

Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina

Adélia Emília de Almeida^{1*}, Ana Luiza Ribeiro de Souza², Silmara Marques Allegretti³, Tarsila Ferraz Frezza³, Mara Cristina Pinto⁴, Antônio Gilberto Ferreira⁵, Man Chin Chung¹

¹Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",

²Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",

³Laboratório de Helmintologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas,

⁴Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",

⁵Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos

A esquistossomose, uma importante doença no Brasil, é causada por trematódeo pertencente ao gênero Schistosoma, atingindo milhões de pessoas, numa das maiores regiões endêmicas dessa doença em todo globo. O principal objetivo desse trabalho foi sintetizar o derivado 6-formil-oxamniquina e avaliar sua atividade biológica. O derivado 6-formil-oxamniquina foi obtido por oxidação da oxamniquina com dióxido de manganês empregando diclorometano como solvente, à temperatura ambiente, por 24 horas. Sua obtenção foi confirmada por espectrometria na região de infravermelho e espectroscopia de RMN ¹³C e ¹H, apresentando atividade similar quando comparada à oxamniquina comercial (Mansil[®]).

Unitermos

- Esquistossomose
- Oxamniquina
- *Schistosoma mansoni*

*Correspondência:

A.E. Almeida
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- UNESP
Rod. Araraquara-Jaú, km. 01
14801-902 – Araraquara – SP, Brasil
E-mail: almeidaa@fcfar.unesp.br

INTRODUÇÃO

A esquistossomose, também chamada esquistossomíase ou bilharziose, é uma doença produzida por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Entre as 19 espécies reconhecidas, cinco infectam primariamente o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Organização Mundial de Saúde, 1994; Shekhar, 1991; World Health Organization, 2006).

Essa doença originou-se na África Central, disseminando-se para o norte desse continente, com as correntes migratórias ao longo do vale do Nilo. Sua transferência para o Brasil teve origem no primeiro grande ciclo econômico, as chamadas monoculturas de exportação, que neces-

sitavam de grandes contingentes de mão-de-obra com o mais baixo custo possível. Iniciava-se a escravatura no Brasil com a comercialização de escravos trazidos de países africanos, para a região Nordeste brasileira. Esses grandes contingentes populacionais migrantes encontraram precárias condições de vida e de trabalho, em diferentes regiões e áreas, favorecendo a disseminação da enfermidade. A existência de meio ambiente físico propício, com presença do hospedeiro intermediário, e ineficazes programas de controle permitiram que a esquistossomose se tornasse endêmica (Amaral, Porto, 1994; Carvalho *et al.*, 1998).

No Brasil, é popularmente conhecida como “barriga-d’água” ou “mal do caramujo”, atingindo milhões de pessoas, numa das maiores regiões endêmicas dessa doença em todo

globo (Rey, 2002). Acredita-se que cerca de 200 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo todo e 600 milhões estejam sob o risco de contrair a doença (Almeida *et al.*, 2006; CDC, 2006; World Health Organization, 2006).

Apenas dois fármacos estão disponíveis no país para o tratamento dessa enfermidade: oxamniquina e praziquantel. Os efeitos adversos provocados pelo praziquantel caracterizam-se por tonturas, náuseas, cefaléias, dores abdominais, sonolência e exantema urticariforme. O *S. mansoni* é altamente suscetível à oxamniquina, entretanto é considerada o fármaco de 2ª escolha devido aos seus efeitos colaterais, principalmente àqueles ligados ao SNC. Estes efeitos, associados à grande incidência da parasitose em nosso país e, ao risco do aparecimento de resistência, sempre presente, demonstram a grande importância do desenvolvimento de novos agentes esquistossomicidas (Barberato-Filho *et al.*, 2002; CDC, 2006; El-Hamouly *et al.*, 1988; Parise-Filho *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação da oxamniquina ainda não está completamente elucidado. Alguns autores sugerem que a oxamniquina é enzimaticamente convertida através de uma quinase ou sulfotransferase para um éster, o qual pode alquilar o DNA do *Schistosoma* (Cioli *et al.*, 1993), sendo, portanto o grupo metilhidroxil (presente na posição 6) essencial à atividade biológica (Figura 1).

