

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

# QUINOLONAS EM QUÍMICA MEDICINAL

Stephany Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de  
Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

# QUINOLONAS EM QUÍMICA MEDICINAL

Stephany Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de  
Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2014

# QUINOLONAS EM QUÍMICA MEDICINAL

## Declaração da autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Stephany Martins

*Copyright* © 2014 Stephany Martins. Todos os direitos reservados.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano pelo grande apoio que me tem dado, não só na orientação desta monografia, mas também em todos estes anos de universidade. Agradeço também o incentivo, a força e os ensinamentos. Muito obrigada!

Agradeço à minha mãe, à minha irmã, à minha avó, aos meus tios e aos meus primos pelo encorajamento e apoio tanto financeiro como emocional. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu namorado, por me ter apoiado e acompanhado em todos os percursos desta longa caminhada de forma paciente e prestativa.

Agradeço também a todos os meus amigos, pela compreensão e apoio. Em especial às minhas companheiras de batalha, Cláudia e Patrícia, pelas gargalhadas, pela diversão nas longas horas na biblioteca e pelo apoio constante.

## RESUMO

Desde a sua descoberta, as quinolonas têm evoluído de uma forma espantosa. Estruturalmente, correspondem a uma classe de compostos de origem sintética contendo um núcleo heteroaromático bicíclico que inclui um grupo ácido carboxílico, um carbonilo e um átomo de azoto. A primeira quinolona com aplicação clínica foi obtida sinteticamente por Lecher et al em 1962 durante a síntese da cloroquina. Foi utilizada como antimicrobiano no tratamento de infeções urinárias, sendo posteriormente desenvolvidos novos derivados com maior espectro de ação e com melhores propriedades farmacocinéticas, permitindo a administração oral, parenteral, tópica e com ação sistémica que passaram a serem utilizados em inúmeros tipos de infeções, até mesmo em infeções com organismos resistentes a outras classes de antimicrobianos.

O mecanismo de ação das quinolonas como antibacterianos passa pela inibição da síntese de DNA bacteriano, através da interação com as enzimas DNA girase e topoisomerase IV bacterianas responsáveis por contrariar o superenrolamento do DNA durante a replicação e permitir a segregação do cromossomas pelas células filhas.

O avanço na seleção de resistência foi o grande impulsionador da investigação de novas quinolonas com espectro de ação cada vez mais amplo e com propriedades farmacológicas otimizadas. Devido ao crescente número de novas quinolonas surgiu a necessidade de as classificar. Não existe muito consenso na sua classificação mas neste trabalho optou-se por classificá-las em quatro gerações. Dentro da mesma geração, os compostos não diferem muito entre si, mas cada nova geração corresponde a maior espectro de ação.

As aplicações terapêuticas aprovadas pelas devidas entidades incluem o tratamento de infeções no trato urinário, prostatite bacteriana, infeções cutâneas e em tecidos moles, infeções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* ou estirpes de *Salmonella*, doenças sexualmente transmissíveis, entre muitas outras, inclusive o tratamento da tuberculose causada principalmente pelo *Micobacterium tuberculosis*. Devido ao seu grande sucesso como antimicrobiano, a utilização no tratamento da SIDA foi também considerada. Estudos recentes demonstram que algumas quinolonas possuem ainda propriedades anticancerígenas, anti-HCV, antimaláricas, ansiolíticas, cardiotónicas e anticolinérgicas, podendo eventualmente vir a ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, como alzheimer e Parkinson.

Esta monografia apresenta uma revisão bibliográfica sobre o uso das quinolonas em química medicinal, perspetivando futuras aplicações farmacológicas desta classe de compostos.

**Palavras-chave:** Anticancerígeno, antimalárico, antimicrobiano, antiparkinsoniano, antituberculoso, antiviral, fluoroquinolonas, quinolonas.

## ABSTRACT

Since the discovery of quinolones, the class experienced a huge evolution. Structurally quinolones are a class of synthetic compounds containing a heteroaromatic bicyclic nuclei which includes a nitrogen atom inserted in one of the rings and, as characteristic substituents, a carboxylic acid or derivative and a carbonyl. The first quinolone with clinical applications was synthetically obtained by Lecher et al in 1962, during the synthesis of chloroquine, and used as an antimicrobial agent for the treatment of the urinary tract infections. The compound served as model for further development, and new derivatives, with a broader spectrum of action and better pharmacokinetic properties, suitable for oral, parenteral or topic administration, with systemic action, and effective in numerous types of infections, even in the treatment of infections due to organisms resistant to other antimicrobial classes.

The mechanism of action of quinolones as antibacterial agents involves inhibition of bacterial DNA synthesis mediated by the interaction between the compound and the bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes, responsible to counterbalancing the supercoiling of DNA during replication and allowing the segregation of the chromosomes by daughter cells.

Increased selection of resistance by bacterial strains was the major booster to the development new quinolone structures, with wider spectrum of action and optimized pharmacological properties. Quinolones are clinically classified and split into four generations. Inside of the same generation the compounds are not very different, however, a new generation corresponds to a broader spectrum of action.

The therapeutic applications of quinolones approved by the appropriate entities include the treatment of infections in the urinary tract, bacterial prostatitis, cutaneous infections and in soft tissues, gastrointestinal infections caused by *Escherichia coli* or *Salmonella* strains, sexual transmitted diseases, among others, including the treatment of tuberculosis mainly caused by *Micobacterium tuberculosis*. Due to the great success as antimicrobial, the use of quinolones in AIDS treatment is under scrutiny. Recent studies with selected quinolones have demonstrated antineoplastic, anti-HCV, anti-malarial, anxiolytic, cardiotoxic and anticholinergic properties, with studies going on for their possible use in Alzheimer and Parkinson diseases.

This monograph presents an overview of the uses of quinolones in medicinal chemistry, highlighting contemporary research in the field. Future pharmacological applications of this class of compounds are expected.

**Keywords:** Antineoplastic, anti-malarial, antimicrobial, antiparkinson, antitubercular, antiviral, fluoroquinolonas, quinolones.

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	iv
Resumo.....	v
Abstract .....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de abreviaturas.....	x
1. Introdução .....	1
2. Estrutura e desenvolvimento das quinolonas .....	4
2.1. Quinolonas de primeira geração .....	6
2.2. Quinolonas de segunda geração .....	8
2.3. Quinolonas de terceira geração .....	13
2.4. Quinolonas de quarta geração .....	16
3. Propriedades físico-químicas.....	19
3.1. Lipofilicidade .....	21
3.2. Constante de ionização (pka) .....	22
3.3. Permeabilidade membranar .....	23
3.4. Solubilidade .....	24
3.5. Complexação com iões metálicos .....	25
4. Mecanismo de ação das quinolonas.....	27
5. Problemas associados a utilização de quinolonas.....	28
5.1. Efeitos secundários mais comuns .....	29
5.2. Seleção de estirpes resistentes aos fármacos.....	30
6. Utilização veterinária das quinolonas e o impacto na saúde humana.....	32
7. Perspetivas futuras da utilização de quinolonas em terapêutica .....	34
7.1. Quinolonas com atividade anticancerígena e anti-inflamatória.....	34
7.2. Quinolonas como agentes antituberculoso .....	38
7.3. Quinolonas com atividade antiviral .....	40
7.4. Quinolonas com atividade antimalária.....	42
7.5. Quinolonas nas doenças neuro-degenerativas.....	45
7.6. Outras atividades das quinolonas .....	48
8. Conclusão.....	50
9. Referências bibliográficas.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação de estruturas químicas dos compostos 6-cloro-1H-etil-4-oxo-quinoline-3-carboxílico (1), Cloroquina (2), 7-cloro-1-etil-1,4diidro-4-oxo-3-quinoline-3-carboxílico (3) e ácido nalidíxico (4). O esqueleto quinolónico está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12) .....	1
<b>Figura 2.</b> Representação das estruturas químicas da Moxifloxacina (5) e da Gatifloxacina (6). O esqueleto quinolónico está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	3
<b>Figura 3</b> Representação das estruturas dos núcleos quinolona (X=C) e naftiridona (X=N). .....	5
<b>Figura 4.</b> Representação das estruturas dos compostos ácido nalidíxico (4), ácido oxolínico (8), Cinoxacina (9), ácido pirimídico (10), ácido piperimídico (11) e flumequina (12). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	7
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura da norfloxacina (13). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	8
<b>Figura 6.</b> Representação da estrutura da enoxacina (14). Os substituintes característicos estão representados em azul. O azoto característico da naftiridona está representado em cor-de-rosa. (ChemDraw Ultra 12).....	9
<b>Figura 7.</b> Representação das estruturas dos compostos Pefloxacina (15), Lomefloxacina (16) e fleroxacina (17). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	9
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura do composto Ciprofloxacina (18). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	10
<b>Figura 9.</b> Representação da estrutura do composto Ofloxacina (19). O núcleo tricíclico está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12) .....	11
<b>Figura 10.</b> Representação da estrutura do composto Rufloxacina (20). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	12
<b>Figura 11.</b> Representação da estrutura do composto Nadifloxacina (21). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	12
<b>Figura 12.</b> Representação da estrutura química da levofloxacina (22). Os substituintes característicos estão representados em azul (ChemDraw Ultra 12).....	13
<b>Figura 13.</b> Representação da estrutura química da esparfloxacina (23). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	14
<b>Figura 14.</b> Representação da estrutura química da Temafloxacina (24). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	15
<b>Figura 15.</b> Representação das estruturas químicas dos compostos: Moxifloxacina (5), Gatifloxacina (6) e Gemifloxacina (25). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	16
<b>Figura 16.</b> Representação da estrutura química dos compostos: Trovafloxacina (26), Grepafloxacina (27) e da sitafloxacina (28). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12).....	17
<b>Figura 17.</b> Representação da estrutura química da besifloxacina. Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12) .....	18

