta resistência a um número maior de drogas usadas (SCHLITZER, 2008; NABANGCHANG e KARBWANG, 2009). Suas estruturas químicas se encontram representadas na **Figura 5**.

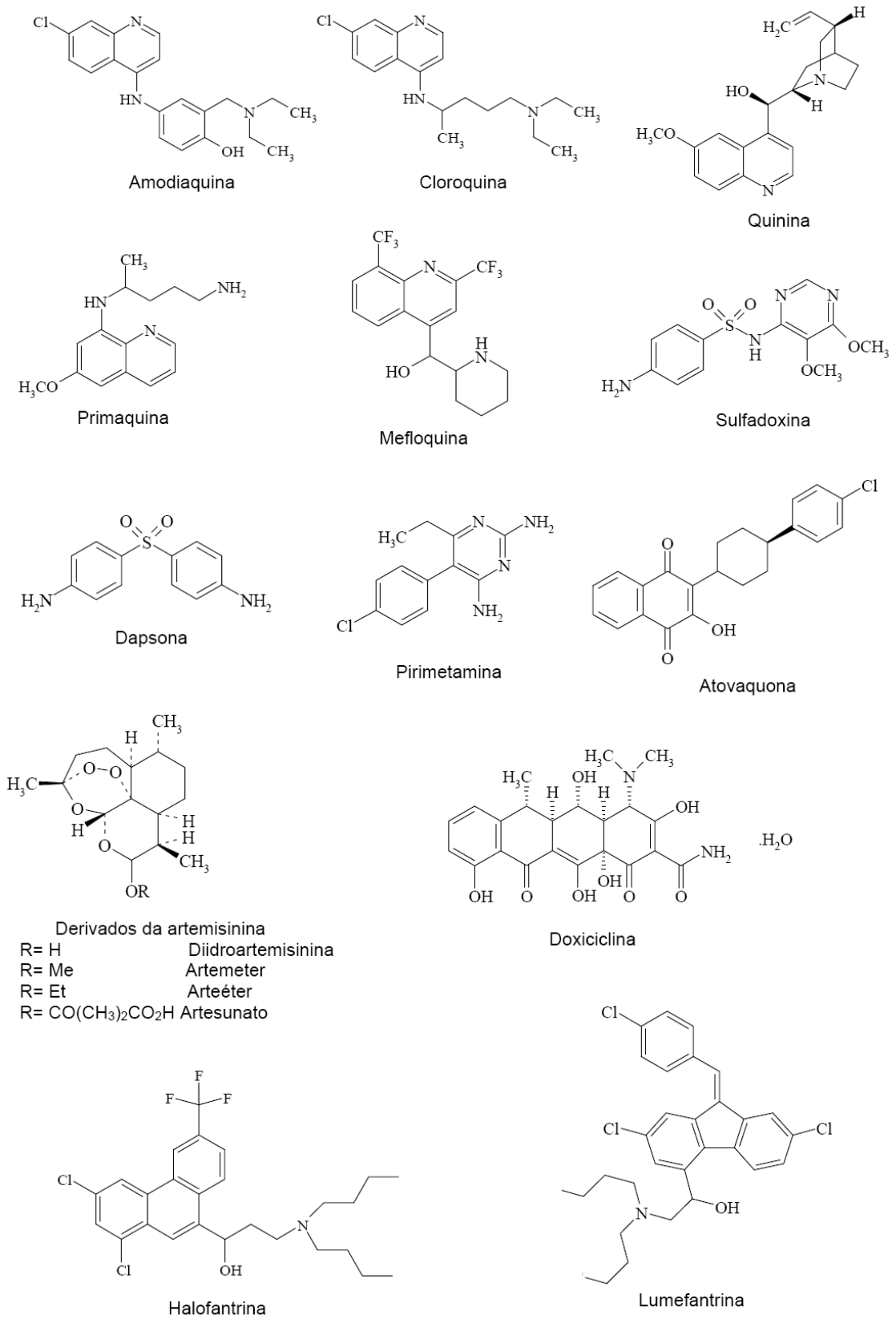


Figura 5- Estrutura química dos principais antimaláricos.

Índios da América do Sul utilizavam a casca da *Cinchona* como medicamento tradicional para malária, muito antes que qualquer tratamento estivesse disponível na Europa. Em 1820, químicos franceses identificaram o alcalóide quinina como o ingrediente ativo da casca da *Cinchona* (RUSSELL,1955). Logo após esta descoberta, seu uso espalhou-se rapidamente na Europa, América do Norte e Ásia, sendo reduzido devido à alta toxicidade e surgimento de cepas de *P.falciparum* resistentes (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Durante a Segunda Guerra Mundial, utilizando como base o azul de metileno, foi sintetizada a cloroquina (CQ). Este medicamento foi utilizado como referência de tratamento e profilaxia da malária devido ao seu baixo custo de síntese, alta eficácia e baixa toxicidade, até surgimento de resistência (WELLEMS e PLOWE, 2001; HASTINGS, 2004). O uso profilático da CQ em larga escala levou à resistência dos parasitos. No Brasil, por exemplo, a CQ foi misturada ao sal de cozinha e distribuída à população exposta à malária como uma medida desesperada para o controle da doença. Esta prática foi amplamente disseminada em locais onde a doença era endêmica, como África e toda a América Latina (SILVA e HOCHMAN, 2011). Na tentativa de se recuperar a eficácia terapêutica da CQ, foi desenvolvida, através de modificações estruturais, a amodiaquina, uma alternativa para tratamento da malária causada por *P. falciparum* resistente à CQ (TAYLOR e WHITE, 2004). No entanto, esta droga apresenta baixa efetividade e maior toxicidade que sua referência (OLLIARO et al., 1996). Ambas são 4-aminoquinolinas, atuantes sobre as formas eritrocíticas dos parasitos e, os possíveis mecanismos de ação destes compostos incluem a interação com o DNA, inibição da síntese de proteínas, da fosfolipase vacuolar e da detoxificação do parasito (STEPHEN e STUART, 2000; SULLIVAN, 2002 e FITCH, 2004).

Aril-aminoálcoois derivados de quinolina incluem, além da já citada quinina, a lumefantrina, mefloquina e halofantrina (SCHLITZER, 2008). Estas duas últimas foram usadas em monoterapias no tratamento de plasmódios resistentes à CQ, porém a resistência a elas se desenvolveu rapidamente. Efeitos adversos como complicações gastrointestinais, tonturas e efeitos psicológicos estão associados ao uso da mefloquina. Halofantrina é contra-indicada para pacientes com doenças cardíacas. Lumefantrina apresenta menor atividade antimalárica que halofantrina, porém não é associada a problemas cardíacos (EZZET et al., 2000). Estudos indicam que esta classe de compostos age nos fosfolipídeos da membrana do

vacúolo digestivo, promovendo a peroxidação lipídica e inibindo algumas vias de transporte de íons, como a de cálcio, comprometendo a degradação da hemoglobina (heme), levando à morte do parasito (FITCH, 2004).

A primaquina é ativa contra hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* e *P. ovale*, atuando também sobre os gametócitos de *Plasmodium sp*, mas tem pouca ou nenhuma ação contra estágios eritrocíticos do parasito. Devido à capacidade de causar estresse oxidativo nas células, esta 8-aminoquinolina deve ser evitada por pacientes deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), pela capacidade de ocasionar anemia hemolítica (TAYLOR e WHITE, 2004; HOWES et al. 2012). Seu modo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que a primaquina interfira na replicação do DNA, transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e na produção de radicais livres que são tóxicos ao parasito (LOPEZ-ANTUÑANO, 1999; FERREIRA, GOMES e VIEIRA, 2011).

Antifolatos podem atuar como esquizonticidas sanguíneos, porém a resistência dos parasitos a estes fármacos é alta, além de serem tóxicos, de baixa tolerância e absorção para o homem (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008). São divididos em 2 grupos. No primeiro grupo são encontrados compostos competidores do ácido paraminobenzóico (PABA), como sulfonas e sulfonamidas. Atuam inibindo a enzima di-hidropteroato sintase (DHPS), interrompendo a formação de di-hidropteroato, essencial para síntese de ácidos nucleicos do parasito. O segundo grupo liga-se preferencialmente à enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), interferindo na capacidade de *Plasmodium* em converter ácido di-hidrofólico em tetra-hidrofólico, que é um cofator importante no processo de síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos. Nesse grupo se encontram os compostos pirimetamina e trimetoprima (YUTHAVONG, 2002).

As biguanidas têm um mecanismo de ação semelhante ao da pirimetamina. O mais importante destes compostos, o proguanil, é um pró-fármaco que é metabolicamente modificado a cicloguanil. Este composto é pouco tóxico e é útil como agente profilático, destruindo parasitos durante a passagem para a corrente sangüínea antes que invadam as hemácias. Esse fármaco tem sido utilizado juntamente com a CQ principalmente em viajantes não-imunes à doença e em áreas onde o nível de resistência a essa última é moderado (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Artemisinina e seus derivados como arteéter, arteméter, artesunato e dihidroartemisinina são endoperóxidos altamente potentes com capacidade de promover a rápida eliminação dos parasitos, atingindo formas sanguíneas e gametócitos, além de possuírem baixa resistência cruzada com outros antimaláricos. Sua maior limitação é a meia-vida curta, por isso são utilizadas em associações com outros antimaláricos de ação mais lenta, em terapias de combinações baseadas em artemisinina (ACTs). Acredita-se que sua atividade resida na clivagem da ligação endoperóxido pelo heme liberado durante o metabolismo da hemoglobina, formando radicais livres, conduzindo à alquilação de biomoléculas do parasito (KRISHNA, UHLEMANN E HAYNES, 2004; KLONIS et al., 2011). Outro efeito deletério aos plasmódios ocasionado pela geração de radicais livres é a rápida perda do potencial de membrana mitocondrial, o que determina a morte do parasito (WANG et al., 2010b). Recentemente, foi sugerido um mecanismo de ação alternativo, o qual se baseia na inibição de cálcio ATPase dos plasmódios (SERCA) (WOODROW, HAYNES e KRISHNA, 2005). Como exemplos de ACT, podem ser citadas a combinação de arteméter/lumefantrina e artesunato/mefloquina, usadas no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum* (WHO, 2010b).

Antibióticos apresentam atividade antiplasmodial através de sua interferência na síntese de proteínas necessárias à funcionalidade do apicoplasto do parasito. Os antibióticos não exercem efeitos imediatamente após o contato inicial com *Plasmodium*, mas após a replicação destes parasitos (progenia), ocorre sua morte após a invasão celular, devido à perda irreversível desta organela, que não pode ser gerada *de novo*, comprometendo assim a biossíntese de ácidos graxos e precursores isoprenóides (SHIMIZU et al. 2010; YEH e DERISI, 2011). Como exemplo da aplicação desta classe de medicamentos tem-se doxiciclina combinada com quinina ou com artesunato, usada tanto no tratamento de malária não complicada quanto na malária grave (WHO, 2010b). Até o momento, nenhuma resistência de *Plasmodium* aos antibióticos foi relatada.

1.4 Busca pela ampliação do arsenal de antimaláricos

A resistência dos parasitos causadores da malária a praticamente todas as drogas atualmente em uso torna urgente a expansão do arsenal de antimaláricos disponíveis (WENGELNIK et al., 2002; KOUZNETSOV e GOMEZ-BARRIO, 2009).