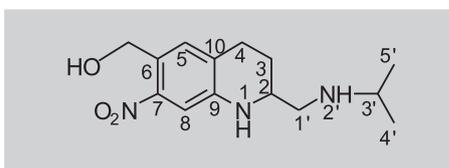


FIGURA 1 - Estrutura química da oxamniquina (6-hidroximetil-2-isopropilaminometil-7-nitro-1,2,3,4-tetraidroquinolina).

No que se refere à introdução de novos fármacos, os processos de modificação molecular (Bundgaard, 1991; Burger, 1995; Chung, Ferreira, 1999) são os mais promissores.

O presente trabalho teve como objetivo realizar a modificação no grupo metilhidroxila presente na posição 6 visando à obtenção do derivado 6-formil-oxamniquina e avaliar a sua atividade biológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico e a oxamniquina foi gentilmente doada pelo Centro de Pesquisa da Pfizer.

Equipamentos

Os dados de absorção na região de infravermelho foram obtidos em comprimento de onda de 4000-400 cm^{-1} em pastilhas de KBr, utilizando Espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300, à temperatura ambiente.

Os espectros de RMN ^{13}C , ^1H foram obtidos em Espectrômetro BRÜKER DRX400 (9,4 Tesla) com tetrametilsilano como padrão interno e DMSO- d_6 como solvente, à temperatura constante de 25 °C. Os deslocamentos químicos foram registrados em δ (ppm).

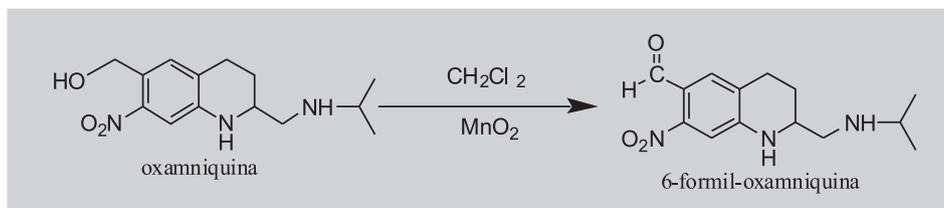
As faixas de fusão foram determinadas em aparelhos de ponto de fusão capilar MEL-TEMP II.

Síntese do derivado 6-formil-oxamniquina

Em balão de fundo redondo foram solubilizados 3,6 mmol (1,0 g) oxamniquina em 100,0 mL de diclorometano. Em seguida, foram colocados 34,5 mmol (3,0 g) de dióxido de manganês divididos em 2 porções e adicionadas com 15 minutos de intervalo. O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. Após filtração, o solvente foi evaporado e o precipitado obtido foi seco. A reação é apresentada no Esquema 1, esta foi acompanhada por CCD utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol/ácido acético 95:5:3 (v:v:v), empregando como revelador solução alcoólica de 2,4-dinitrofenilidrazina, revelador específico para aldeído.

Avaliação da atividade biológica

O ensaio foi realizado no Laboratório de Helminologia do Departamento de Parasitologia - UNICAMP. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas



ESQUEMA 1 – Síntese do derivado 6-formil-oxamniquina.

SPF com 30 dias de idade. Os animais foram infectados, com 70 cercárias do *Schistosoma mansoni*, da linhagem BH, por imersão caudal durante 2 horas com exposição à luz e calor de acordo com o método descrito por Olivier e Stirewalt (1952). Após 45 dias de infecção, os animais, então apresentando ovos viáveis nas fezes, foram tratados. A dose selecionada foi de 100 mg/kg de peso. Esta dose representa a ED99 da oxamniquina e tem sido empregada frequentemente nos ensaios de atividade biológica. O veículo utilizado foi água destilada. Os camundongos foram distribuídos em 3 grupos:

- Cinco (5) animais infectados receberam oxamniquina comercial (OXAc) (Mansil®, Pfizer), na concentração de 100 mg/kg, administrada por tubagem gástrica, em dose única 0,3 mL.
- Cinco (5) animais infectados receberam o derivado 6-formil-oxamniquina (OXAf), na concentração de 100 mg/kg, administrada por tubagem gástrica, em dose única 0,3 mL.
- Cinco (5) animais infectados receberam solução salina NaCl 0,9% por tubagem gástrica, em dose única 0,3 mL – grupo controle.