<b>Figura 18.</b> Representação da estrutura química da norfloxacin evidenciando os azotos do grupo piperazínico. (ChemDraw Ultra 12) .....	22
<b>Figura 19.</b> Representação da estrutura química da alatrovafloxacin (29): A - Estrutura da L-alanil-L-alanil. B: Estrutura química da alatrovafloxacin. Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12) .....	24
<b>Figura 20.</b> Representação da estrutura do complexo [Zn(norfloxacin)4] (31) Adaptado de referência 73 (ChemDraw Ultra 12) .....	25
<b>Figura 21.</b> Representação da estrutura do complexo formado por ferro, nitriloacetato (nta) e ciprofloxacina [Fe(cip)(nta)] (32). Adaptado de referência 79.....	27
<b>Figura 22.</b> Representação esquemática dos mecanismos mais comuns de resistência contra as quinolonas. 1 – Mutações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV. 2 – Resistência mediada por plasmídeos. (2a) Proteínas Qnr; (2b) enzima variante aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC(6′)-Ib-cr; (2c) bombas de efluxo codificadas por plasmídeos. 3- Resistência mediada por mutações no cromossoma. (3a) Menor expressão de canais de porinas em organismos Gram-negativos; (3b) maior expressão de bombas de efluxo. Adaptado de referência 83. ....	31
<b>Figura 23.</b> Representação da estrutura química da Vareloxina ou Vosaroxina (33). (ChemDraw Ultra 12) .....	35
<b>Figura 24.</b> Representação da estrutura química dos compostos 34 e 35 (ChemDraw Ultra 12) .....	36
<b>Figura 25.</b> Representação da estrutura química da craetamina (36), obtida a partir da Crataeva nurvala .....	37
<b>Figura 26.</b> Representação da estrutura química do composto 37 (ChemDraw Ultra 12).....	39
<b>Figura 27.</b> Representação da estrutura química do elvitegravir (ChemDraw Ultra 12).....	41
<b>Figura 28.</b> Representação da estrutura química do composto 39 (ChemDraw Ultra 12).....	42
<b>Figura 29.</b> Representação da estrutura química dos compostos Endoquina (40) e ELQ-300 (41)....	43
<b>Figura 30.</b> Representação da estrutura química dos compostos Decoquinato (42) e RCQ (43).....	44
<b>Figura 31.</b> Representação gráfica do processo que conduziu ao desenvolvimento do composto CK-2-68 a partir da estrutura química do composto HDQ - 7-cloro-3-metil-2-(4-(4-trifluorometoxi)benzil)fenil)quinolin-4(1H)-ona, que envolveu a utilização de ferramentas quimioinformáticas e de varrimento de alto-rendimento (do inglês High Throughput screening HTS) na otimização do composto inicial (Hit to Lead). Adaptado da referência 152. (ChemDraw Ultra 12) .....	45
<b>Figura 32.</b> Representação da estrutura química do composto 46 (ChemDraw Ultra 12).....	46
<b>Figura 33.</b> Representação da estrutura química dos compostos 46 e 47. O grupo catecol está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12) .....	47
<b>Figura 34.</b> Representação da estrutura química do composto quinolónico com afinidade para o recetor GABAA, usado como modelo (49) (ChemDraw Ultra 12) .....	49
<b>Figura 35.</b> Representação da estrutura química dos compostos derivados da estrutura 6-(piridazinona)-3-quinolona com moderada atividade vasodilatadora, 50 e 51 (ChemDraw Ultra 12) .....	49
<b>Figura 36.</b> Representação da estrutura química do flosequinano (52) e do seu metabolito ativo, flosequinoxano (53) (ChemDraw Ultra 12).....	50

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADME - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
- ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroides
- AVC - Acidente vascular cerebral
- BQCA - Benzyl Quinolone Carboxylic Acid
- CB1/CB2 – Cannabinoid Receptor -1 and 2 (recetores canabinóides 1 e 2)
- DA - Doença do Alzheimer
- DGS - Direção Geral de Saúde
- EARS - European Antimicrobial Resistance Surveillance (vigilância europeia de resistência antimicrobiana)
- ECDC - European Centre for Disease Preventions and Control (centro europeu de prevenção e controlo de doenças)
- ESAC - European Surveillance of Antimicrobial Consumption (Vigilância Europeia do Consumo de Antibióticos)
- FDA - Food and Drug Administration
- GABA – Gamma-AminoButyric Acid (ácido Gama aminobutirico)
- GI - Gastrointestinal
- HDQ - Hidroxi-2-Dodecil-4-(1H)-Quinolona
- HIV- Human Immunodeficiency Vírus (vírus da imunodeficiência humana)
- INFARMED - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, I.P.
- mACHR – Muscarinic Acetylcholine Receptor (recetor colinérgico muscarínico)
- MAO - Monoamino oxidase
- MDR-TB – Multi-Drug Resistance Tuberculosis (tuberculose multirresistente)
- mhGAP - Mental Health Gap Action
- MRSA - Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus resistente a metilina)
- MS - Mass Spectroscopy (espectroscopia de massa)
- NS5B - Non-Structural Protein 5b (Proteína 5B não estrutural)
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PfNDH2 - NADH:ubiquinona oxidoreductase do parasita
- PROFILE - Prospective Randomized Flosequinan Logevity Evaluation
- qnr - Quinolone resistance (Resistência a quinolonas)
- Qo - Quinol Oxidativo
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- ROS – Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigénio)
- RpRd –RNA polimerase RNA dependente

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC - Sistema nervoso central

TB - Tuberculose

TNF – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

VHC - vírus da hepatite C

XDR-TB – Extensively drug-Resistance tuberculosis (resistência extensiva medicamentos antituberculosos)

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a química medicinal é uma disciplina da área de química que envolve recursos das ciências biológicas, medicinais e farmacêuticas. Tem como finalidade a invenção, descoberta, *design* e síntese de compostos com atividade farmacológica, a interpretação do seu mecanismo de ação a nível molecular, o estudo quantitativo de correlações entre estrutura química e atividade farmacológica (QSAR) e o estudo do metabolismo de fármacos<sup>1</sup>. Os químicos medicinais visam encontrar compostos líder através da preparação e/ou seleção de um composto apropriado para uma avaliação biológica. No caso de ser comprovada a sua atividade e seletividade, do ponto de vista farmacológico ou bioquímico, o composto pode ser utilizado como base para identificar novos candidatos a fármacos<sup>2</sup>.

Muitas das grandes descobertas na área da química medicinal foram feitas ao acaso. Um caso notório é a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, que conduziu a uma diminuição drástica da taxa de mortalidade devida a infeção, na primeira metade do século XX. Com esta obra accidental deu-se início à **Era dos antibióticos**. Após o isolamento e comercialização da penicilina, a corrida para a descoberta de novos antibióticos aumentou. De entre os vários quimiotipos explorados, as quinolonas destacaram-se pela sua importância, sendo mais um exemplo de compostos cuja atividade antimicrobiana foi descoberta acidentalmente. No entanto, ao contrário da penicilina e de outros antibióticos isolados de organismos vivos, as quinolonas são obtidas por síntese química<sup>3</sup>.

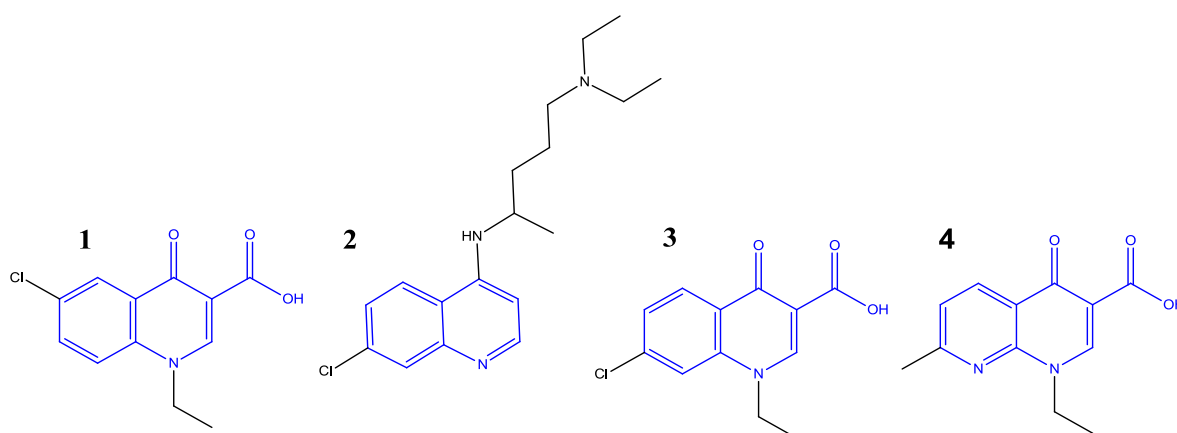


Figura 1. Representação de estruturas químicas dos compostos 6-cloro-1H-etil-4-oxo-quinoline-3-carboxílico (**1**), Cloroquina (**2**), 7-cloro-1-etil-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoline-3-carboxílico (**3**) e ácido nalidíxico (**4**). O esqueleto quinolónico está representado em azul.