Novos antimaláricos podem ser descobertos através da pesquisa da existência de atividade antiplasmodial em drogas utilizadas no tratamento de outras doenças (NZILA et al., 2010). Antifolatos e atovaquona são bons exemplos na ilustração desta técnica, conhecida como *piggy back* (NA-BANGCHANG e KARBWANG, 2009). Os antifolatos e outros antibióticos foram desenvolvidos inicialmente por sua propriedade antibacteriana e mais tarde tiveram sua ação antimalárica identificada (SHIMIZU et al., 2010). Atovaquona foi inicialmente caracterizada como um antimalárico, mas seu desenvolvimento foi impulsionado pela descoberta de sua atividade contra *Pneumocystis carinii* (NA-BANGCHANG e KARBWANG, 2009). Já foi citado o exemplo da doxiciclina, que atualmente vêm ganhando espaço no tratamento da malária, assim como medicamentos antitumorais, dentre outros.

Outra maneira interessante de se descobrir novas drogas é através da síntese de compostos híbridos (BENOIT-VICAL et al., 2007; COSLÉSDAN et al., 2008). Segundo Muregi e Ishih (2010), há uma série de vantagens na geração destes análogos, como a redução do risco de interações adversas droga-droga, os custos de síntese são reduzidos, além dos compostos gerados apresentarem capacidade de driblar a resistência dos parasitos, assim como é desejado na terapia de combinação de fármacos. Sabe-se que a frequência de resistência de *P. falciparum* é estimada de 1 em 10^{10} parasitos e a carga parasitária média em um indivíduo altamente infectado é de 10^{12} . Assim, a combinação de dois ou mais agentes farmacofóricos com diferentes mecanismos de ação, seja em um mesmo comprimido ou em uma mesma molécula, reduz drasticamente a probabilidade do surgimento da resistência (WHITE, 1999).

1.5 Compostos testados neste estudo

Utilizando estratégias racionais como as descritas no tópico acima, foram selecionados grupos químicos que já apresentavam atividades biológicas descritas na literatura, a fim de sintetizar novos compostos para investigação de atividade antimalárica.

A sobrevivência dos parasitos no interior dos eritrócitos é altamente dependente da digestão da hemoglobina, dentro do seu vacúolo digestivo (VD). A molécula de hemoglobina, que possui cadeias laterais de aminoácidos e um grupo ferro na porção central, sofre a ação de enzimas proteolíticas (BANERJEE e GOLDBERG, 2001) no VD. Durante o catabolismo da hemoglobina, sua porção protéica (globina) é utilizada como fonte de aminoácidos por *Plasmodium* e a sua porção central contendo ferro, denominada ferriprotoporfirina IX (FP IX), é liberada concomitantemente a uma molécula de oxigênio. Ao longo deste processo o ferro é oxidado de Fe²⁺ para Fe³⁺, possibilitando sua ligação com oxigênio. Esta unidade denominada heme, junto com sua forma dimérica, a hematina, originam um grupo reativo e tóxico para o parasito (SULLIVAN, 2002). Sendo assim, o *Plasmodium* deverá realizar sua detoxificação, gerando um produto não-tóxico denominado hemozoína. As 4-aminoquinolinas em pH fisiológico encontram-se desprotonadas, mas no VD, como o pH é ácido, torna-se protonada, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática, formando complexos com a FP-IX, impedindo sua detoxificação (KOUZNETSOV e GOMEZ-BARRIO, 2009). Sulfonamidas possuem ação antimalárica por atuarem como antagonistas do folato (OLLIARO, 2001). Hidrazidas têm reconhecida ação analgésica, antimicrobiana, antiinflamatória e antitumoral (ROLLAS e KUÇUKGUZEL, 2007). Devido à resistência dos parasitos às 4-aminoquinolinas, um grupo de compostos híbridos foi sintetizado a partir de sua conjugação às sulfonamidas ou às hidrazidas, promovendo diversas modificações estruturais a fim de se observar as variações de sua atividade antiplasmodial em função destas mudanças.

Um segundo grupo de moléculas baseou-se na incapacidade dos protozoários de sintetizar purinas *de novo*, o que torna as enzimas envolvidas no processo de recuperação das purinas um atrativo alvo quimioterápico (CRAIG e EAKIN, 1997). Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) é a enzima-chave para este resgate. 6-mercaptapurinas interferem com a produção de ácidos nucleicos e aminoácidos essenciais para a sobrevivência do parasito (SHIVASHANKAR, SUJAY-SUBBAYYA e BALARAM, 2001). Os 1,2,3-triazóis e seus

derivados são uma importante classe de componentes aromáticos heterocíclicos contendo nitrogênio, que têm atraído grande interesse devido a suas diversas propriedades biológicas como antituberculose, antiviral, antifúngica, antitumoral e antibacteriana, além de ser de fácil síntese. Os 1,2,3-triazóis são estáveis à degradação metabólica e capazes de se ligar ao hidrogênio, o que pode ser favorável à ligação a alvos biomoleculares (CORRALES et al., 2010; WANG, WAN e ZHOU, 2010). Esteroides são potenciais carreadores de moléculas a eles hibridizadas, aumentando a estabilidade metabólica, absorção intestinal e permeabilidade celular (ENHSEN, KRAMER e WESS, 1998). Vários agentes antivirais e antitumorais têm sido conjugados a esteroides visando aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos, permitindo a redução da dose terapêutica, minimizando efeitos colaterais (SIEVÄNEN, 2007). Foram sintetizados diversos análogos de 6-mercaptopurinas associados aos triazóis ou aos esteroides para verificação de ação antimalárica.

2 JUSTIFICATIVA

A malária permanece ao longo dos anos como emergência global em saúde pública. São aproximadamente 87 milhões de casos e 106.820 mortes ocorridas anualmente no mundo (WHO, 2012).

As principais estratégias atuais no controle da doença se baseiam no diagnóstico precoce e tratamento adequado e oportuno dos casos, devendo ser considerada a resistência dos parasitos a praticamente todos os fármacos atualmente em uso, o que torna urgente a busca por novos antimaláricos. (WENGELNIK et al., 2002; KOUZNETSOV e GOMEZ-BARRIO, 2009). Atualmente, a WHO recomenda o uso de ACTs, porém já há relatos de resistência à artemisinina descritos na literatura, o que torna necessária a descoberta por novos antimaláricos (NOEDL et al., 2008; DONDORP et al., 2009).

O presente trabalho foi em busca de novas drogas que possam atuar como possíveis alternativas no combate à doença, através da avaliação da atividade antimalárica de compostos obtidos pela conjugação de dois agentes farmacofóricos em uma mesma molécula. Também foi verificada sua citotoxicidade e atividade hemolítica, tendo em vista que, para que um composto seja considerado promissor, além de eficácia na eliminação dos parasitos é fundamental a segurança aos usuários (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimalárica de análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimalárica de análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas *in vivo*, utilizando teste supressivo de Peters e modelo murino de infecção por *P. berghei*;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica dos compostos testados utilizando macrófagos peritoneais murinos;
- Analisar *in vitro* a atividade hemolítica dos compostos em hemácias humanas não infectadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos compostos químicos analisados

Os compostos foram sintetizados e selecionados pelo grupo do Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. As nomenclaturas, estruturas químicas e código atribuído a cada um deles se encontram relacionados nas **Tabelas 1 e 2**.

4.2 Testes *in vivo*

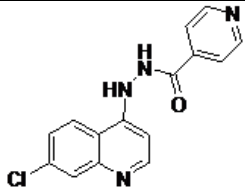
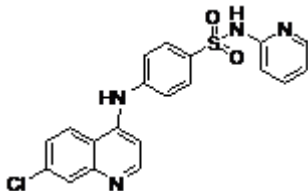
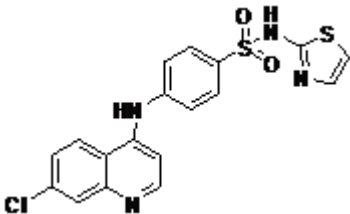
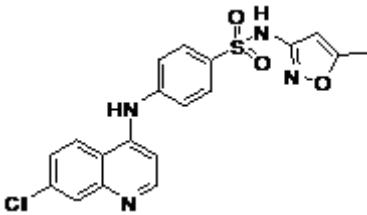
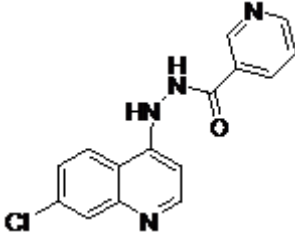
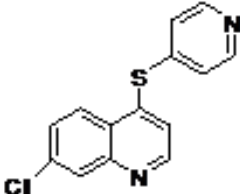
4.2.1 Animais

Foram utilizados nestes experimentos camundongos Suiços outbreed, fêmeas, pesando 25 ± 2 g, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob processo aprovado no Comitê de Ética nº 054/2010-CEUA e 055/2010-CEUA. Os animais receberam água e ração própria para roedores *ad libidum*.

4.2.2 *Plasmodium berghei*

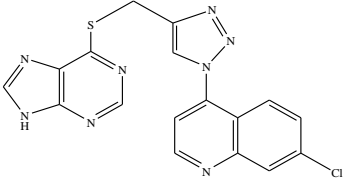
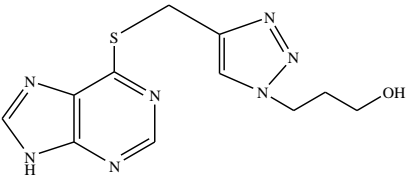
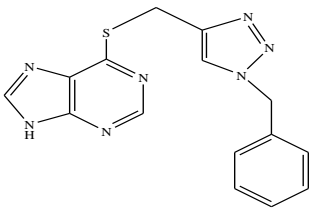
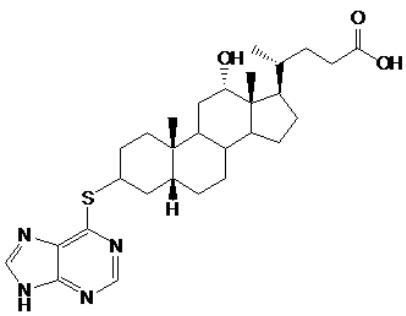
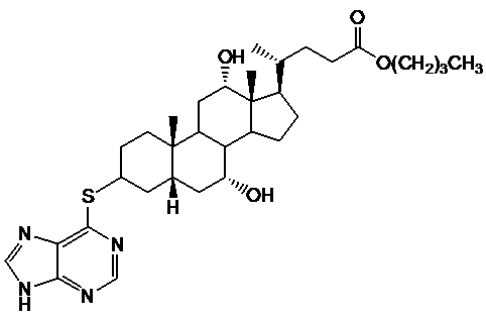
Foi utilizado nos experimentos *P.berghei* cepa NK 65. Esta cepa foi mantida em camundongos Suiços através da passagem semanal. Aproximadamente 4 μ L do sangue proveniente de um animal infectado era diluído em solução salina, sendo inoculada 0,2mL desta solução por via intraperitoneal em animal não infectado.

Tabela 1- Estrutura dos análogos de 4-aminoquinolinas.