Todos os animais dos 3 grupos foram eutanaziados por deslocamento cervical, quinze dias após o tratamento. Os vermes foram coletados por perfusão do sistema porta-hepático (Yolles *et al.*, 1947) e de cada camundongo foram retirados fragmentos do intestino delgado para realizar o método do oograma, para identificação dos estágios de desenvolvimento dos ovos. O fígado, intestino, baço e pulmões foram retirados e comprimidos entre duas placas de vidro para a visualização dos granulomas. As fezes dos camundongos também foram analisadas, utilizando-se o método quantitativo de Kato, modificado por Katz, Pellegrino e Memoria (1972), visando à contagem de ovos.

Todos os procedimentos acima relatados foram também realizados para os grupos de animais controle, ou seja, aqueles que receberam somente a solução de NaCl.

Os dados foram transformados em logaritmos e analisados estatisticamente por análise de variância e comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey.

O protocolo experimental foi conduzido de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – protocolo nº 1117-1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

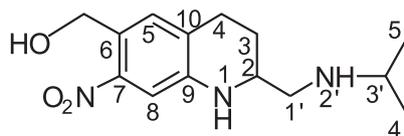
A obtenção do derivado desejado foi confirmada pelos dados de faixa de fusão, IV e RMN ¹³C. A faixa de fusão da oxamniquina encontrada na literatura é 147-149°C (Merck, 2006), enquanto que o derivado 6-formil-oxamniquina apresentou 75-83,2°C.

As bandas de absorção observadas no IV (KBr, cm⁻¹) que contribuem para a caracterização da oxamniquina são: 3328 (ν_{N-H} e ν_{O-H} livre), 2972 (ν_{C-H} aromático), 2900-2846 (ν_{C-H}, ν_{CH₂} e ν_{CH₃} simétrico e assimétrico), 1620 (ν_{C=C} aromático), 1517 (ν_{NO₂}), 1332 (ν_{NO₂} simétrico), 1292 (ν_{C-O}), 1051 (ν_{O-H} álcool primário e (ν_{C-N}). Enquanto no derivado 6-formil-oxamniquina foi observada a presença em: 3352 (ν_{N-H}), 2964 (ν_{CH-CH₃} simétrica e assimétrica), 3846 (ν_{C-H} aldeído conjugado em efeito orto), 1666 (ν_{C=O} aldeído conjugado ligação hidrogênio intramolecular), 1596 (ν_{C=C} anel aromático), 1517 (ν_{NO₂} assimétrico), 1336 (ν_{NO₂} simétrico) e em 1051 (δ_{C-O}).

Na análise por RMN ¹³C do derivado 6-formil-oxamniquina foi observado um pico em 186,3 ppm, correspondendo à presença de aldeído. A comprovação de obtenção é verificada pela análise RMN ¹H em que observa-se o deslocamento químico do hidrogênio aldeídico –COH em 9,82 ppm. Como ele está se correlacionando com os deslocamentos químicos do anel aromático, com isso fica demonstrado que o radical aldeídico está de fato ligado ao anel e, portanto a oxidação de álcool para aldeído funcionou, ou seja, foi obtido o derivado 6-formil oxamniquina (Tabela I).

Resultados obtidos com a linhagem BH de *S. mansoni* indicaram que com 45 dias de infecção, a quantidade de vermes encontrados nos camundongos foi menor no grupo tratado com (OXAc) (5 machos, 7 fêmeas, 6 casais), que no grupo tratado com o (OXAf) (9 machos, 12 fêmeas, 35 casais), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (p>0,05). Ambos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (p<0,01) que apresentou maior quantidade de vermes (46 machos, 49 fêmeas e 42 casais). Quanto ao número total de vermes houve diferença estatística entre os três tratamentos (p<0,01), sendo que a oxamniquina e o seu derivado não diferiram entre si, mas em ambos, menos vermes foram encontrados em relação ao controle.

No oograma encontramos maior quantidade de ovos imaturos de 1º, 2º, 3º e 4º estágios de desenvolvimento nos animais tratados com o (OXAf) (Tabela II), mas em contrapartida na contagem de ovos nas fezes, o tratamento com o (OXAf) reduziu a oviposição sendo encontrados 686 ovos.g⁻¹ e 1100 ovos.g⁻¹ para os tratados com (OXAc) (Tabela III). O grupo controle apresentou 2384,5 ovos.g⁻¹ sendo que esse número corresponde ao dobro de ovos encontrados em OXAc e ao triplo dos ovos liberados após tratamento com OXAf. Em relação ao 5º estágio de desenvolvimento, ou seja, ovos maduros, o grupo tratado com o (OXAf), (OXAc) e controle apresentaram 88, 72 e 61 ovos, respectivamente. A análise de variância apresentou diferença entre os três tratamentos (p=0,02). O controle não diferiu da (OXAc) (p>0,05) nem do seu derivado (p>0,05), porém em seu derivado (OXAf) mais ovos foram encontrados em relação à (OXAc) (p<0,05).