(ChemDraw Ultra 12)

O primeiro alcalóide com estrutura de quinolona foi sintetizado por Price<sup>4</sup>, mas o composto obtido não possuía atividade antimicrobiana. Em 1960, Barton e a sua equipa conseguiram sintetizar o ácido 6-cloro-1H-etil-4-oxo-quinolina-3-carboxílico (**1, Figura 1**), que exibiu atividade antimicrobiana. Porém, foi Lesher e a sua equipa que, durante a síntese do composto anti malárico cloroquina (**2, Figura 1**), descobriram a estrutura base das quinolonas atuais<sup>5</sup>.

No final da década de 50, no Instituto de Investigação Sterling-Winthrop, vários investigadores trabalhavam no isolamento e caracterização de subprodutos e impurezas da síntese da cloroquina. Um dos compostos em estudo correspondia a um regioisómero de um intermediário na síntese de cloroquina, o ácido 7-cloro-1-etil-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolina-3-carboxílico (**3, Figura 1**). Após a sua preparação em maior quantidade, e após realização de vários testes biológicos, verificaram que o composto possuía alguma atividade biológica *in vitro*, servindo assim de base para o *desenho* e síntese de um análogo mais potente. Dessa investigação surgiu, em 1962, um importante precursor das quinolonas contemporâneas – o ácido nalidíxico (**4, Figura 1**)<sup>6</sup>. Este composto foi introduzido no mercado em 1967, para o tratamento de infeções não complicadas no trato urinário, causadas por enterobactérias<sup>7</sup>.

As quinolonas destacam-se como um grupo de compostos específicos que atuam sobre duas enzimas essenciais para a replicação do DNA bacteriano, inibindo-as. Esta capacidade está na base da sua atividade bactericida. As enzimas alvo são duas topoisomerases bacterianas, nomeadamente, a DNA girase, também designada por topoisomerase II, e a topoisomerase IV. A DNA girase tem a função de evitar o superenrolamento do DNA circular bacteriano frente à forquilha de replicação, enquanto a topoisomerase IV tem a função de separar os cromossomas formados, permitindo a divisão da célula em duas células filhas. Em organismos gram-positivos, a topoisomerase IV é o principal alvo das quinolonas, enquanto que em organismos gram-negativos o alvo principal é a DNA girase<sup>8</sup>.

Segundo alguns autores, as quinolonas correspondem ao quimiotipo mais interessante dos compostos antimicrobianos, constituindo um grupo de compostos bioativos relativamente grande, e em permanente crescimento. O interesse neste grupo advém da versatilidade dos compostos ao nível farmacológico, sendo-lhes atribuídas muitas das características de um antibiótico ideal, tais como potência, biodisponibilidade, largo espectro de ação, baixa toxicidade para o hospedeiro e possibilidade de formulações orais e intravenosas. Muitos investigadores têm trabalhado

arduamente para desenhar e otimizar estruturas com esses e outros atributos, usando as ferramentas e abordagens da química medicinal<sup>5</sup>.

As estratégias de desenvolvimento de novos fármacos através da química medicinal evoluíram de forma substancial, deixando de depender exclusivamente de dados de ensaios *in vivo* e passando a utilizar também novas tecnologias, como o “high-throughput *in vitro* screening” (HTC) e a tecnologia combinatória. Acresce a existência de grandes bibliotecas de compostos, o melhor conhecimento dos alvos moleculares e o desenvolvimento de fármacos baseados na sua estrutura química e interações que podem estabelecer, ferramentas que são essenciais para o progresso e sucesso na conceção, síntese e desenvolvimento de novos compostos com atividade terapêutica e propriedades farmacológicas otimizadas<sup>2</sup>.

Inicialmente, a química medicinal representou uma esperança na salvaguarda do problema de seleção de resistências aos antibióticos. Foram desenvolvidas novas classes de antibióticos, tais como os aminoglicosídeos e os macrólidos. Porém, as bactérias desenvolvem rapidamente mecanismos de defesa eficazes, conseguindo resistir a diversas formas de ataque<sup>9</sup>. O aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos agentes antibióticos e antimicrobianos é inevitável, dependendo o mecanismo de resistência do tipo de alvo em que os fármacos atuam e da estrutura molecular destes. As bactérias são capazes de adquirir resistência através de mecanismos genéticos, como as transposições e a transferência de plasmídeos, ou através de mutações<sup>10</sup>. Recentemente, a seleção de resistência aos antibióticos tem sido retardada através do *design* e otimização inteligente de novos agentes antimicrobianos<sup>9</sup>. Pode citar-se como exemplo a adição de grupos metoxi (OCH<sub>3</sub>) na posição 8 do núcleo quinolona, no caso da moxifloxacina (**5**, **figura 2**) e da gatifloxacina (**6**, **figura 2**), representadas na Figura 2, dois compostos aprovados em 1999 que são ativos contra microrganismos resistentes a quinolonas mais antigas<sup>10</sup>.

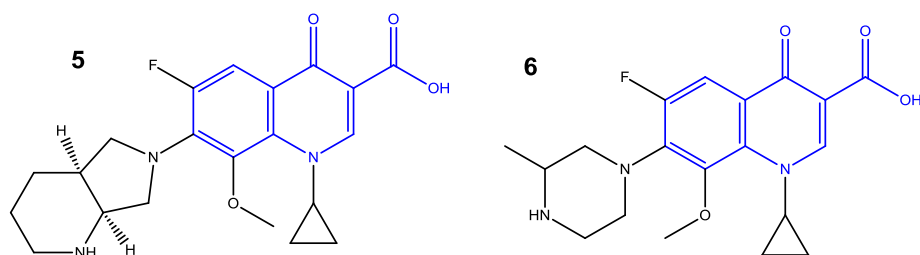


Figura 2. Representação das estruturas químicas da Moxifloxacina (**5**) e da Gatifloxacina (**6**). O esqueleto quinolónico está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12)

Atualmente estão em curso diversos estudos sobre outras aplicações farmacológicas das quinolonas. O interesse nestes compostos advém do fato de se tratar de moléculas multifacetadas, acessíveis através de rotas de síntese simples e flexíveis, que permitem a produção de grandes bibliotecas de moléculas bioativas. Essas propriedades, combinadas com as novas abordagens e ferramentas da química medicinal, permitem aos cientistas descrever com razoável precisão os modelos QSAR dos compostos, o que é fundamental para a eficácia do *design* de novos medicamentos com diferentes atividades para além da atividade antimicrobiana. Assim, o quimiotipo das quinolonas permanece uma fonte de esperança no desenvolvimento de novos compostos com utilidade clínica.<sup>11</sup>

## 2. ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DAS QUINOLONAS

A descoberta e o desenvolvimento da primeira quinolona com propriedades terapêuticas – o ácido nalidíxico – desencadeou o interesse de diversos investigadores em sintetizar e testar compostos desta família. Entre as décadas de 60 e 70 do século passado observou-se uma expansão notável da investigação nesta área<sup>12</sup>.

Desenvolvido a partir do ácido 7-cloro-1-etil-1,4-diidro-4-oxo-3-quinolina-3-carboxílico (**3, Figura 1**), o ácido nalidíxico foi alvo de inúmeras modificações com o intuito de melhorar as suas propriedades farmacológicas. A relação estrutura-atividade do modelo foi aperfeiçoada, levando a um aumento de atividade, ao mesmo tempo que as suas propriedades farmacocinéticas foram otimizadas e a sua toxicidade reduzida<sup>13</sup>.

Inicialmente, o ácido nalidíxico detinha um uso limitado na prática clínica devido ao seu baixo espectro de ação, baixo nível plasmático e toxicidade<sup>13</sup>. Em estudos efetuados, o ácido nalidíxico mostrou excelente atividade contra bactérias entéricas, mas pouca ou nenhuma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias gram-positivas. No entanto, devido à sua baixa absorção oral e, conseqüentemente, baixa capacidade de atingir concentrações séricas terapêuticas, verificou-se que o ácido nalidíxico não poderia ser utilizado no tratamento de infeções sistémicas. Contudo, este poderia ser utilizado em infeções urinárias, devido a grande acumulação do fármaco a nível urinário, atingindo valores terapêuticos. Como consequência da sua absorção incompleta, verificou-se também que o ácido nalidíxico atingia elevada concentração nas fezes, e poderia assim ser utilizado em diarreias causadas por *Shigella*. No entanto nunca foi amplamente utilizado

para esse fim. Outra possível aplicação proposta para o ácido nalidíxico, mas sem sucesso, seria o uso como agente profilático, seletivo, nos intestinos, em doentes neutropénicos<sup>14</sup>.

Após a sua introdução no mercado, verificaram-se diversos efeitos adversos significativos, tais como dores de cabeça, distúrbios gastrointestinais e oftalmológicos, reações de fotossensibilidade e convulsões, em doentes predispostos a esta patologia<sup>14</sup>.