Nome químico	Estrutura	Código
4-(isonicotinohidrazida)- 7-cloroquinolína		1
4-[(<i>p</i> -aminobenzenosulfonamida- <i>N</i> ¹ -(2'-piridinil)]-7-cloroquinolína		2
4-[(<i>p</i> -aminobenzenosulfonamida- <i>N</i> ¹ -(2'-tiazolil)]-7-cloroquinolína		3
4-[(<i>p</i> -aminobenzenosulfonamida- <i>N</i> ¹ -(5'-metil-3'-isoxazolil)]-7-cloroquinolína		4
4-(nicotinohidrazida)-7-cloroquinolína		5
7-cloro-4-mercapto(4-piridinil)quinolína		6

Compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2- Estrutura dos análogos de 6-mercaptopurina contendo 1,2,3-triazol ou esteroide.

Nome químico	Estrutura	Código
4-(4-((9 <i>H</i> -purin-6-iltio)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-7-cloroquinolina		7
3-(4((9 <i>H</i> -purin-6-iltio)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)1-propanol		8
6-((1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metiltio)-9 <i>H</i> -purina		9
ácido 4- (3-(9 <i>H</i> -purin-6-iltio)-12-hidroxi-10,13-dimetil-1 <i>H</i> -ciclopentafenantren-17-il)pentanoico		10
4-(3-(9 <i>H</i> -purin-6-iltio)-7,12-di-hidroxi-10,13-dimetil-1 <i>H</i> -ciclopentafenantren-17-il) pentanoato de butila		11

Compostos **7**, **8**, **9**, **10** e **11**.

4.2.3 Solubilização dos compostos para testes *in vivo*

Para realização dos ensaios *in vivo*, as drogas foram solubilizadas de acordo com suas propriedades químicas. As drogas-teste foram diluídas em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 5% e a CQ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água. Com o intuito de se realizar uma triagem inicial da atividade antimalárica, os compostos foram testados a 10 mg/Kg, sendo a mesma concentração utilizada para a CQ. Todas as soluções foram preparadas no dia da realização do experimento.

4.2.4 Teste de drogas

Foi utilizado o teste supressivo de Peters (PETERS, 1965), onde em cada animal foi inoculado, via intraperitoneal, 10^5 hemácias parasitadas por *P.berghei*, considerando o dia da infecção como 1° dia do experimento. Imediatamente após a infecção, os animais foram aleatoriamente divididos em gaiolas contendo de três a cinco animais cada. Nos experimentos foram utilizados dois grupos controle: um tratado com CQ e outro não tratado, onde os animais receberam apenas água + DMSO 5% ao invés da droga. O tratamento foi iniciado no mesmo dia da infecção, tanto para os compostos testados quanto para os controles, realizado via oral após 5 horas da infecção e prosseguindo a cada 24 horas, seguindo por 4 dias consecutivos.

4.2.5 Contagem da parasitemia

A parasitemia foi avaliada nos 5°, 7°, 9° e 12° dias após a infecção por meio da contagem dos parasitos em esfregaços sanguíneos, fixados por metanol e corados com Giemsa, observados em microscópio óptico, utilizando objetiva de 1.000 X. A parasitemia foi determinada pelo número de hemácias infectadas usando como universo a quantidade de hemácias totais que varia de acordo com uma estimativa inicial de parasitemia:

- < 5%: 4 mil hemácias;
- 5-10%: 3 mil hemácias;
- 10-20%: 2 mil hemácias e;
- > 20%: 1 mil.

4.2.6 Percentual de Inibição da Multiplicação dos Parasitos

A capacidade dos compostos testados de realizar a supressão da parasitemia dos camundongos infectados foi determinada pela comparação com a parasitemia do grupo controle não tratado, através da fórmula (CARVALHO et al., 1991): $[(A-B)/A] \times 100$, onde: A= parasitemia média do grupo controle não tratado e B= parasitemia média do grupo teste. Uma redução de pelo menos 30% do crescimento dos parasitos foi considerada como indicador de amostra ativa (CARVALHO et al., 1991; ANDRADE-NETO et al., 2003).

4.2.7 Sobrevida dos animais

Com o intuito de se obter dados sobre a sobrevivência dos animais em decorrência do tratamento com os compostos avaliados, os camundongos foram acompanhados até a morte.

4.3 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio foi realizado segundo Pieters et al. (1988). A fim de se verificar *in vitro* a citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais dos camundongos Suíços. Os macrófagos foram estimulados com 2 mL de tioglicolato estéril (3%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 72 horas antes dos camundongos serem sacrificados. O lavado peritoneal de cada animal foi realizado com 5mL de Meio 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm (centrífuga clínica, FANEM Mod. 204N), o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer para estimativa do número total de células. Após contagem, foram adicionados em uma placa de 96 poços 2×10^5 células/poço em meio RPMI-1640, suplementado com 10% SBF (Cultilab, Brasil). A placa foi incubada 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C para ocorrer aderência dos macrófagos. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril, foi preenchido com meio RPMI-1640 com 10% SBF e os compostos a serem testados foram adicionados nas concentrações de 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 µM. As células foram mantidas em estufa à 37°C, 5% de CO₂. Após

48 horas, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método colorimétrico com 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT; Sigma, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Para tal, 10 μ L de MTT a 5 mg/mL foi adicionada aos poços. Após 2 horas, a reação foi interrompida pela adição 100 μ L de uma solução contendo isopropanol/ácido clorídrico. A citotoxicidade foi calculada com base na diferença óptica obtida mediante leitura das placas em espectrofotômetro a 570 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). Nos poços usados para controle não houve adição de compostos. A citotoxicidade foi expressa pela razão:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = \left(\frac{\text{Leitura média dos compostos}}{\text{Leitura média dos controles}} - 1 \right) \times 100$$

Foram considerados citotóxicos os compostos em concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade celular em relação ao controle não incubado com os compostos.

4.4 Análise da atividade hemolítica dos compostos

O ensaio foi realizado segundo Wang et al. (2010a). Os compostos foram diluídos em solução de DMSO a 0,005% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo os mesmos testados nas concentrações de 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL. Após a diluição dos compostos em microplaca de fundo em U, foram retirados 20 μ L destes, colocados em microtubos para centrífuga e adicionados a 180 μ L de uma suspensão de eritrócitos humanos a 1%. Uma solução de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 1% foi utilizada como controle positivo do teste, pela capacidade de gerar 100% de hemólise. O controle negativo foi a própria suspensão de eritrócitos, onde não há hemólise. Os microtubos para centrífuga foram então encubados por 12 horas a 37°C, sendo posteriormente centrifugados a 1000g por 10 minutos e seus sobrenadantes transferidos para uma microplaca de fundo chato. Cada concentração dos compostos foi avaliada em duplicata. A leitura foi realizada a 540nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). A taxa de hemólise das amostras foi calculada como:

$$\% \text{ Hemólise} = \left(\frac{\text{Leitura média dos compostos} - \text{Leitura média do branco}}{\text{Leitura média dos controles com saponina}} \right) \times 100$$

4.5 Análise estatística

Para análise estatística dos dados *in vivo* foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA), sendo utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre duas amostras independentes. Resultados de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

Para os testes *in vitro*, os dados de dois experimentos distintos foram expressos como média \pm desvio padrão.

Os valores de CC_{50} representados no ensaio de citotoxicidade (MTT) foram determinados pelo programa estatístico Probit, o qual utilizou o método proposto por Litchfiet e Wilcoxon, considerando a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Análogos de 4-aminoquinolinas

5.1.1 Supressão da parasitemia

De acordo com os valores de supressão da parasitemia expressos na **Tabela 3** e na **Figura 6**, pode-se observar que dentre os derivados de 4-aminoquinolinas avaliados, os compostos **1**, **5** e **6** mostraram-se promissores antimaláricos, sendo que o análogo **1** exibiu maior capacidade de suprimir a parasitemia nos primeiros após a infecção (55% e 46% de supressão nos dias 5 e 7, respectivamente). Já os compostos **5** e **6** foram eficientes na supressão da parasitemia nos últimos dias analisados, destacando-se o análogo **5**, que alcançou 81% de inibição no 12° dia.

Tabela 3- Supressão da parasitemia *in vivo* induzida pelo tratamento com os análogos de 4-aminoquinolinas contra *Plasmodium berghei* NK65^a

Composto	Dose (mg/kg)	Supressão da parasitemia (%) por dia			
		5°	7°	9°	12°
1	10	55*	46*	4	16
2	10	31	44*	0	0
3	10	24	0	2	0
4	10	54*	42	8	0
5	10	10	52	52	81*
6	10	0	61	79*	65
CQ	10	97*	73*	81*	86*

^a n = 5 camundongos por grupo; *p < 0,05 em relação ao controle não tratado.

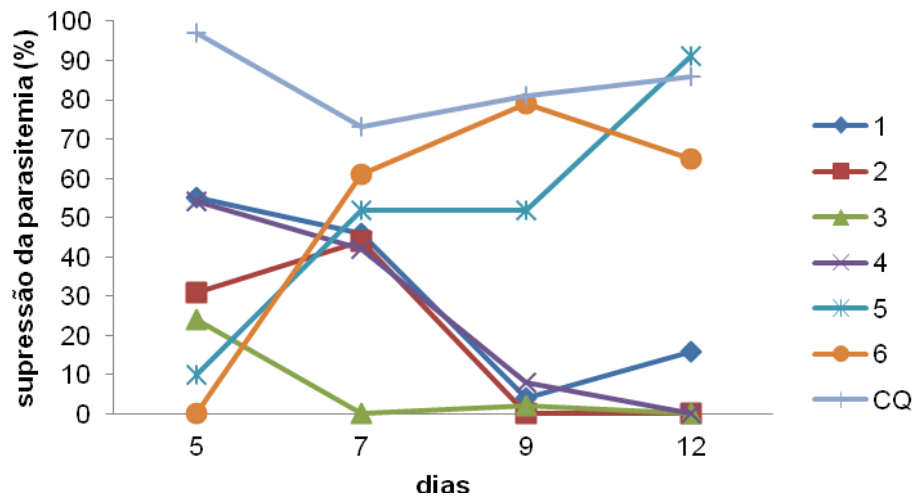


Figura 6- Supressão da parasitemia de camundongos infectados por *P. berghei*, tratados com os análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nos dias pós-infecção.

5.1.2 Sobrevivência

A sobrevivência dos camundongos em função do tempo foi monitorada (Tabela 4 e Figura 7). No dia 21, haviam três animais nos grupos tratados com os compostos 1, 2, 3 e 4. Neste mesmo dia, haviam quatro animais no grupo que recebeu CQ e um no grupo que recebeu H₂O + DMSO 5%. Todos os camundongos morreram em até 30 dias pós-infecção.

Tabela 4- Sobrevivência dos animais infectados por grupo^a

Composto	Dias pós-infecção (número de animais vivos/ número total de animais no grupo)							
	9	12	15	17	19	21	25	30
1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	0/5
2	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	0/5	0/5
3	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	0/5
4	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	0/5	0/5
5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	1/5	0/5	0/5
6	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5
CQ	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	2/5	0/5
H ₂ O + DMSO 5%	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5

^a n = 5 camundongos por grupo.