Tabela I - Deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J(Hz) para o derivado 6-formil oxamniquina em DMSO-d6

No.	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	gHMBC
2	3,34 - 3,45 m	50,9	51,5 e 24,9
3	1,45 - 1,62 m 1,85 - 1,97 m	23,8	123,4; 50,9; 48,2 e 24,9
4	2,69 - 2,79 m	24,9	150,1; 130,8 e 123,4
5	7,49 s	130,8	186,3; 150,1; 123,4; 115,5; 107,0 e 24,9
6	-----	115,5	-----
7	-----	150,1	-----
8	7,10 s	107,0	186,3; 150,1; 123,4; 115,5 e 24,9
9	-----	150,2	-----
10	-----	123,4	-----
1'	2,48 - 2,59 m 2,59 - 2,72 m	51,5	24,9 e 23,8
3'	2,69 - 2,79 m	48,2	150,2; 130,8; 123,4; 50,9; 23,7 e 22,9
4', 5'	1,01 d J=6,57	22,9	48,2
>COH	9,82 s	186,3	186,3; 150,1; 130,8; 123,4 e 115,5

s - singleto; d - dubleto; m - multipleteo.

TABELA II - Oograma (total de ovos nos diferentes estágios encontrados para cada tratamento)

Estágio do Ovo	NaCl 0,9%	OXAc	OXAf
1°	4	1	37
2°	13	3	19
3°	17	1	56
4°	3	3	3
5°	61	72	88
mortos	12	19	12
Total de ovos encontrados*	110 (a)	99 (ab)	215 (ac)

*As mesmas letras não apresentam diferenças significativas na análise estatística $p > 0,05$.

TABELA III - Número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes de camundongos infectados e tratados com OXAc e OXAf (exame de fezes: Kato Katz)

Tratamento	Ovos/grama de fezes
NaCl 0,9%	2384,5
OXAc	1100
OXAf	686

Em relação à formação de granulomas no fígado, intestino, baço e pulmões todos os grupos apresentaram granulomas em grande quantidade (+++) no fígado. Nos grupos tratados com (OXAc) e com seu derivado tiveram formação menor de granulomas no intestino, baço e pulmões (+) (Tabela IV).

Em números absolutos, o tratamento com a (OXAc) apresentou resultado levemente superior em relação ao seu derivado quanto ao número total de vermes recuperados no intestino, ou seja, houve maior mortalidade, porém como estatisticamente não foi detectada diferença pode-se considerar que os dois apresentaram similaridade quanto a esse parâmetro. Em relação ao oograma podemos inferir que há interrupção na oviposição feita pelas fêmeas que permaneceram vivas após o tratamento, mas que se restabeleceu depois. Observamos este fato pela quantidade de ovos imaturos existentes que é maior para o grupo tratado com o (OXAf) em relação à (OXAc). Entretanto, verificamos quantidade significativamente menor de ovos eliminados nas fezes para este mesmo grupo em relação ao tratado com (OXAc). Como há maior quantidade de ovos imaturos no oograma, mas, também, menor quantidade de ovos eliminados nas fezes, podemos supor que houve interrupção na oviposição e que se restabeleceu depois. Pelos parâmetros analisados os dois tratamentos apresentam perfil similar.

TABELA IV - Resultados da contagem de granulomas e presença de vermes de *S. mansoni* nos órgãos dos camundongos, excetuando as veias mesentéricas

Tratamento	Fígado	Intestino	Baço	Pulmões
NaCl 0,9%	+++ 2 vermes	+	++	++
OXAc	+++ 2 vermes	limpo	+	+
OXAf	+++	limpo	+	+

+++ Órgão com muitos granulomas; ++ órgão com quantidade intermediária de granulomas e + órgão com poucos granulomas.

CONCLUSÕES

O derivado 6-formil-oxamniquina foi obtido e a substituição do grupo metilhidroxil pela função aldeído não alterou a sua atividade. Pretende-se, em uma próxima etapa, obter novos derivados na tentativa de elucidar a importância do substituinte OH (hidroxila) no mecanismo de ação, uma vez que o derivado aldeídico obtido apresentou equivalente atividade biológica.