Para além das limitações associadas ao uso do ácido nalidíxico na prática clínica, como antimicrobiano, rapidamente se verificou a seleção de estirpes bacterianas resistentes, intensificando a necessidade do desenvolvimento de novos compostos de forma a ultrapassar os problemas, tanto ao nível da resistência<sup>15</sup> como ao nível das suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, interações e efeitos secundários.

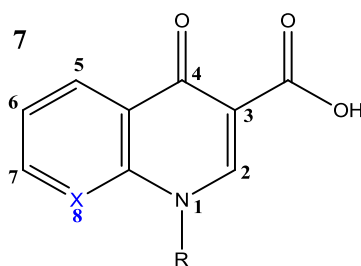


Figura 3. Representação das estruturas dos núcleos quinolona (X=C) e naftiridona (X=N). (ChemDraw Ultra 12)

Os agentes antimicrobianos designados comumente por quinolonas incluem as **quinolonas** e as **naftiridona**. A estrutura base de ambos os subgrupos contém um grupo carboxilo na posição 3 e um oxigénio exocíclico na posição 4, o que confere um segundo nome genérico a esta classe: as 4-quinolonas.<sup>12</sup> Os compostos que possuem um azoto na posição 1 e outro na posição 8 (**7, Figura 3**) são classificados como naftiridonas. Os compostos contendo apenas um azoto na posição 1 são classificados como quinolonas (**7, figura 3**)<sup>15</sup>.

O grupo carboxilo da posição 3, juntamente com o grupo cetona da posição 4, são considerados essenciais na atividade das quinolonas, uma vez que é através destes grupos que serão estabelecidas as ligações por pontes de hidrogénio com as bases da cadeia simples de DNA bacteriano. Estas interações interferem com a ação da DNA girase e/ou da topoisomerase IV, induzindo a inibição da replicação, transcrição, reparação e recombinação do DNA bacteriano e conduzindo à morte celular.<sup>5,12,15</sup>

Com o constante aumento do número de quinolonas disponíveis no mercado surgiu a necessidade de as classificar de forma clara e intuitiva, de forma a facilitar a sua identificação e até mesmo a sua prescrição por parte dos médicos<sup>16</sup>. As quinolonas podem ser divididas através de vários sistemas de classificação, sendo a classificação por gerações a mais encontrada na literatura atualmente. No entanto podem ainda ser classificadas segundo as suas propriedades farmacocinéticas, a sua tolerabilidade, formas de administração, indicações terapêuticas, estrutura química e ainda por ordem cronológica de aprovação no mercado<sup>17</sup>.

A classificação das quinolonas por gerações tem em conta o espectro antimicrobiano e as indicações terapêuticas. Os membros de uma geração são similares na atividade antimicrobiana e cada nova geração corresponde a maior espectro de ação. Este sistema de classificação foi introduzido em 1997 e mostrou ser uma forma eficaz de agrupar os diferentes membros dessa classe de antibióticos, facilitando a prescrição e a categorização dos novos agentes antimicrobianos introduzidos no mercado<sup>16</sup>.

### 2.1. QUINOLONAS DE PRIMEIRA GERAÇÃO

As primeiras modificações realizadas à estrutura do ácido nalidíxico deram origem às quinolonas de **primeira geração**: ácido oxolínico, cinoxacina, ácido piromídico, ácido piperimídico e flumequina<sup>12</sup>.

As duas primeiras **quinolonas** obtidas a partir do ácido nalidíxico foram o ácido oxolínico (**8**, figura 4) e a cinoxacina (**9**, figura 4). O ácido oxolínico (**4**, Figura 4) foi obtido através da remoção de um azoto na posição 8, fazendo com que a sua estrutura retorne à estrutura quinolónica do composto líder original (**3**, Figura 1), e da adição de um anel oxolano às posições 6 e 7. A cinoxacina e o ácido oxolínico possuem um anel oxolano na posição 6 e 7. O ácido oxolínico possui também um átomo de azoto adicional na posição 2 (**9**, Figura 4)<sup>12</sup>.

Os primeiros compostos derivados diretamente do ácido nalidíxico com estrutura **naftiridona** são os ácidos piromídico (**10**, figura 4) e piperimídico (**11**, figura 4). Estes ácidos possuem um átomo de azoto adicional na posição 6 e os grupos tetra-hidropirrólico e piperazínico na posição 7, respetivamente, o que confere a estes dois compostos maior atividade contra bactérias gram-negativas, incluindo espécies do género *Pseudomonas*, capacidade esta que não estava presente nas quinolonas anteriores. O ácido piperimídico mostrou ainda ter alguma atividade contra espécies gram-positivas, devido à presença do anel piperidínico que permite uma melhor

penetração na parede celular, aumentando a sua atividade.<sup>15</sup> As fluoroquinolonas com anel pirrolidínico na posição 7 são comuns, e permitem melhorias ao nível da atividade contra bactérias gram-positivas. No entanto, o anel pirrolidínico está também associado a uma menor biodisponibilidade oral devido à baixa solubilidade aquosa que confere aos compostos, pondo em causa a atividade *in vivo*. Essa desvantagem pode ser contrariada com a introdução de grupos metilo no anel, o que melhora a solubilidade do composto.<sup>18</sup> Os substituintes da posição 7 são essenciais para regular o espectro de ação, a biodisponibilidade e os efeitos secundários.<sup>15</sup>

A flumequina (**12**, **figura 4**) corresponde à primeira quinolona com um átomo de flúor na posição 6. Esta inovação foi muito importante, fornecendo indícios de que a atividade contra bactérias gram-positivas podia ser melhorada nesta classe<sup>15,18</sup>, pois resultou num aumento da atividade contra enterobactérias, incluindo bactérias resistentes ao ácido nalidíxico<sup>5</sup>. Com esta simples alteração, a inibição da DNA girase aumentou cerca de 10 vezes e a atividade antibacteriana tornou-se cerca de 100 vezes superior à exibida pelas quinolonas anteriores.<sup>18</sup>

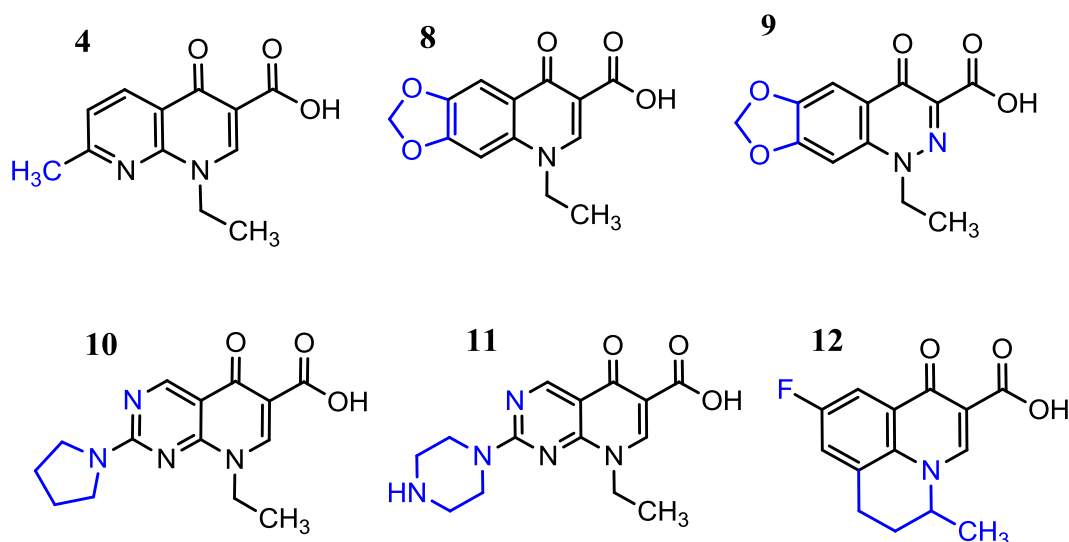


Figura 4. Representação das estruturas dos compostos ácido nalidíxico (**4**), ácido oxolínico (**8**), Cinoxacina (**9**), ácido piperimidico (**10**), ácido piperimidico (**11**) e flumequina (**12**). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

As quinolonas de primeira geração mostraram ser eficazes contra bactérias gram-negativas aeróbias, como as bactérias do género *Pseudomonas*. No entanto, a sua fraca atividade contra organismos gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios, continua sendo uma grande deficiência na sua gama antibacteriana<sup>3</sup>. Apesar de não haver melhorias muito significativas relativamente às propriedades farmacoterapêuticas, quando comparado ao ácido nalidíxico, as quinolonas de primeira geração permitem boa absorção após administração oral e concentram-se ao nível do

trato urinário, sendo úteis no tratamento de infecções urinárias não complicadas<sup>15</sup>. Estruturalmente, o grupo substituinte na posição R<sub>1</sub> manteve-se inalterado, como pode ser observado na figura 4, devido ao fato de se pensar na altura que, para manter uma boa potência antibacteriana, este não deveria ser maior que um grupo etilo.