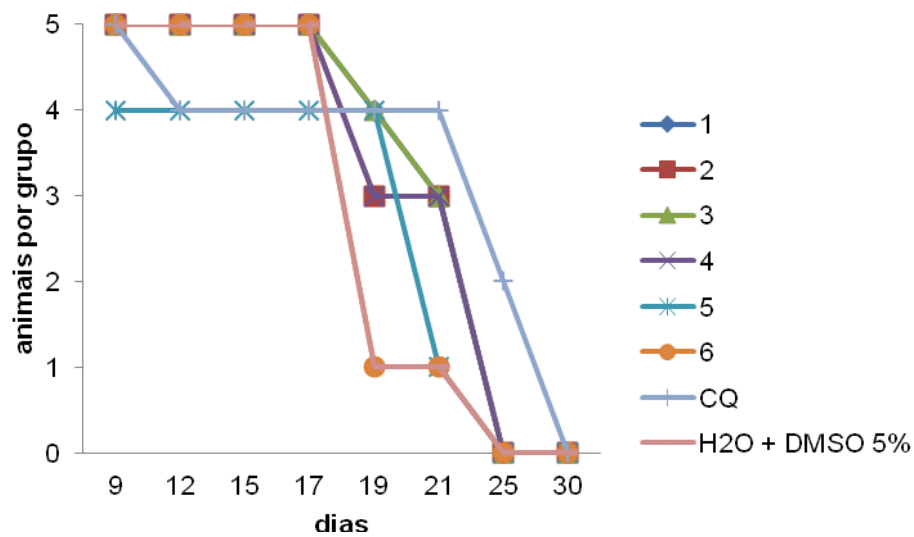


Figura 7- Sobrevivência dos animais infectados por *P. berghei*, tratados com os análogos de 4-aminoquinolinas, CQ e H2O + DMSO 5%, nos dias pós-infecção.

5.1.3 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Nenhum dos compostos desta série apresentou citotoxicidade pronunciada em macrófagos murinos, sendo observados percentuais inferiores a 50%, mesmo na maior concentração testada (150 μM). A CQ, droga utilizada como controle do teste *in vivo*, exibiu 42,94% de citotoxicidade nesta mesma concentração (150 μM).

Os resultados se encontram ilustrados na **Figura 8**.

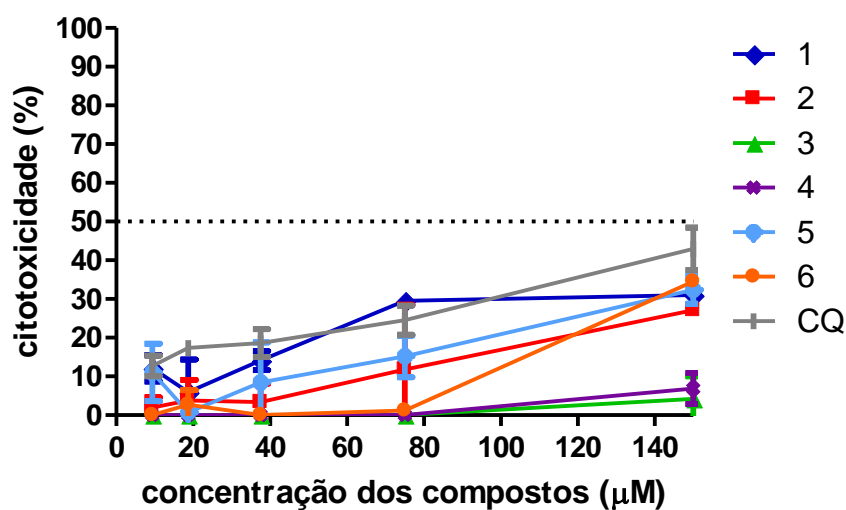


Figura 8- Atividade citotóxica dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nas concentrações de 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 μM , frente a macrófagos peritoneais murinos. Resultado representado em média \pm desvio padrão.

Foi também determinada a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ frente a macrófagos peritoneais murinos. Todos os compostos analisados inclusive a CQ apresentaram CC₅₀ superiores a 150 µM (Tabela 5).

Tabela 5- Concentração citotóxica (CC₅₀) dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ em macrófagos peritoneais murinos.

Compostos	Macrófagos CC₅₀ (µM) (95% I.C.)^a
1	>150,0
2	>150,0
3	>150,0
4	>150,0
5	>150,0
6	>150,0
CQ	>150,0

^aI.C.= Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

5.1.4 Atividade hemolítica dos compostos

Foi avaliada a capacidade dos compostos de hemolisar hemácias humanas normais, não infectadas. O análogo **2** demonstrou pronunciada ação hemolítica (72,94% a 1 mg/mL), seguido de **1**, **3** e **4** (27,39%; 28,83% e 22,22% nesta mesma concentração, respectivamente). Já os compostos **5** e **6** exibiram valores inferiores a 10%. A CQ exibiu 31,75% de hemólise na maior concentração avaliada (1 mg/mL).

A **Figura 9** demonstra os resultados deste ensaio.

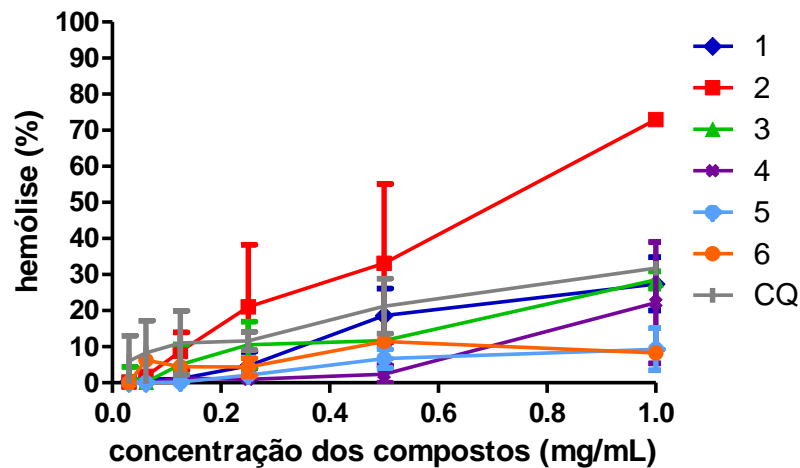


Figura 9- Atividade hemolítica dos análogos de 4-aminoquinolinas e CQ, nas concentrações de 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL, frente a hemácias humanas não infectadas. Resultado representado em média \pm desvio padrão.

5.2 Análogos de 6-mercaptopurinas contendo 1,2,3-triazol ou esteroide

5.2.1 Supressão da parasitemia

Dentre os três análogos de 6-mercaptopurina contendo 1,2,3-triazol, destaca-se o composto **9**, que demonstrou aumento de atividade ao passar dos dias analisados, inibindo o crescimento dos parasitos de forma similar ou até superior à CQ, nos dias 9 e 12 pós-infecção. Para os análogos de 6-mercaptopurina contendo esteroide, o análogo **11**, exibiu baixa atividade no 5º dia e a partir daí apresentou capacidade de suprimir a parasitemia, com 36% de inibição no 9º dia e 66% no 12º dia (**Tabela 6 e Figura 10**).

Tabela 6- Supressão da parasitemia *in vivo* induzida pelo tratamento com análogos de 6-mercaptopurinas contra *Plasmodium berghei* NK65^a.

Composto	Dose (mg/Kg)	Supressão da parasitemia (%) por dia		
		5°	9°	12°
7	10	14	23	24
8	10	25	41	42
9	10	42	73*	68*
10	10	6	19	18
11	10	16	36	66
CQ	10	91*	50	64

^a n = 5 camundongos por grupo (exceto para o composto 11 onde n=3); *p < 0,05 em relação ao controle não tratado.

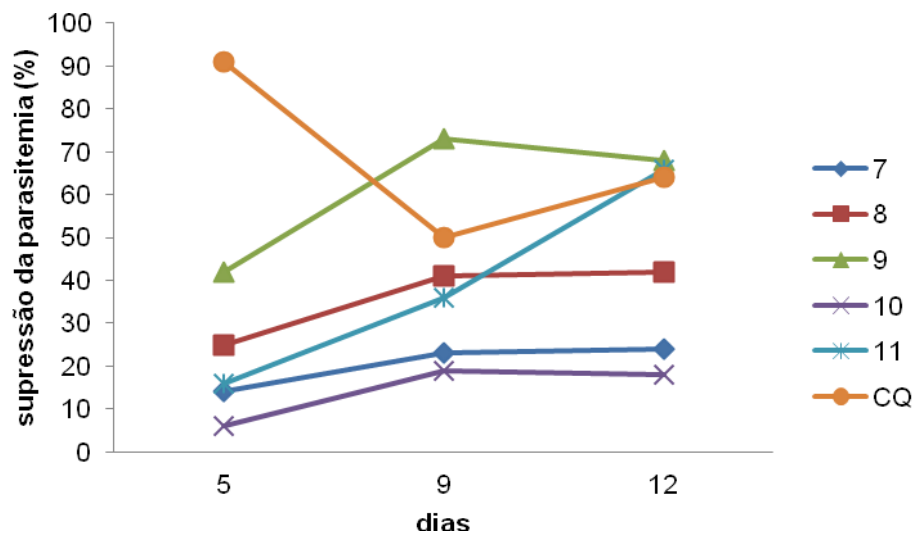


Figura 10- Supressão da parasitemia de camundongos infectados por *P. berghei*, tratados com os análogos de 6-mercaptopurinas e CQ, nos dias pós-infecção.

5.2.2 Sobrevivência

No que diz respeito à sobrevivência, camundongos que receberam os compostos **8** e **9** começaram a morrer no dia 19 pós-infecção, enquanto neste mesmo dia haviam dois animais vivos no grupo que recebeu CQ e um no grupo tratado com H₂O + DMSO 5%. Todos os camundongos morreram até o dia 26 pós-infecção. Os dados se encontram na **Tabela 7** e **Figura 11**.

Tabela 7- Sobrevivência dos animais infectados por grupo^a.

Composto	Dias pós-infecção (número de animais vivos/número total de animais no grupo)							
	9	12	15	17	19	21	23	26
7	4/5	4/5	4/5	4/5	1/5	0/5	0/5	0/5
8	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	1/5	0/5
9	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5
10	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5
11	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
CQ	3/5	3/5	3/5	3/5	2/5	2/5	1/5	0/5
H2O + DMSO 5%	5/5	5/5	4/5	4/5	1/5	1/5	1/5	0/5

^a n = 5 camundongos por grupo (exceto para o composto 11 onde n=3).

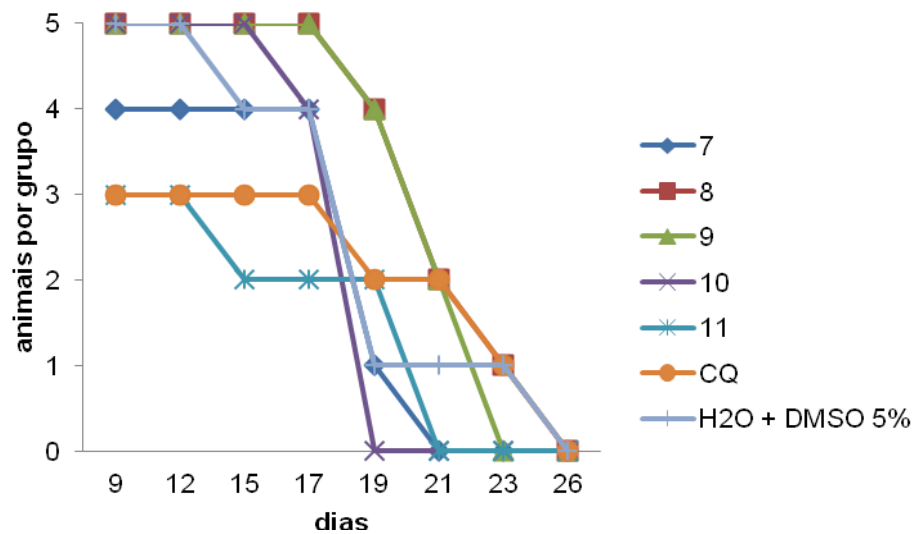


Figura 11- Sobrevivência dos animais infectados por *P. berghei*, tratados com os análogos de 6-mercaptopurinas, CQ e H2O + DMSO 5%, nos dias pós-infecção.