ABSTRACT

Synthesis and biological activity of 6-formyl-oxamniquine derivative

Schistosomiasis, an important disease in Brazil, is caused by a trematode of the genus Schistosoma, reaching millions of person in one of the most endemic region of this disease in the whole globe. The main goal of this work was to synthesize the 6-formyl-oxamniquine derivative and evaluate its biological activity. The 6-formyl-oxamniquine derivative was obtained by the oxidation of oxamniquine with MnO₂, applying CH₂Cl₂ as solvent at room temperature for 24 hours. The obtaintion of 6-formyl-oxamniquine derivative compound was confirmed by IR spectroscopy and ¹³C NMR and ¹H NMR, presenting similar activity when compared to the commercial oxamniquine (Mansil®).

UNITERMS: *Schistosomiasis. Ooxamniquine. Schistosoma mansoni.*

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração do Centro de Pesquisa da Pfizer, localizado em Sandwich (Reino Unido), pela doação da oxamniquina utilizada nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. E.; FERREIRA, A. G.; CRESPI, M. S.; ANDRADE, Z. A.; CHUNG, M. C. Synthesis and thermal study of prodrug of oxamniquine. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v.83, n.2, p.277-281, 2006.
- AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. Evolução e situação do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.27, n.2, p.73-90, 1994.
- BARBERATO-FILHO, S.; ARGIONI, C.; PINTO, C. P. L. S.; CHIODELLI, S. G.; VELLOSA, S. A. G.; SILVA, R. M.; SILVEIRA, M. A. B. Synthesis and evaluation of new oxamniquine derivatives. *Int. J. Pharm.*, v.233, n.1-2, p.35-41, 2002.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, v.16, n.5, p.443-58, 1991.
- BURGER, A. The conceptual background and development of medicinal chemistry. In: WOLFF, M. E. (Ed.), *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and Practice*, John Wiley & Sons: New York, 1995. v.1, p.1-8
- CARVALHO, E. M.; ACIOLI, M. D.; BRANCO, M. A. F.; COSTA, A. M.; CESSÉ, E. A. P.; ANDRADE, A. G.; MELLO, E. M. L. L. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? *Cad. Saúde Pública*, v.14, n.4, p.787-795, 1998.
- CDC. Health and Safety Topics, Atlanta, G.A.: U.S. Department of health and Human Services, CDC, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/default.htm>>. Acesso em: 20 de out. 2007.
- CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, v.22, n.1, p.75-84, 1999.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today*, v.9, n.5, p.162-166, 1993.
- EL-HAMOULY, W.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; SCHWARTZ, H. M.; ARCHER, S. Studies on some derivatives of oxamniquine. *J. Med. Chem.*, v.31, n.8, p.1629-1631, 1988.

- KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. Quantitative oogram method in *Cebus monkeys* experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, v.52, n.5, p.917-919, 1972.
- MERCK index. 14.ed. Whitehouse Station, 2006. p.1192.
- OLIVIER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, v.38, p.19-23, 1952.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1994. *O Controle da Esquistossomose: Segundo Relatório do Comitê de Especialistas da OMS*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 110p. (Technical Reports Series, 830).
- PARISE-FILHO, R.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R.; SILVEIRA, M. A. B.; BRANDT, C. A. Thermoanalytical characterization of potentially schistosomicide polymeric derivatives. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v.75, n. 2, p.487-494, 2004.
- REY, L. Esquistossomíase Mansônica In: ____ *Bases da Parasitologia Médica*. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.413-443.
- SHEKHAR, K. C. Schistosomiasis drug therapy and treatment consideration. *Drugs*, v.42, n.3, p.379-405, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO, 2006. *Schistosomiasis and intestinal parasites control. Planning and technical guidance. Communicable diseases prevention and control*. Disponível em: <<http://www.WHO.Ch./cds>>. Acesso em: 16 de out. 2006.
- YOLLES, T. K.; MOORE, P. V.; DE GINSTE, D. L.; RIPSON, C. A.; MELENEY, H. E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. *J. Parasitol.*, v.33, p.419-426, 1947.

Recebido para publicação em 21 de fevereiro de 2008
Aceito para publicação em 21 de agosto de 2008