## 2.2. QUINOLONAS DE SEGUNDA GERAÇÃO

A verdadeira inovação nesta classe surgiu em 1980, nos laboratórios Kyorin, no Japão, através da conjugação do átomo de fluor na posição 6 da flumequina com o anel piperazínico na posição 7 do ácido piperazínico, de que resultou a **norfloxacin** (**13**, **Figura 5**), uma fluoroquinolona de **segunda geração**. A norfloxacin mostrou possuir um espectro de ação mais abrangente que o das quinolonas de primeira geração, sendo ativa contra organismos Gram-negativos e alguns Gram-positivos. Porém, ainda não era adequada para uso sistêmico<sup>15</sup>.

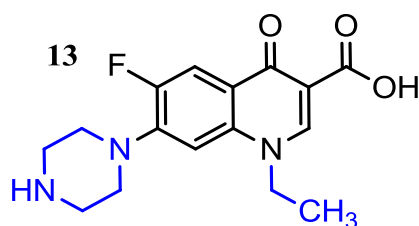


Figura 5. Representação da estrutura da norfloxacin (**13**). Os substituintes característicos estão representados em azul.

(ChemDraw Ultra 12)

A primeira fase de evolução estrutural, desde o ácido nalidíxico à norfloxacin, desenrolou-se durante mais de vinte anos. Contudo, a fase seguinte foi muito rápida. Na investigação farmacêutica, grandes descobertas podem ser rapidamente sucedidas por descobertas ainda mais surpreendentes, e a norfloxacin deu início a um período próspero de investigação na modificação de fluoroquinolonas<sup>15</sup>. A norfloxacin, primeira fluoroquinolona desenvolvida<sup>12</sup>, foi patenteada em 1978. Nos 3 anos seguintes, muitas outras fluoroquinolonas foram patenteadas, algumas das quais ainda são usadas clinicamente<sup>15</sup>.

A norfloxacin possui um tempo de meia vida entre 3 a 4 horas, maior que as quinolonas mais antigas, e menor adesão às proteínas plasmáticas (50%)<sup>5</sup>. A introdução de um átomo de fluor na posição 6 alterou de forma significativa a potência do composto, conduzindo a um aumento na capacidade de inibição da enzima DNA girase e na capacidade de penetração na parede celular, em cerca de 10 e 100 vezes, respetivamente<sup>18</sup>. Essa modificação foi tão importante que levou as quinolonas subsequentes a adotar o átomo de fluor na posição 6, surgindo uma subclasse

designada por **fluoroquinolonas**. A norfloxacin mostrou alguma atividade contra estirpes Gram-positivas e maior atividade antimicrobiana contra estirpes Gram-negativas, em relação aos análogos anteriormente desenvolvidos. No entanto as suas aplicações continuavam limitadas ao tratamento de doenças no trato urinário, como as doenças sexualmente transmissíveis e a prostatite, devido ao seu reduzido nível plasmático e distribuição tecidual<sup>12</sup>.

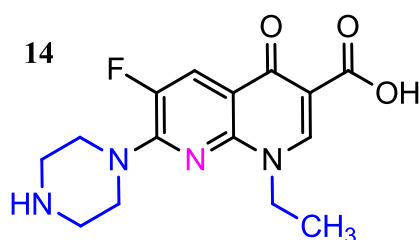


Figura 6. Representação da estrutura da enoxacina (14). Os substituintes característicos estão representados em azul. O azoto característico da naftiridona está representado em cor-de-rosa. (ChemDraw Ultra 12)

A **enoxacina (14, figura 6)** possui uma estrutura similar à da norfloxacin e espectro de ação semelhante. É um análogo nalidixic acid com a capacidade de atingir valores plasmáticos terapêuticos e de penetrar em tecidos com inflamação leve, podendo ser utilizada em algumas doenças sistêmicas provocadas por microrganismos sensíveis, como bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*<sup>19</sup>.

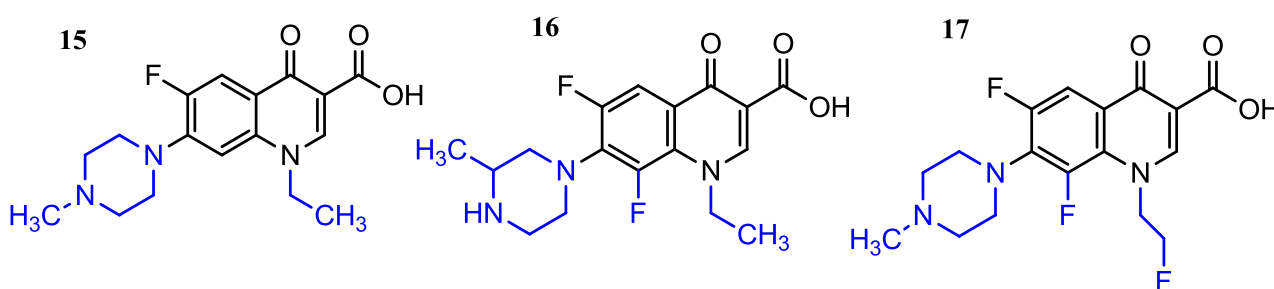


Figura 7. Representação das estruturas dos compostos Pefloxacin (15), Lomefloxacin (16) e fleroxacin (17). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

A importância da estrutura química na eficácia da interação com os sítios alvos e consequente efeito fisiológico (farmacodinâmica) pode ser comprovada pelas pequenas alterações realizadas à estrutura da norfloxacin. Apesar de simples, essas modificações originam compostos com alterações bastante significativas nas propriedades biológicas. A partir da norfloxacin, a substituição do hidrogénio ligado ao azoto no grupo piperazínico por um grupo metilo origina a **pefloxacin (15, figura 7)**, com maior absorção oral, maior atividade *in vivo*<sup>5</sup> e com o dobro do tempo de semivida da norfloxacin, o que permite uma melhor adesão à terapêutica por reduzir

as tomas diárias. A adição de átomos de flúor e de um grupo metilo no anel piperazínico origina a **lomexacina (16, figura 7)** e **fleroxacina (17, figura 7)**, com maior tempo de semivida e maior absorção oral<sup>12</sup>. No entanto, a presença de mais um átomo de flúor potencia a formação de espécies reativas de oxigénio ao nível da pele, dando origem a problemas dermatológicos, como queimaduras. Esta fotossensibilidade é um risco comum a todas as fluoroquinolonas mais recentes, e que contêm mais de um átomo de fluor ou átomos de cloro na sua estrutura. Hoje sabe-se que fluoroquinolonas como a **levofloxacina (22, figura 12)** (ciclo 1,8) e 8-metoxiquinolonas são as menos suscetíveis de provocar fotossensibilidade, pelo fato de não conterem na posição C-8 um substituinte halogéneo.<sup>20</sup> A característica estrutural relevante destes compostos é a presença de grupos metilo no anel piperazínico que são tidos como os responsáveis pela melhoria da absorção oral e atividade *in vitro* desses fármacos,<sup>18</sup> como veremos posteriormente.

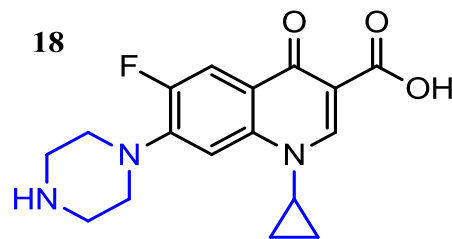


Figura 8. Representação da estrutura do composto Ciprofloxacina (18). Os substituintes característicos estão representados em azul.  
(ChemDraw Ultra 12)

A ligação de um grupo ciclopropilo ao azoto na posição N-1 da norfloxacina origina a **ciprofloxacina (18, figura 8)**, uma das poucas fluoroquinolonas disponíveis em formulação parenteral e oral<sup>21</sup>, comercializada em todo mundo com mais de 300 nomes comerciais. A ciprofloxacina apresenta um perfil farmacocinético melhorado em comparação com outras fluoroquinolonas mais antigas, com maior capacidade de atingir concentração terapêutica plasmática e uma maior penetração tecidual, devido ao grande volume de distribuição. Até a data, é a fluoroquinolona mais potente, possuindo um largo espectro de ação associado a características de segurança bem estabelecidas.<sup>22</sup> Os bacilos Gram-negativos aeróbios como os da família Enterobacteriaceae e os cocos Gram-negativos do género *Neisseria* são os organismos mais suscetíveis<sup>22</sup>, sendo a ciprofloxacina também a fluoroquinolona mais potente contra *P. aeruginosa*.<sup>16</sup> Ao contrário das outras fluoroquinolonas, a ciprofloxacina poderia ser utilizada no tratamento de infeções do trato respiratório inferior, pele, ossos e articulações, para além de infeções urinárias e sexualmente transmissíveis. Porém, não é o antibiótico de primeira linha no

tratamento de infecções no trato respiratório inferior e sinusite aguda, devido a resistência desenvolvida pelo *S. pneumoniae* contra esta classe de antibióticos.<sup>12,16</sup> Em 1999, o valor das vendas deste fármaco foi de aproximadamente 1,04 bilhões de dólares, sendo a ciprofloxacina o 11º antibiótico mais prescrito nos EUA<sup>22</sup>.