5.2.3 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Os compostos **7** e **8** não apresentaram citotoxicidade significativa, sendo de 16,59% e 8,57% respectivamente, na maior concentração testada (150 μ M). O composto **9** mostrou-se citotóxico, inibindo a viabilidade dos macrófagos em 51,99% a 150 μ M. A CQ exibiu 42,94% de citotoxicidade nesta mesma concentração (**Figura 12**).

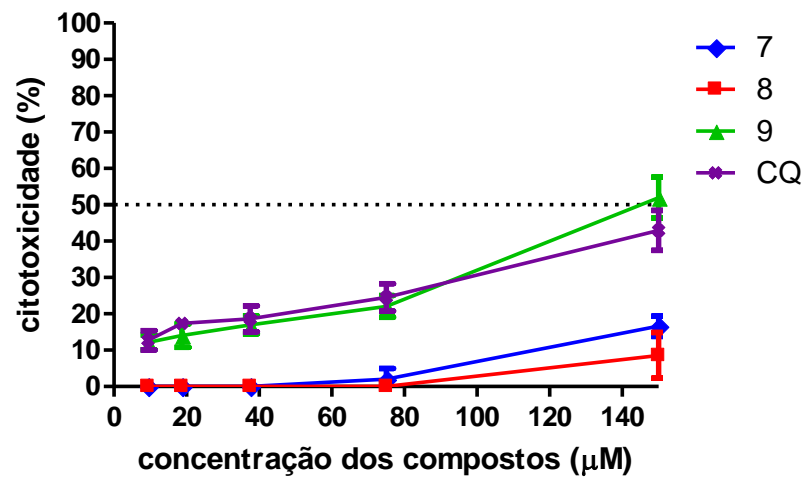


Figura 12- Atividade citotóxica dos análogos de 6-mercaptopurinas e CQ, nas concentrações de 9,4; 18,7; 37,5; 75 e 150 μM , frente a macrófagos peritoneais murinos. Resultado representado em média \pm desvio padrão.

Através da determinação da concentração citotóxica 50% dos análogos de 6-mercaptopurinas e CQ em macrófagos peritoneais murinos, observou-se que o análogo **9** exibiu CC_{50} de 145,75 μM enquanto os demais compostos apresentaram CC_{50} superiores a 150 μM (**Tabela 8**).

Tabela 8- Concentração citotóxica (CC_{50}) dos análogos de 6-mercaptopurinas e CQ em macrófagos peritoneais murinos.

Compostos	Macrófagos CC_{50} (μM) (95% I.C.)^a
7	>150,0
8	>150,0
9	145,75 (117,87-180,23)
CQ	>150,0

^aI.C.= Intervalo de Confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

6 DISCUSSÃO

Em geral, a avaliação da atividade antimalárica de compostos é feita por testes *in vitro* e *in vivo*, que podem ser complementares, pois os dados obtidos pelos testes *in vitro* requerem confirmação em modelos vivos (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010). Ensaios em humanos são de grande complexidade, além de apresentarem grandes limitações como a falta de acesso aos órgãos relevantes ao estudo e incapacidade de manipular experimentalmente o sistema imune do hospedeiro. Devido a estas restrições, na malária experimental são normalmente adotados três modelos de estudo *in vivo*: primatas não-humanos infectados com espécies de parasitos como *P. knowlesi*; aves infectadas com espécies de parasitos representados por *P. gallinaceum* e roedores infectados com espécies de parasitos como *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* and *P. yoelii* (CARLTON; SILVA e HALL, 2005).

O parasito *P. berghei*, específico de roedores, provou ser muito eficiente para estudos de atividade antimalárica, e é geralmente aceito que a infecção desse parasito no camundongo é um modelo válido para rastrear drogas com potencial uso na malária humana (WHO, 1973; PETERS et al., 1975). O modelo *in vivo* é fácil e simples de ser mantido e, portanto muito usado para os testes (KRETTLI; ADEBAYO e KRETTLI, 2009). Além disso, ele pode ser reproduzido e fornece informações úteis sobre a relação estrutura-atividade da droga (LOISEAU e XUONG, 1996).

Sem uma vacina efetiva contra a malária (BOYLE et al., 2010), seu controle exige um programa integrado de estratégias que incluem diagnóstico precoce e o tratamento quimioterápico adequado dos pacientes infectados (WHO, 2010b). Tendo em vista a crescente resistência dos parasitos ao arsenal de antimaláricos disponíveis, se torna urgente a busca por novas drogas que sejam eficazes e seguras (NOEDL et al., 2008; DONDORP et al., 2009; CERVANTES et al., 2012).

Em 1967, a WHO definiu resistência parasitária como: “A habilidade da cepa do parasito de sobreviver e/ou multiplicar-se, a despeito da administração e absorção da droga, dada em doses iguais ou maiores que aquelas normalmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância dos indivíduos” (WHO, 1967). Esta definição posteriormente foi modificada para incluir a sentença: “A forma da droga ativa deve ser capaz de ter acesso ao parasito ou aos eritrócitos infectados

pelo tempo necessário para sua ação normal (BRUCE-CHWATT et al., 1986; WHO, 2010a).

Para superar o desafio da resistência dos plasmódios aos antimaláricos, diversas técnicas estão sendo adotadas como, por exemplo, uso terapias de combinação, desenvolvimento de análogos de drogas existentes e exploração de novos alvos terapêuticos (ROSENTHAL, 2003). Dentre estas técnicas, o uso de híbridos é considerado uma extensão do conceito de terapias de combinação, onde é observada a conjugação de dois grupos farmacofóricos, frequentemente unidos de maneira covalente, criando uma entidade química única capaz de modular múltiplos alvos (BENOIT-VICAL et al., 2007; COSLÉSDAN et al., 2008; SASHIDHARA et al., 2012). A utilização de fármacos híbridos é uma forma interessante de se descobrir novas drogas (BENOIT-VICAL et al., 2007; COSLÉSDAN et al., 2008), possibilitando driblar a resistência dos parasitos, fenômeno este que parece ser composto-específico e não relacionado à mudanças no alvo de ação da droga (CASAGRANDE et al., 2008).

Sendo assim, objetivo principal deste trabalho foi realizar a triagem da atividade antimalárica de 11 compostos inéditos, *in vivo*, sendo 6 análogos de 4-aminoquinolinas e 5 derivados de 6-mercaptapurinas contendo 1,2,3-triazol ou esteroide. Os testes foram conduzidos de acordo com o protocolo de Peters (1965), onde a parasitemia foi avaliada nos dias após a infecção através da contagem dos parasitos em esfregaços sanguíneos, permitindo a determinação da capacidade dos compostos testados em realizar a supressão da parasitemia de camundongos infectados em comparação com a parasitemia do grupo controle não tratado. Foi utilizada a via oral para a administração do fármaco pois esta via aumenta a adesão do paciente ao tratamento e reduz custos adicionais. Em muitos países endêmicos esta é a forma mais frequente de se administrar antimaláricos (RAY et al., 2010).

A análise da relação estrutura-atividade dos compostos derivados de 4-aminoquinolinas mostrou que, dos 6 análogos testados, 3 se apresentaram promissores (compostos **1**, **5** e **6**). Já os aminobenzenosulfonamidas (compostos **2**, **3** e **4**) não exibiram atividade antimalárica significativa, exceto o análogo **4**, com 54% de supressão da parasitemia no 5º dia.

O análogo **1**, que é uma isonicotinohidrazida, com presença de grupo amino na posição 4 do anel aromático, apresentou ação antiplasmodial nos primeiros dias, com supressão da parasitemia de 55% no dia 5, perdendo sua atividade ao longo

dos dias analisados. Por outro lado, o composto **5**, que apresenta em sua estrutura nicotino-hidrazida, com presença de grupo amino na posição 3 do anel aromático, demonstrou atividade crescente ao longo dos dias analisados, alcançando 81% de supressão no dia 12. Este valor foi semelhante ao exibido pela CQ no mesmo dia. O análogo **6**, que é uma mercaptoquinolina com grupo piridinil ligado diretamente ao anel quinolínic, demonstrou bons resultados, suprimindo a parasitemia em torno de 68% a partir do 7º dia.

Sugere-se que a ação antiplasmodial atribuída aos compostos seja devido aos seguintes aspectos: 4-aminoquinolinas são conhecidas por inibir a polimerização de heme, evitando a formação da hemozoína no vacúolo digestivo do parasito. Isto conduz à acumulação de heme livre, que é altamente tóxico para plasmódios (KIRANDEEP et al., 2010). Sulfonamidas competem com o ácido paraminobenzóico (PABA) interrompendo a formação do ácido di-hidrofólico, fundamental para a síntese de ácidos nucleicos, através da inibição da di-hidropteroato sintase (DHPS) (OLLIARO, 2001). A hidrazida do ácido isonicotínico, também conhecida por isoniazida, é considerada uma das drogas de primeira escolha no tratamento da tuberculose. Estudos em modelo murino de infecção por *P. berghei* demonstraram a ação esquizonticida sanguínea das isoniazidas por mecanismo não elucidado, porém associado à redução da carga parasitária e à sobrevivência dos camundongos infectados, quando administradas em associação à rifampicina ou ao etambutol/rifampicina (ADITYA; PATANKAR e MADHUSUDHAN, 2010).

Dentre os três derivados de 6-mercaptapurinas contendo 1,2,3-triazol, se destaca o composto **9**, que apresentou aumento da atividade ao longo dos dias analisados, inibindo o crescimento dos parasitos de uma forma similar ou até superior a CQ nos dias 9 e 12 pós-infecção. Esta ação pode ser atribuída à presença do grupo benzil ligado ao anel triazólico. Dentre os derivados de 6-mercaptapurinas contendo esteroide, o análogo **11** exibiu supressão da parasitemia próxima a da CQ nos dias 9 e 12, estes valores sendo superiores aos exibidos pelo composto **10**. A atividade apresentada pelo composto **11** pode estar relacionada à presença do grupo éster no derivado do ácido cólico em substituição ao grupo ácido no derivado do ácido desoxicólico.

As 6-mercaptapurinas interferem com a síntese de ácidos nucleicos e são comumente usados no tratamento de câncer ou como imunossupressores (LANDFEAR et al., 2004; VASHIST et al., 2009; CORRALES et al., 2010) Triazóis

são agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, hipoglicêmicos, antidepressivos, antituberculosos, analgésicos, antimaláricos e anticancerígenos e atuam como inibidores de enzimas do citocromo p450 (SINGHAL et al., 2011). Esteroides são ferramentas atrativas no desenvolvimento de moléculas híbridas e pró-drogas por melhorar a absorção intestinal, conferir estabilidade metabólica às formulações farmacêuticas, permitindo assim a manutenção de concentrações sistêmicas adequadas dos agentes ativos (SIEVÄNEN, 2007).

Com relação à sobrevivência dos camundongos envolvidos neste estudo, a dose utilizada na triagem da atividade antimalárica (10 mg/kg/dia) não foi suficiente para promover a cura dos mesmos, apresentado apenas ação supressiva. Sendo assim, destacam-se animais pertencentes aos grupos tratados com compostos **2**, **3**, **4**, **5** e **8**, onde pelo menos um camundongo sobreviveu até o 24º dia pós-infecção. Este resultado foi apenas superado pela CQ no experimento dos análogos de 4-aminoquinolinas, onde foi observada a sobrevivência de um animal até o 29º dia pós-infecção. Este resultado é contraditório, tendo em vista que os compostos que exibiram melhor atividade antimalárica são os análogos **1**, **5**, **6**, **9** e **11** e apenas o composto **5** estaria promovendo a sobrevivência dos animais pertencentes ao seu grupo. Provavelmente, os camundongos tratados com **1**, **6**, **9** e **11** morreram devido a outras causas não vinculadas à malária.

A atividade antimalárica de derivados de quinolinas conjugados às 6-mercaptapurinas já foi alvo de pesquisas por De Souza et al. (2012). Três análogos denominados 4-(6'-mercaptapurina)-7-cloroquinolina (**I**); N-(3-(6'-mercaptapurina)propil)-7-cloroquinolin-4-amina (**II**) e N-(5-(6'-mercaptapurina)pentil)-7-cloroquinolin-4-amina (**III**) foram testados quanto sua capacidade de suprimir a parasitemia *in vivo*, em modelo murino de infecção malárica. Observou-se que o composto **I**, que é uma quinolina ligada diretamente à mercaptapurina, apresentou maior ação antiplasmodial que os compostos **II** e **III**, portadores de cadeias laterais alifáticas propil e pentil entre os anéis heterocíclicos. O análogo **I** alcançou 76% de supressão a 5 mg/kg, sendo este valor estatisticamente idêntico a CQ na mesma dosagem.

Estudos prévios realizados por Corrales et al. (2010) determinaram a atividade antimalárica *in vivo* e leishmanicida *in vitro* de derivados de 6-tiopurinas contendo 1,2,3-triazol e esteroide. No que diz respeito à atividade antimalárica *in vivo*, todos os 4 análogos avaliados denominados 2-(4-((9H-purin-6-iltio)-1H-1,2,3-

triazol-1-il) ácido acético (**IV**); metil 2-(4-((9H-purin-6-iltio)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) acetato (**V**); 6,9-(2-(4-metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) ácido acético-purina (**VI**) e (R)-metil-4-((5R,7R,10S,12S,13R,17R)-3-(9H-purin-6-iltio)-hexadecahidro-7,12 dihidroxi-10,13-dimetil-1H ciclopenta(a)fenantren-17-il)pentanoato (**VII**) foram mais ativos que a CQ no 12º dia pós-infecção (10 mg/kg), sendo que os compostos exibiram aumento da supressão da parasitemia ao longo dos dias analisados, enquanto a CQ exibiu redução de sua atividade do 5º ao 12º dia. O análogo **VII** exibiu boa atividade contra promastigotas de *Leishmania spp.*

Serão necessários maiores estudos utilizando técnicas de microscopia confocal, ligação à lactato desidrogenase (PfLDH), ensaio de inibição da formação da hemozoína dentre outras metodologias para definir com maior clareza o mecanismo de ação antiplasmodial dos análogos aqui apresentados.

Além da atividade antimalárica, um composto promissor não pode apresentar efeitos indesejáveis aos usuários (NOGUEIRA e DO ROSÁRIO, 2010). Para isso foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT) em macrófagos de camundongos Suíços e ensaios de verificação da atividade hemolítica dos compostos em eritrócitos humanos normais não infectados, ambos *in vitro*.

O ensaio de citotoxicidade consiste na conversão do sal tetrazólico (MTT) em formazan roxo insolúvel por meio de desidrogenases mitocondriais de células viáveis em proliferação. Os montantes de formazan são então quantificados pelo espectrofotômetro, indicando viabilidade celular. Caso a atividade mitocondrial seja reduzida pela ação citotóxica do composto, a produção de formazan ficará comprometida (PIETERS et al., 1988). Foram utilizados neste ensaio macrófagos peritoneais murinos devido à facilidade de obtenção, baixo custo e por ser uma técnica já padronizada em nosso laboratório.

Análogos de 4-aminoquinolinas (compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**) e 6-mercaptapurinas contendo 1,2,3-triazol (compostos **7** e **8**) não se mostraram citotóxicos, mesmo na maior concentração testada (150 µM). Apenas o composto **9** exibiu toxicidade, apresentando CC₅₀ de 145,75 µM. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por De Souza et al. (2012), que observaram que os análogos de quinolinas conjugados às 6-mercaptapurinas (compostos **I**, **II** e **III**) não foram citotóxicos a macrófagos murinos a 100 µM. Derivados de 6-tiopurinas contendo 1,2,3-triazol e esteroide (compostos **IV**, **V**, **VI** e **VII**) também não se mostraram tóxicos neste tipo celular (CORRALES et al., 2010).

A hemólise pode ser ocasionada por vários mecanismos distintos. Ela pode resultar da formação de poros nas membranas celulares, modificando sua permeabilidade ou pode ser devido à alteração na atividade de ATPases de sódio, potássio e cálcio (HU, KONOKI e TACHIBANA, 1996; MUKHERJEE e RAJASEKARAN, 2010). Alguns antimaláricos como a primaquina e em alguns casos CQ e sulfonamidas podem causar oxidação da hemoglobina formando metahemoglobina ocasionando hemólise, especialmente se o indivíduo for deficiente da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (WANG, 1977; MURINELLO et al., 2001). Sendo assim, o ensaio da atividade hemolítica determinou a capacidade dos análogos em causar danos aos eritrócitos humanos normais não infectados, através da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada ao meio externo (ZOBEL et al., 1999, LI et al., 2004 e WANG et al., 2010a).

Todos os análogos de 4-aminoquinolinas (exceto o **2**) apresentaram percentual de hemólise inferior à da CQ na maior concentração analisada (31,75% a 1 mg/mL). Os compostos desta classe que demonstraram menor atividade hemolítica foram os análogos **5** e **6**, que exibiram percentuais de 9,28% e 8,32% nesta mesma concentração, respectivamente.

A atividade hemolítica da CQ observada neste trabalho se diverge dos resultados obtidos por Aguiar et al. (2012) que avaliaram a atividade hemolítica desta e dois análogos de 4-aminoquinolinas denominados monoquinolina (MAQ) e bisquinolina (BAQ). Nenhuma hemólise foi detectada para os três compostos. As concentrações analisadas por Aguiar et al. (2012) variaram de 1,5 a 50 µg/mL, enquanto neste estudo foram de 0,031 a 1mg/mL.

7 CONCLUSÕES

- Com relação à atividade antimalárica *in vivo* de análogos de 4-aminoquinolinas, destacam-se a supressão obtida pelos seguintes compostos: **1** (55% no dia 5), **5** (81% no dia 12) e **6** (em torno de 68% a partir do 7º dia), sendo estes valores obtidos estatisticamente semelhantes aos da CQ nos dias analisados;
- Dentre os análogos de 6-mercaptopurinas contendo 1,2,3-triazol ou esteroide, destacam-se os compostos **9** (inibição de 73% no dia 9 e 68% no 12º dia) e **11** (66% de supressão no dia 12);
- Análogos de 4-aminoquinolinas e 6-mercaptopurinas contendo 1,2,3-triazol (exceto o composto **9**) não se mostraram citotóxicos mesmo na maior concentração avaliada (150 µM);
- Análogos de 4-aminoquinolinas (exceto o composto **2**) apresentaram atividade hemolítica inferior à da CQ na maior concentração analisada (1 mg/mL);
- Enquanto a CQ apresenta uma queda na atividade antimalárica ao longo dos dias, os análogos **5**, **6**, **8**, **9** e **11** apresentam perfil oposto, exibindo aumento da capacidade de supressão da parasitemia ao longo dos dias analisados. Aspectos como lipofilicidade, peso molecular, flexibilidade para atravessar as membranas e estabilidade metabólica dos compostos podem influenciar nesta observação;
- Tendo em vista os bons resultados obtidos neste trabalho, os análogos merecem ser objeto de futuras investigações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, K.; DEEKS, J. J.; OLLIARO, P. L.; NAING, C. M., JACKSON, S. M.; TAKWOINGI, Y.; DONEGAN, S.; GARNER, P. 2011. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 6 (7): CD008122. doi: 10.1002/14651858.CD008122.pub2.

ADITYA, N. P.; PATANKAR, S.; MADHUSUDHAN, B. 2010. Assessment of *in vivo* antimalarial activity of rifampicin, isoniazide, and ethambutol combination therapy. **Parasitology Research** 106: 1481–1484.

AGUIAR, A. C. C.; SANTOS, R. M.; FIGUEIREDO, F. J. B.; CORTOPASSI, W. A.; PIMENTEL, A. S.; FRANÇA, T. C. C.; MENEGHETTI, M. R.; KRETTLI, A. U. 2012. Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of Two Novel 4-Aminoquinolines against Chloroquine-Resistant Parasites. **PLOS One** 7 (5): e37259. doi:10.1371/journal.pone.0037259.

ALEXANDRE, A. M.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases** 16: 1611-1614.

ALVES, A.; MARTINS, A.; ADOLPHSSON, S.; BOCKORNY, B.; CARLETI, G.; CABRAL, G.; SOUZA, C. P.; VIANNA, A. 2007. Malaria Grave Importada. Relato de Caso. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 19 (2): 232-236.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine** 12 (2): 220-224.

ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. M. A.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal** 9: 13. doi: 10.1186/1475-2875-9-13.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDAO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 87: 253-256.

BANERJEE, R.; GOLDBERG, D. E. 2001. The *Plasmodium* food vacuole. **Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery**. ed. P. J. Rosenthal, Totawa. pp. 43-63.

BENOIT-VICAL, F.; LELIEVRE, J.; BERRY, A.; DEYMIER, C.; DECHY-CABARET, O.; CAZELLES, J.; LOUP, C.; ROBERT, A.; MAGNAVAL, J. F.; MEUNIER, B. 2007. Trioxaquines are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **51**: 1463-1472.

BOYLE, M. J.; WILSON, D.; RICHARDS, J. S.; RIGLAR, D. T.; TETTEH, K. K. A.; CONWAY, D. J.; RALPH, S. A.; BAUM, J.; BEESON, J. G. 2010. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **107 (32)**: 14378–14383.

BRASIL. 2012. Disponível em:

<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/04/25/dia-de-combate-a-malaria-leva-oms-a-pedir-recursos-para-acabar-com-a-doenca/view>. Acesso em: 26/04/2012.

BRASILSUS. 2012. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/noticias/9-principais/101333-brasil-recebera-r-100-milhoes-para-combate-a-malaria.html>. Acesso em: 26/04/2012.

BRUCE-CHWATT, L. J. 1985. **Essential malariology**. 2nd. ed. London, Heinemann. 452p.

BRUCE-CHWATT, L. J.; BLACK, R. H.; CANFIELD, C. J.; CLYDE, D. F.; PETERS, W.; WERNSDORFER, W. H. 1986. Chemotherapy of malaria. Revised 2nd Ed. Geneva, World Health Organization.