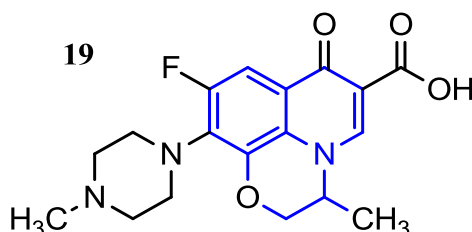


Figura 9. Representação da estrutura do composto Ofloxacina (19). O núcleo tricíclico está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12)

A **ofloxacina (19, Figura 9)** é uma fluoroquinolona de segunda geração, mais potente que a norfloxacina e que o ácido piperimídico<sup>23</sup>. É eficaz contra bactérias do género *Mycoplasma* e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tais como as do género *Chlamydia* e *Legionella*, sendo a fluoroquinolona mais eficaz contra *Chlamydia trachomatis*. É eficazmente utilizada em patologias sistémicas, como infecções do trato respiratório, gastrointestinal, pele e osso, bem como em patologias do trato urinário, prostatite e doenças sexualmente transmissíveis<sup>24</sup>.

A estrutura da ofloxacina deriva da junção da estrutura da flumequina com a da pefloxacina, mantendo o núcleo tricíclico da flumequina entre o azoto N-1 e o carbono C-8<sup>12</sup>, e o grupo metilpiperazínico na posição 7, tal como a pefloxacina.

A forma farmacêutica mais utilizada na administração da ofloxacina é a oral, com comprimidos de libertação imediata administrados duas vezes por dia, durante vários dias ou semanas. No entanto, devido à baixa solubilidade da ofloxacina em meio aquoso, torna-se complicado obter um padrão de biodisponibilidade constante e, em administrações prolongadas, podem observar-se desordens do sistema nervoso e gastrointestinal. Nos últimos anos têm sido estudadas novas formulações, com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir a frequência da administração da ofloxacina. Esta pesquisa centra-se na obtenção de métodos e materiais adequados para encapsular a ofloxacina em nanopartículas, recorrendo a métodos como a polimerização,<sup>25</sup> a materiais como a albumina de soro bovino (BSA)<sup>26</sup> e a lípidos sólidos como o ácido palmítico.<sup>24</sup>

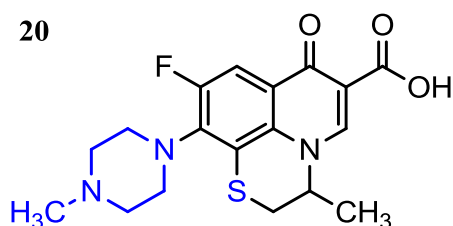


Figura 10. Representação da estrutura do composto Rufloxacina (20). Os substituintes característicos estão representados em azul.  
(ChemDraw Ultra 12)

Com a substituição do átomo oxigénio por um átomo de enxofre, no anel tricíclico da ofloxacina, obtém-se a **rufloxacina (20, Figura 10)**, uma fluoroquinolona caracterizada pelo seu longo tempo de semivida (>28h). Esta propriedade confere a vantagem de apenas ser necessária uma administração diária, como acontece com a lomefloxacina e a fleroxacina, proporcionando uma melhoria do ponto de vista da adesão à terapêutica.<sup>12,27</sup> É eficaz contra a maioria das bactérias da família *Enterobacteriaceae* e outras, como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *staphylococci* sensíveis à meticilina, no entanto a sua atividade é reduzida contra *Pseudomonas aeruginosa* e microrganismos dos géneros streptococos e staphilococos resistentes a meticilina. Segundo Moretti et al., a rufloxacina difunde-se eficazmente no fluido cérebro-espinal, constituindo um possível quimiotipo no tratamento da meningite. De acordo com o mesmo estudo, a rufloxacina tem a capacidade de penetrar tanto nas meninges inflamadas como nas meninges não inflamadas, podendo também ser utilizada como agente antimicrobiano profilático após procedimentos neurocirúrgicos ou na prevenção de meningite bacteriana aguda<sup>28</sup>.

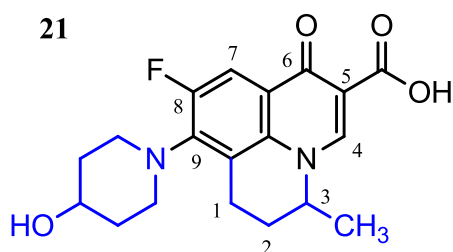


Figura 11. Representação da estrutura do composto Nadifloxacina (21). Os substituintes característicos estão representados em azul.  
(ChemDraw Ultra 12)

Após a análise de diversos compostos desenvolvidos com base na combinação do núcleo tricíclico da flumequina com diversos grupos funcionais, houve um que se destacou devido à sua forte atividade contra o *Propionibacterium acnes*, principal bactéria causadora do acne<sup>29</sup>. A nadifloxacina (**21, Figura 11**) possui um átomo de fluor na posição 8 e um grupo 4-hidroxi-1-piperidinil na posição 9. Esta fluoroquinolona de segunda geração destaca se pela sua utilização no

tratamento tópico do acne inflamatório, devido à sua capacidade de inibir a ativação das células T e dos queratinócitos, inibindo a migração dos neutrófilos e a produção de espécies reativas de oxigênio<sup>30</sup>.

As quinolonas de segunda geração possuem várias melhorias relativamente às de primeira geração. Estruturalmente, observa-se a permanência do átomo de flúor na posição C6 e do anel piperazínico na posição C7, substituintes estes que permitiram o aumento da atividade antimicrobiana contra organismos Gram-negativos e contra algumas bactérias aeróbias Gram-positivas, tais como bactérias do género *Staphilococcus*. A atividade contra organismos anaeróbios continua a ser a grande lacuna das fluoroquinolonas de segunda geração<sup>3</sup>.

Apesar de necessitarem de múltiplas doses, as fluoroquinolonas de segunda geração, como a pefloxacina, lomefloxacina, fleroxacina e rufloxacina, apresentam melhorias ao nível da farmacocinética, permitindo a redução das tomas diárias e até mesmo a administração numa dose diária. Possuem também uma maior gama de aplicação clínica, incluindo doenças sexualmente transmissíveis, pielonefrite, algumas pneumonias e infeções dérmicas, além de infeções urinárias.<sup>16</sup> No entanto, são menos potentes que a ciprofloxacina<sup>12</sup>.

### 2.3. QUINOLONAS DE TERCEIRA GERAÇÃO

Com o intuito de se encontrar a quinolona ideal, prosseguiu a investigação e surgiram as quinolonas de **terceira geração**. Estas fluoroquinolonas possuem uma maior complexidade estrutural, mas apresentam melhorias a nível da atividade antimicrobiana e dos parâmetros farmacocinéticos. O seu espetro de ação já engloba organismos como o *Staphilococcus pneumoniae* e os fármacos possibilitam uma única administração diária, sem prejuízo da potência, o que é muito vantajoso.<sup>31</sup>

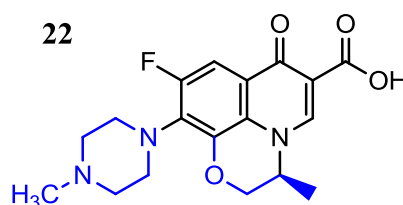


Figura 12. Representação da estrutura química da levofloxacina (22). Os substituintes característicos estão representados em azul (ChemDraw Ultra 12)

A levofloxacin (22, Figura 12) é uma quinolona de terceira geração obtida por separação dos dois enantiómeros da ofloxacin. É uma forma opticamente ativa da mistura racémica da ofloxacin e o seu nome deriva do fato de este enantiómero desviar o plano da luz polarizada para a esquerda. A levofloxacin possui os mesmos parâmetros farmacocinéticos e perfil toxicológico que a ofloxacin, no entanto é duas vezes mais ativa contra espécies gram-positivas e gram-negativas, apresentando por conseguinte uma maior capacidade de inibir a enzima DNA girase que a mistura racémica de que proveio.<sup>32</sup> De referir que, na mistura racémica, apenas um enantiómero é ativo, pelo que a duplicação na atividade da forma enantiomérica ativa, em relação à do racemato, não é de surpreender.

A Levofloxacin é utilizada no tratamento de infeções no trato respiratória (bronquite crónica, sinusite bacteriana aguda, pneumonia nosocomial e pneumonia adquirida na comunidade) devido à sua excelente penetração nestes tecidos e à sua atividade contra os organismos causadores de infeções ao nível do trato respiratório superior e inferior, como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *S. aureus*. Também é utilizada em infeções na pele e em infeções geniturinárias.