CARLTON, J.; SILVA, J.; HALL, N. 2005. The Genome of Model Malaria Parasites, and Comparative Genomics. **Current Issues Molecular Biology** **7**: 23-38.

CARROLO, M. 2003. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nature Medicine** **9**: 1363-1369.

CARVALHO, L. H.; BRANDAO, M. G. L.; SANTOS, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A. U. 1991. Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice *in vivo* and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **24**: 1113-1123.

CASAGRANDE, M.; BASILICO, N.; PARAPINI, S.; ROMEO, S.; TARAMELLI, D.; SPARATORE, A. 2008. Novel amodiaquine congeners as potent antimalarial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** **16 (14)**: 6813–6823.

CERVANTES, S.; STOUT, P. E.; PRUDHOMME, J.; ENGEL, S.; BRUTON, M.; CERVANTES, M.; CARTER, D.; TAE-CHANG, Y.; HAY, M. E.; AALBERSBERG, W.; KUBANEK, J.; LE ROCH, K. G. 2012. High content live cell imaging for the discovery of new antimalarial marine natural products. **BMC Infectious Diseases** **12**: 1. doi: 10.1186/1471-2334-12-1.

CORRALES, R. C. N. R.; DE SOUZA, N. B.; PINHEIRO, L. S.; ABRAMO, C.; COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D. 2010. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: Synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy** **65 (3)**: 198-203.

COSLÉDAN, F.; FRAISSE, L.; PELLET, A.; GUILLOU, F.; MORDMULLER, B.; KRESNER, P. G.; MORENO, A.; MAZIER, D.; MAFFRAND, J.P.; MEUNIER, B. 2008. Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **105**: 17579-17584.

COSTA, M. R. F.; VIEIRA, P. P. R.; FERREIRA, C. O.; LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C. 2008. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **41 (4)**: 381-385.

COURA, J. R.; SUAREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz** **101 (3)**: 229-237.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. 2010. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malaria Journal** **9**: 10. doi: 10.1186/1475-2875-9-10.

COX-SINGH, J.; SINGH, B. 2008. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends Parasitology** **24**: 406-410.

CRAIG III, S.P., AND EAKIN, A.E. 1997. Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design. **Parasitology Today** **13**: 238-241.

DE SOUZA, N. B.; CARVALHAES, R.; DO CARMO, A. M. L.; ALVES, M. J. M.; COIMBRA, E. S.; CUPOLILO, S. M. N.; ABRAMO, C.; DA SILVA, A. D. 2012. Synthesis and *In Vivo* Antimalarial Activity of Quinoline/Mercaptopurine Conjugates. **Letters in Drug Design & Discovery** **9**: 361-366.

DERBYSHIRE, E. R.; MOTA, M. M.; CLARDY, J. 2011. The next opportunity in anti-malaria drug discovery: the liver stage. **PLOS Pathogens** **7 (9)**: e1002178.

DHANPAT, K. K.; ASHISH, D.; SANJAY, K. K.; VISHAL, S.; PARMENDRA, S.; SHILPI, G.; ABHISHEK, K.; MANESH, P. K.; VIKAS, G. 2009. Severe *Plasmodium vivax* Malaria: A Report on Serial Cases from Bikaner in Northwestern India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **80 (2)**: 194-198.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P.; TARNING, J.; LWIN, K. M.; ARIEY, F.; HANPITHAKPONG, W.; LEE, S. J.; RINGWALD, P.; SILAMUT, K.; IMWONG, M.; CHOTIVANICH, K.; LIM, P.; HERDMAN, T.; YEUNG, S. S. S.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. Hallmark study showing a clear reduction in *in vivo* *P. falciparum* susceptibility to artesunate on the Cambodia–Thailand border. **New England Journal of Medicine** **361**: 455-467.

ENHSEN, A.; KRAMER, W.; WESS, G. 1998. Bile acids in drug discovery. **Drug Discovery Today** **3 (9)**: 409-418.

EZZET, F.; VAN VUGT, M.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine (benflumetol) in acute falciparum malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **44**: 697–704.

FERREIRA, M. E. S.; GOMES, M. S. M.; VIEIRA, J. L. F. 2011. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **44 (1)**: 113-115.

FITCH, C. D. 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences** **74 (16)**: 1957-1972.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. 1995. **Principles of Medicinal Chemistry** **4**: 321-344.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. 2008. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova** **31 (5)**: 1271-1278.

GUEIRARD, P. J.; TAVARES, S.; THIBERGE, F.; BERNEX, T.; ISHNO, G.; MILON, B.; FRANKE-FAYARD, C. J.; JANSE, R.; MÉNARD, R.; AMINO, R. 2010. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **107**: 18640-18645.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. 2011. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews** **240**: 297-316.

HANS, D.; PATTNAIK, P.; BHATTACHARYYA, A.; SHAKRI, A. R.; YAZDANI, S. S.; SHARMA, M.; CHOE, H.; FARZAN, M.; CHITNIS, C.E. 2005. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. **Molecular Microbiology** **55**: 1423-1434.

HASTINGS, I. A.; DONNELLY, M. J. 2005. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. **Drug Resistance Updates** **8**: 43-50.

HASTINGS, I. M. 2004. The origins of antimalarial drug resistance. **Trends of Parasitology** **20**: 512-518.

HOWES, R. E.; PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; NYANGIRI, O .A.; GETHING, P. W.; DEWI, M.; HOGG, M. M.; BATTLE, K. E.; PADILLA, C. D.; BAIRD, J. K; HAY, S.I. 2012. G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. **PLOS Medicine** **9 (11)**: e1001339. doi:10.1371/journal.pmed.1001339.

HU, M.; KONOKI, K.; TACHIBANA, K. 1996. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism** **1299**: 252–258.

ISET, V. M.; WANDY, B. L.; SINNIS, P.; KAMI, K. 2011. *Plasmodium* protease ROM1 is important for proper formation of parasitophorous vacuole. **PLOS Pathogens** **7 (9)**: e1002197.

KAPPE, S. H. I.; VAUGHAN, A. M.; BODDEY, J. A.; COWMAN, A. F. 2010. That was then but this is now: Malaria research in the time of an eradication agenda. **Science** **328**: 862-866.

KIRANDEEP, K.; MEENAKSHI, J.; RAVI, P. R.; RAHUL, J. 2010. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry** **45**: 3245-3264.

KLONIS, N.; CRESPO-ORTIZ, M. P.; BOTTOVA, I.; ABU-BAKAR, N.; KENNY, S.; ROSENTHAL, P. J.; TILLEY, L. 2011. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **108 (28)**: 11405-11410.

KOUZNETSOV, V. V.; GOMEZ-BARRIO, A. 2009. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry** **44**: 3091–3113.

KRETTLI, A. U.; ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, L. G. 2009. Testing of Natural Products and Synthetic Molecules Aiming at New Antimalarials. **Current Drug Targets** **10**: 261-270.

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A. C.; HAYNES, R. K. 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates** **7**: 233–244.

KROTOSKI, W. A. 1985. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **79**: 1-11.

LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. M. L.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.; FILHO, F. S. S.; BRASIL, P.; VENTURA, A. M. R. S.; TADA, M. S.; COUTO, V. S. C. D.; SILVA, A. R.; SILVA, R. S. U.; ALECRIM, M. G. C. 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal** **11**:12. doi: 10.1186/1475-2875-11-12.

LANDFEAR, S. M.; ULLMAN, B.; CARTER, N. S.; SANCHEZ, M. A. 2004. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. **Eukaryotic Cell** **3**: 245-254.

LI, J.; XIAO, H.; LI, J.; ZHONG, Y. 2004. Drug carrier systems based on water-soluble cationic beta-cyclodextrin polymers. **International Journal of Pharmaceutics** **278**: 329-342.

LOISEAU, P.M. & XUONG, N. D. 1996. *Plasmodium berghei* mouse model: antimalarial activity of new alkaloids salts and thiosemicarbazone and acridine derivates. **Tropical Medicine and Internnational Health (3) 1**: 379-384.

LOPEZ-ANTUÑANO, F. J. 1999. Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug? **Salud Publica de México 41**: 410-419.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. 2002. The pathogenic basis of malaria. **Nature 415**: 673-679.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. R.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUEZ, A. 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites trough cells before infection. **Science 291**: 141-144.

MS. 2008. Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf. Acesso em: 28/04/2012.

MS. 2010. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_malaria_2010_05_04.pdf. Acesso em: 27/04/2012.

MS. 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31082&janela=1. Acesso em 29/03/2012.

MS- SVS. 2003. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncm.pdf>. Acesso em: 28/04/2012.

MS- SVS. 2005. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 112 p.

MUKHERJEE, A.; RAJASEKARAN, C. 2010. In-vitro hemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. **Journal of Pharmacy Research 3 (5)**: 1160-1162.

MUREGI, F. W.; ISHIH, A. 2010. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. **Drug development research 71**: 20-32.

MURINELLO, A.; BICHO, M.; INÁCIO, R. E.; LOUREIRO. 2001. Meta-hemoglobinemia. **Medicina Interna 8 (4)**: 210-216.

NA-BANGCHANG, K.; KARBWANG, J. 2009. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. **Fundamental & Clinical Pharmacology 23**: 387-409.

NAIK, R. S.; BRANCH, O. H.; WOODS, A. S.; VIJAYKUMAR, M.; PERKINS, D. J.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A.; COTTER, R. J.; COSTELLO, C. E.; OCKENHOUSE, C. F.; DAVIDSON, E. A.; GOWDA, D. C. 2000. Glycosylphosphatidylinositol Anchors of *Plasmodium falciparum*: Molecular Characterization and Naturally Elicited Antibody Response That May Provide Immunity to Malaria Pathogenesis. **The Journal of Experimental Medicine 192**: 1563-1575.

NOEDL, H.; YOURY, S.E.; SCHAECHER, K.; SMITH, B.L.; SOCHEAT, D.; FUKUDA, M. M. 2008. The Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium: Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. **The New England Journal of Medicine 359**: 2619-2620.

NOGUEIRA, F.; DO ROSÁRIO, V. E. 2010. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. **Revista Pan-Amazônica de Saúde 1 (3)**: 109-124.

NZILA, A.; OKOMBO, J.; BECKER, R. P.; CHILENGI, R.; LANG, T.; NIEHUES, T. 2010. Anticancer agents against malaria: Time to revisit? **Trends of Parasitology 26 (3)**: 125-129.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G., BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. 2010. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal 9**: 115. doi: 10.1186/1475-2875-9-115.

OLLIARO, P. 2001. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacology & Therapeutics 89**: 207-219.

OLLIARO, P.; NEVILL, C.; LEBRAS. J.; RINGWALD, P. L. 1996. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. **Lancet 348**: 1196-1201.

PARISE, E. V. 2009. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42 (4)**: 463-468.

PETERS, W. 1965. Drug resistance in *Plasmodium berghei*. I. Chloroquine resistance. **Experimental Parasitology 17 (1):** 80-89.

PETERS, W.; PORTUS, J. H.; ROBINSON, B. L. 1975. The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. **Annual Tropical Medicine Parasitology 69 (2):** 155-171.

PHIMPRAPHI, W.; PAUL, R. E.; YIMSAMRAN, S.; PUANGSA-ART, S.; THANYAVANICH, N.; MANEEBOONYANG, W.; PROMMONGKOL, S.; SORNKLOM, S.; CHAIMUNGKUN, W.; CHAVEZ, I. F.; BLANC, H.; LOOAREESUWAN, S.; SAKUNTABHAI, A.; SINGHASIVANON, P. 2008. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal 7:** 99. doi:10.1186/1475-2875-7-99.

PIETERS, R.; HUISMANS, D. R.; LEYVA, A.; VEERMAN, A. J. P. 1988. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. **Cancer Letters 41:** 323-332.

PIZARRO, J. C.; CHITARRA, V.; VERGER, D.; HOLM, I.; PETRES, S.; DARTEVELLE, S.; NATO, F.; LONGACRE, S.; BENTLEY, G.A. 2003. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. **Journal of Molecular Biology 328:** 1091-1103.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature 4:** 849-856.

RAY, S.; MADRID, P. B.; CATZ, P.; LEVALLEY, S. E.; FURNISS, M. J.; RAUSCH, L. L.; GUY, R. K.; DERISI, J. L.; IYER, L. V.; GREEN, C. E.; MIRSAJIS, J. C. 2010. Development of a New Generation of 4-Aminoquinoline Antimalarial Compounds Using Predictive Pharmacokinetic and Toxicology Models. **Journal of Medicinal Chemistry 53:** 3685-3695.

REINERS, A. A. O. ; AZEVEDO, R. C. S.; RICCI, H. A.; SOUZA, T. G. 2010. Adesão e reações de usuários ao tratamento de malária: Implicações para a educação em saúde. **Texto Contexto Enfermagem 19 (3):** 536-544.

RENNENBERG, A.; LEHMANN, C.; HEITMANN, A.; WITT, T.; HANSEN, G.; NAGARAJAN, K.; DESCHEMEIER, C.; TURK, V.; HILGENFELD, R.; HEUSSLER, V. T. 2010. Exoerythrocytic *Plasmodium* parasites secrete a cysteine protease inhibitor

involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes. **PLOS Pathogens** **6** (3): e1000825.

ROLLAS, S.; KUÇUKGUZEL, S. G. 2007. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules** **12**: 1910-1939.

ROSENTHAL, P. J. 2003. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **The Journal of Experimental Biology** **206**: 3735-3744.

RUSSELL, P. F. 1955. Man's Mastery of Malaria. **Oxford University Press**. 221p.

SACHS, J.; MALANEY, P. 2002. The economic and social burden of malaria. **Nature** **415**: 680-685.

SASHIDHARA, V. K.; KUMAR, M.; MODUKURI, R. K.; SRIVASTAVA, R. K.; SONI, A.; SRIVASTAVA, K.; SINGH, S. V.; SAXENA, J. K.; GAUNIYAL, H. M.; PURI, S. K. 2012. Antiplasmodial activity of novel keto-enamine chalcone-chloroquine based hybrid pharmacophores. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **20**: 2971-2981.

SCHLITZER, M. 2008. Antimalarial Drugs – What is in Use and What is in the Pipeline. **Archive Pharmaceutical Chemical Life Science** **341**: 149-163.

SHIMIZU, S.; OSADA, Y.; KANAZAWA, T.; TANAKA, Y.; ARAI, M. 2010. Suppressive effect of azithromycin on *Plasmodium berghei* mosquito stage development and apicoplast replication. **Malaria Journal** **9**: 73. doi: 10.1186/1475-2875-9-73.

SHIVASHANKAR, K.; SUJAY SUBBAYYA, I. N.; BALARAM, H. 2001. Development of a Bacterial Screen for Novel Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Substrates. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** **3** (4): 557-562.

SIEVÄNEN, E. 2007. Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design. **Molecules** **12**: 1859-1889.

SILVA, R.; HOCHMAN, G. 2011. Um método chamado Pinotti: sal medicamentoso, malária e saúde internacional (1952-1960). **História, Ciências, Saúde - Manguinhos** **18** (2): 519-543.

SINGHAL, N.; SHARMA, P.K.; DUDHE, R.; KUMAR, N. 2011. Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research** 3 (2): 126-133.

STEPHEN, M. W.; STUART, M. L. 2000. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide induced TNF- α gene expression by a non lysosomotropic mechanism. **Journal of Immunology** 165: 1534-1540.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. 2006. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science** 313 (5791): 1287-1290.

SULLIVAN, D. J. 2002. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal for Parasitology** 32: 1645-1653.

TAUIL, P.; DEANE, L.; SABROZA, P.; RIBEIRO, C. 1985. A malária no Brasil. **Caderno de Saúde Pública** 1 (1): 71-111.

TAYLOR, W. R.; WHITE, N. J. 2004. Antimalarial drug toxicity: a review. **Drug Safety** 27: 25-61.

VASHIST, U.; CARVALHAES, R.; D'AGOSTO, M.; DA SILVA, A. D. 2009. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in *Gallus gallus* Linnaeus, Infected Experimentally by *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare*. **Chemical Biology and Drug Design** 74: 434-437.

WANG, C.; QIN, X.; HUANG, B.; HE, F.; ZENG, C. 2010a. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 402: 773-777.

WANG, J.; HUANG, L.; LI, J.; FAN, Q.; LONG, Y.; LI, Y.; ZHOU, B. 2010b. Artemisinin Directly Targets Malarial Mitochondria through Its Specific Mitochondrial Activation. **PLOS One** 5(3): e9582. doi:10.1371/journal.pone.0009582.

WANG, X. L.; WAN, K.; ZHOU, C. H. 2010. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry** 45: 4631-4639.

WANG, Y. M. 1977. Drug induced hemolysis. **Gen Pharma** 8: 13-19.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. 2001. Chloroquine-resistant malaria. **Journal of Infection Disease** **184**: 770-776.

WELLS, T. N. C.; ALONSO, P. L.; GUTTERIDGE, W. E. 2009. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. **Nature Reviews Drug Discovery** **8**: 879-891. doi:10.1038/nrd2972.

WENGELNIK, K.; VIDAL, V.; ANCELIN, M. L.; CATHIARD, A. M.; MORGAT, J. L.; KOCKEN, C. H.; CALAS, M.; HERRERA, S.; THOMAS, A. W.; VIAL, W. A. 2002. Class of Potent Antimalarials and Their Specific Accumulation in Infected Erythrocytes. **Science** **295**: 1311-1314.

WHITE, N. J. 1999. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** **354**: 739-749.

WHO. 1967. Chemotherapy of malaria. World Health Organization Technical Report Series, n° 375.

WHO. 1973. Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials. World Health Organization Technical Report Series, n° 529.

WHO. 2008. Global malaria control and elimination: report of a technical review: 48.

WHO. 2010a. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.

WHO. 2010b. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition.

WHO. 2012. World Malaria Report 2012. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html. Acesso em: 31/12/2012.

WHO- ROLL BACK MALARIA. 2008. Global Malaria Action Plan. Geneva: Roll Back Malaria Partnership.

WHO- ROLL BACK MALARIA. 2012. What is Malaria? Disponível em: (http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1.htm). Acesso em 24/02/2012.

WOODROW, C. J.; HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. 2005. Artemisinins. **Postgraduate Medical Journal** 81 (952): 71-78.

YEH, E.; DERISI, J. 2011. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **PLOS Biology** 9 (8): e1001138. doi:10.1371/journal.pbio.1001138.

YUTHAVONG, Y. 2002. Basis for antifolate action and resistance in malaria. **Microbes and Infection** 4 (2): 175-182.

ZOBEL, H. P.; STIENEKER, F.; ATMACA-ABDEL AZIZ, S.; GILBERT, M.; WERNER, D.; NOE, C. R.; KREUTER, J.; ZIMMER, A. 1999. Evaluation of aminoalkylmethacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. II. Characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 48: 1-12.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo submetido (produto direto)

SOARES, R. R.; CORRALES, R. C. N. R.; DA SILVA, A. D.; ABRAMO, C. 2012. Synthesis and antimalarial activity of novel derivatives of 6-mercaptapurines. **Letters in Drug Design & Discovery**.

Synthesis and antimalarial activity of novel derivatives of 6-mercaptapurines

Roberta R. Soares^a, Roberta C. N. R. Corrales^b, Adilson D. Da Silva^b, Clarice Abramo^{a*}

^a*Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, I.C.B.,
Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora,
Minas Gerais 36036-900, Brasil;*

^b*Departamento de Química, I.C.E., Universidade Federal de Juiz de Fora,
Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brasil.*

* Corresponding author: Dra. Clarice Abramo clarice.abramo@ufjf.edu.br


Abstract

Chloroquine has been widely used to treat malaria, however, it is currently largely ineffective due to widespread parasite resistance. In this work, five 6-mercaptapurine derivatives were synthesized and their *in vivo* antimalarial activity was examined. Among the three derivatives of 6-mercaptapurines containing 1,2,3-triazole, compound **16** stands out, which showed increased activity over the days analyzed, inhibiting the growth of parasites in a way similar or even superior to chloroquine. Also, among the derivatives of 6-mercaptapurine containing steroid, the analog **18** exhibited suppression of parasitaemia close to that of chloroquine. None of compounds showed cytotoxicity against mammalian cells.

Keywords: 6-thiopurine, steroids, click chemistry, antimalarial activities.

ANEXO B – Depósito de pedido de patente (produto indireto)

DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S.; ABRAMO, C.; SOARES, R. R.; SANTOS, J. A.; ALMEIDA, A. C.; MACHADO, P. A. Bioisósteros do Resveratrol Bioconjugados com Esteroides, Antiparasitários, 2012.

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL 31/05/2012 10:38 NPRJ 020120048283 BR 10 2012 013082 3 Espaço reservado ao protocolo		< Uso exclusivo do INPI > Espaço para etiqueta													
DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO															
Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial: O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas															
1. Depositante (71): 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA 1.2 Qualificação INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR 1.3 CNPJ/CPF: 21195755000169 1.4 Endereço Completo: CAMPUS UNIVERSITÁRIO, S/N, SÃO PEDRO JUIZ DE FORA/MG 1.5 CEP: 36036900 1.6 Telefone: 3221023435 1.7 Fax: 3221023435 1.8 E-mail: pc.critt@ufjf.edu.br <input type="checkbox"/> continua em folha anexa															
2. Natureza: <input checked="" type="radio"/> Invenção <input type="radio"/> Modelo de Utilidade <input type="radio"/> Certificado de Adição Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: invenção															
3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54): "BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL BIOCONJUGADOS COM ESTERÓIDES, ANTIPARASITÁRIOS" <input type="checkbox"/> continua em folha anexa															
4. Pedido de Divisão: -- do pedido N°		Data de Depósito:													
5. Prioridade: <input type="checkbox"/> interna <input type="checkbox"/> unionista O depositante reivindica a(s) seguinte(s):															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Pais ou organização de origem</th> <th>Número de depósito</th> <th>Data do depósito</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>			Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito										
Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito													
6. Inventor (72): <input type="checkbox"/> Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) 6.1 Nome: ADILSON DAVID DA SILVA 6.3 CPF: 726.022.286-72 6.2 Qualificação PROFESSOR UNIVERSITÁRIO 6.4 Endereço completo Rua Joaquim Moraes, 25, Granville, Juiz de Fora/MG 6.5 CEP: 36036244 6.6 Telefone: 3232161857 6.7 Fax: 3221023435 6.8 E-Mail: david.silva@ufjf.edu.br <input checked="" type="checkbox"/> continua em folha anexa															