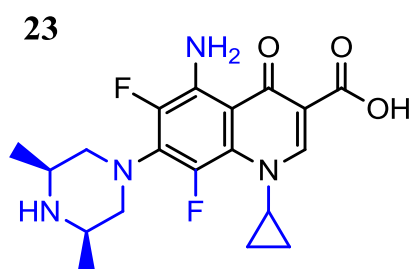


Figura 13. Representação da estrutura química da esparfloxacin (23). Os substituintes característicos estão representados em azul.  
(ChemDraw Ultra 12)

A esparfloxacin (23, Figura 13) foi a primeira fluoroquinolona comercializada contendo dois átomos de flúor na sua constituição. Possui um anel ciclopropilo na posição N-1, dois átomos de flúor, um na posição 6 e outro na posição 8, e um grupo 3,5-dimetilpiperazina na posição 7. A sua estrutura permite um amplo espectro de atividade antimicrobiana, com maior atividade contra cocos gram-positivos e bactérias anaeróbias<sup>33</sup> que a ciprofloxacin, ofloxacin e levofloxacin. No entanto, estas quinolonas não superam a atividade das fluoroquinolonas de quarta geração, gatifloxacin, moxifloxacin, sitafloxacin e trovafloxacin, contra espécies anaeróbias.<sup>15</sup> O átomo de flúor adicional aumenta também a absorção e o tempo de semivida plasmático, permitindo a administração numa única dose diária. A esparfloxacin é utilizada no tratamento de crises agudas de bronquite crónica e pneumonia adquirida na comunidade.<sup>34</sup> Por outro lado, como possui um

halogénio na posição 8, a fototoxicidade representa um efeito adverso significativo. Estudos demonstraram uma grande incidência de toxicidade cutânea como eritema, prurido, urticária, exantema e erupções cutâneas, assim como toxicidade ocular, provocando perda da visão central devido à deterioração da mácula. Estes efeitos podem resultar da produção de espécies reativas de oxigénio ou de produtos de fotodegradação altamente reativos que podem alterar lípidos, proteínas e ácidos nucleicos.<sup>35,36</sup> Outro efeito secundário significativo da esparfloxacina é a cardiotoxicidade. Estudos realizados com base em técnicas e abordagens da biologia molecular demonstraram que a esparfloxacina possui uma capacidade considerável de indução do prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma de pacientes que utilizem esta fluoroquinolona. Esta alteração está relacionada com o bloqueio dos canais de potássio, retificadores retardados relacionados com o gene *Human ether-à-go-go* (HERG) e importantes na correta repolarização do potencial de ação ventricular. O bloqueio daqueles canais pode conduzir a arritmias ventriculares e a morte súbita.<sup>37-39</sup>

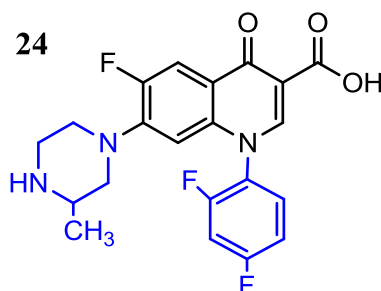


Figura 14. Representação da estrutura química da Temafloxacina (**24**). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

A temafloxacina (**24**, figura 14) possui um grupo metilo no anel piperazínico, tido como responsável pelo aumento da lipossolubilidade do composto, e ainda um grupo 2,4-difluorofenil, na posição 1, que permite modelar a solubilidade e aumentar a atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias.<sup>40</sup> A temafloxacina demonstrou, *in vitro*, grande atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em comparação com a ciprofloxacina e a ofloxacina, a temafloxacina é mais ativa contra organismos gram-positivos, anaeróbios e intracelulares, mas possui atividade similar contra organismos gram-negativos.<sup>41</sup> A temafloxacina foi comercializada por um curto período de tempo (6 meses) sob a marca Omniflox<sup>®</sup>. Devido aos graves efeitos adversos provocados, conhecidos por “síndrome da temafloxacina”, foi retirada do mercado. Estes efeitos incluem sintomas como anemia hemolítica microangiopática, coagulação intravascular disseminada (CID), trombocitopenia, insuficiência renal, hepatotoxicidade e alterações do sistema nervoso central (SNC) como acidente vascular cerebral (AVC), entre outros sintomas como reações

alérgicas severas, diminuição dos níveis de glucose plasmática, distúrbios gastrointestinais e exantema.<sup>40,42</sup>

De um modo geral, as quinolonas de terceira geração mantiveram a atividade contra organismos gram-negativos, sendo superadas apenas pela ciprofloxacina, que ainda consegue ser mais eficaz contra este tipo de organismos. Nesta geração, houve um grande avanço no campo dos organismos gram-positivos, havendo um aumento na atividade contra bactérias gram-positivas, especialmente contra *Staphilococcus pneumoniae* resistentes e sensíveis a penicilina e também aumento na atividade contra atípicos como *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*.<sup>16</sup>

#### 2.4. QUINOLONAS DE QUARTA GERAÇÃO

O critério mais consensual utilizado para classificar as fluoroquinolonas em **quarta geração** é a atividade contra organismos anaeróbios. Esta geração de fluoroquinolonas possui grande atividade contra organismos Gram-positivos apesar de se manter inalterada a atividade contra organismos gram-negativos das fluoroquinolonas de segunda geração.<sup>12,43,44</sup>

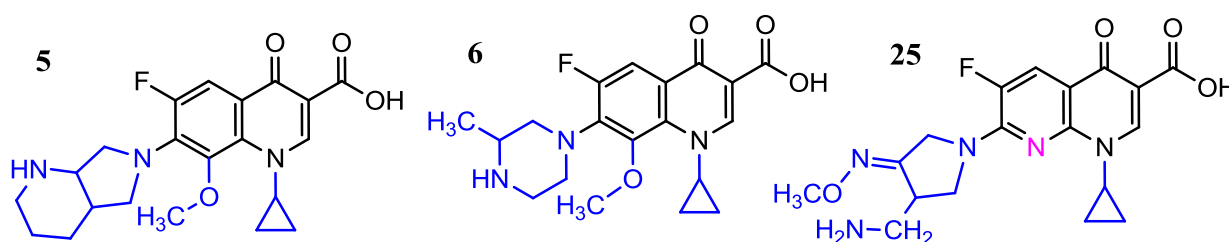


Figura 15. Representação das estruturas químicas dos compostos: Moxifloxacina (5), Gatifloxacina (6) e Gemifloxacina (25). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

Entre dezembro de 1999 e abril de 2003 foram aprovadas pela US Food and Drug Administration (FDA) três fluoroquinolonas clinicamente equivalentes. Estes fármacos possuem propriedades farmacodinâmicas e alguns aspetos estruturais muito semelhantes. A moxifloxacina e gatifloxacina (5 e 6; figura 16) possuem um núcleo aromático bicíclico com um carbono na posição 8 enquanto a gemifloxacina (25, figura 16) é uma naftiridona, com um átomo de azoto na posição 8. Os três compostos possuem um anel ciclopropilo na posição N-1. A estrutura destas fluoroquinolonas conduz a menor fotossensibilidade, por não conterem átomos de halogéneo ligados na posição 8. Permite também uma maior atividade contra organismos anaeróbios e gram-positivos, destacando a particularidade de serem ativos contra organismos suscetíveis à penicilina e contra estipes de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina. No entanto, não têm atividade suficiente contra estirpes suscetíveis e resistentes à meticilina por não atingirem concentrações sanguíneas

adequadas. Possuem também potencial para retardar o desenvolvimento de resistência, uma vez que os seus mecanismos de ação consistem na interação com ambas as topoisomerasas, II e IV, levando conseqüentemente a um atraso na seleção de resistências por parte das bactérias.<sup>45,46</sup>

A moxifloxacina, a gatifloxacina, e a gemifloxacina possuem diferenças entre si relativamente às aplicações clínicas e suscetibilidade à resistência, no entanto não há uma que se destaque mais que outra no que concerne a vantagens clínicas. São mais potentes que a levofloxacina no entanto são menos eficazes que a ciprofloxacina no tratamento de patologias provocadas por organismos gram-negativos, como *P. aeruginosa*. Por outro lado, conduzem a melhores resultados que a ciprofloxacina quando utilizadas contra *S. aureus*.<sup>45</sup> Em relação aos organismos anaeróbios, tais como espécies dos géneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Clostridium*, as fluoroquinolonas de quarta geração gatifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina (**28**, **figura 16**) e trovafloxacina (**26**, **Figura 16**) são as mais eficazes, seguidas pelas fluoroquinolonas de terceira geração esparfloxacina e grepafloxacina (**27**, **figura 16**) e, por último, pelas fluoroquinolonas de segunda geração ciprofloxacina e ofloxacina e a levofloxacina.<sup>15</sup>

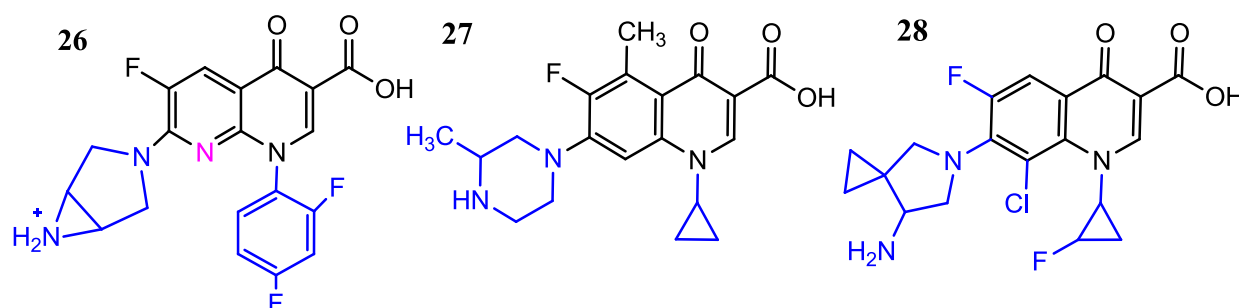


Figura 16. Representação da estrutura química dos compostos: Trovafloxacina (**26**), Grepafloxacina (**27**) e da sitafloxacina (**28**). Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

A trovafloxacina (**26**, **figura 16**) é uma trifluoronaftiridona com um grupo 3-azabicyclo[3.1.0]hexano na posição 7, e um grupo 2,4-difluorofenil na posição N1 que conferem, em conjunto, uma maior atividade contra organismos gram-positivos e organismos anaeróbios que o grupo ciclopropilo da ciprofloxacina, mantendo a mesma capacidade contra organismos gram-negativos. A trovafloxacina é 10 vezes mais potente que a ciprofloxacina e duas vezes mais potente que a esparfloxacina contra estreptococos e as suas propriedades farmacocinéticas permitem a administração em dose única diária.<sup>47</sup> No entanto, após a sua entrada no mercado em dezembro de 1997, foram detetados 152 casos de hepatotoxicidade e 9 casos de pacientes que necessitaram de transplante hepático ou faleceram, tendo o fármaco sido retirado do mercado

agosto de 1999 pela agência europeia do medicamento. Nos Estados Unidos da América, o seu uso é limitado.<sup>42,48,49</sup>

As fluoroquinolonas constituem armas poderosas no arsenal terapêutico oftalmológico. No entanto, o desenvolvimento de estipes resistentes torna-se um obstáculo que requer o desenvolvimento de antibióticos cada vez mais potentes. As primeiras fluoroquinolonas a serem utilizadas topicamente contra infeções oculares, tais como conjuntivite, úlcera da córnea e endoftalmite, foram a ciprofloxacina, a ofloxacina e a norfloxacina, sendo a norfloxacina a menos utilizada devido a sua menor atividade antimicrobiana. Rapidamente houve a necessidade de encontrar novos antibióticos, tendo sido introduzidas a moxifloxacina e a gatifloxacina na terapêutica ocular. Estas quinolonas adicionaram benefícios relativamente às anteriores, tais como a capacidade de serem eficazes contra uma grande variedade de organismos gram-positivos, incluindo organismos resistentes do género estafilococos, uma boa penetração ao nível da córnea e maior atividade contra organismos atípicos, como os do género micobactéria. Recentemente a besifloxacina (**29**, **figura 17**) foi introduzida no mercado de alguns países, numa formulação otimizada baseada num polímero mucoadesivo denominado de policarbofilo, com o objetivo de aumentar o tempo de contacto do fármaco com a superfície ocular, aumentando a sua eficácia. Possui atividade contra diversos organismos, como *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Neisseria* spp e estafilococos resistentes à meticilina e penicilina.<sup>8,50-53</sup>

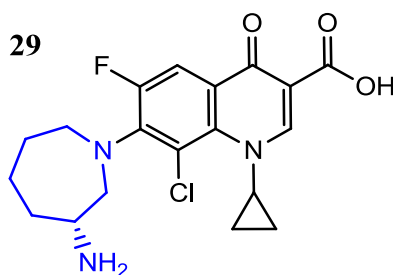


Figura 17. Representação da estrutura química da besifloxacina. Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

As quinolonas de terceira e quarta geração são utilizadas no tratamento de pneumonias adquiridas na comunidade, sinusite aguda e exacerbações agudas da bronquite crónica, devido ao seu amplo espetro de ação que, de uma maneira geral, abrange organismos gram-positivos, como *S. pneumonia* sensíveis e resistentes à penicilina e patógenos atípicos como *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*. No entanto são menos ativas que a ciprofloxacina contra *Pseudomonas*.<sup>16</sup> A esparfloxacina, a grepafloxacina e a moxifloxacina também possuem risco

potencial de cardiotoxicidade, com o prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma, devendo ser utilizadas com precaução. Já a levofloxacina e a ciprofloxacina mostraram ser as fluoroquinolonas que menos influenciam os canais de potássio relacionados com o gene HERG.<sup>37,54</sup>

Em mais de 50 anos de evolução, a classe das quinolonas desenvolveu-se de forma notável. O leque de organismos suscetíveis aumentou claramente, abrangendo agora organismos gram-positivos, gram-negativos, aeróbios e anaeróbios. Os parâmetros farmacocinéticos foram aperfeiçoados, permitindo o uso a nível sistémico, maior volume de distribuição, maior penetração nos tecidos, maior biodisponibilidade e maior tempo de semivida, permitindo a sua administração numa toma única diária. No entanto, e apesar desta evolução marcante, as quinolonas continuam a ser alvo de estudo devido à constante busca de novos fármacos ativos contra estirpes resistentes, com menos efeitos secundários e maior segurança.<sup>11,15</sup>

### 3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os parâmetros físico-químicos são muitas vezes utilizados para prever os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) de um fármaco durante o seu desenvolvimento.<sup>55</sup> É possível perceber a sua importância se pensarmos que o corpo é composto por uma série de membranas e compartimentos aquosos contendo proteínas e ácidos nucleicos e que as moléculas têm de ultrapassar essas membranas para chegar ao seu sítio-alvo e provocar efeito biológico. Os processos de ADMET estão inteiramente relacionados com a interação entre o fármaco e estes componentes celulares.<sup>56</sup>

As membranas são compostas por uma bicamada fosfolipídica em que as cabeças polares dos fosfolípidos estão direcionadas para a parte aquosa e as partes apolares dos fosfolípidos originam uma camada bastante hidrofóbica. Para que uma molécula atravesse a camada tem que conter grupos hidrofóbicos e ser capaz de perder a sua esfera de hidratação. Essa dificuldade influencia diretamente a absorção do fármaco. A distribuição do fármaco, por sua vez, é afetada pela afinidade do fármaco com as membranas e também pela afinidade do fármaco com as proteínas presentes nos compartimentos aquosos, como a albumina humana (HSA), que contém sítios de ligação hidrofóbica extensos.<sup>56</sup>

O comportamento das quinolonas *in vivo* é extremamente influenciado pelas suas propriedades físico-químicas, principalmente o seu grau de ionização. A importância de estudos dos parâmetros físico-químicos das quinolonas pode ser notada, por exemplo, na elucidação do seu mecanismo de

ação. Pensa-se que a atividade antibacteriana destes compostos passa pela inibição da enzima DNA Girase, que por sua vez está envolvida num processo dependente do pH e da concentração de ácido no meio. Assim, o estudo do equilíbrio de protonação é um fator importante na compreensão do mecanismo de ação das quinolonas.<sup>57</sup>

As propriedades físico-químicas são também importantes na penetração das fluoroquinolonas nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Fármacos hidrofóbicos, com grande massa molecular ou carregados negativamente a pH fisiológico, têm grandes dificuldades em atravessar a bicamada lipídica das membranas dos organismos Gram-negativos, uma vez que a penetração é realizada por canais de porina. No entanto, existe a possibilidade de entrada dos fármacos hidrofóbicos através dos lipopolisacáridos da membrana celular da bactéria. Segundo a literatura, as quinolonas penetram a barreira membranar da *E. coli* através dos canais porina OmpF e OmpC.<sup>58</sup> Já nos organismos Gram-positivos, a entrada das fluoroquinolonas é realizada de forma diferente, uma vez que esses organismos não possuem membrana celular e, conseqüentemente, não possuem nem canais porina nem lipopolissacáridos. No *S. aureus* (Gram-positivo), as quinolonas acumulam-se no interior da célula bacteriana por difusão simples através da membrana citoplásmica. No entanto, esse mecanismo de entrada possui um maior risco de falhas, pois alguns organismos, como por exemplo os do género estafilococos, possuem um sistema ativo de redução da acumulação do antibiótico no interior da célula bacteriana, por eliminação através de bombas de efluxo.<sup>59</sup> Esse mecanismo de proteção pode ter contribuído para complicar o desenvolvimento de fluoroquinolonas ativas contra organismos Gram-positivos, sendo que apenas as pertencentes à quarta e quinta geração são eficazes contra esses organismos.

É de notar que é extremamente difícil combinar potência, seletividade, estabilidade metabólica, permeabilidade membranar e solubilidade numa mesma molécula. Se uma molécula é modificada para aumentar a lipofilicidade, a sua permeabilidade membranar aumenta mas a sua solubilidade irá diminuir e dificultar a absorção, uma vez que apenas as moléculas livres conseguem atravessar as membranas. A solubilidade, potência e permeabilidade são três características independentes que, apesar de estarem todos relacionados com a lipofilicidade, podem ser otimizados em conjunto.<sup>56</sup>

Os quatro principais parâmetros medidos, que se interrelacionam, são a lipofilicidade, a constante de dissociação ou ionização (pK), a permeabilidade membranar e a solubilidade aquosa.<sup>56</sup>

### 3.1. LIPOFILICIDADE

Segundo a IUPAC, a lipofilicidade é a “representação da afinidade de uma molécula ou de um fragmento por um ambiente lipofílico. É comumente medida pela sua distribuição num sistema bifásico, seja líquido-líquido (e.g. coeficiente de partição em octanol/água) ou sólido-líquido (retenção por métodos cromatográficos diversos)”. Pode ser quantificada através do coeficiente de partição (log P) que corresponde ao logaritmo da razão entre a concentração de equilíbrio de espécies monoméricas de um composto na fase orgânica e a concentração da mesma espécie na forma neutra, presente na fase aquosa (**equação 1**).<sup>60</sup> Assim, quanto maior for a lipossolubilidade, maior será a afinidade do fármaco pela fase orgânica e maior será a capacidade do fármaco em atravessar as membranas plasmáticas, constituídas pelas camadas fosfolipídicas.

$$\text{Log } P = \log_{10} \frac{[\text{composto}]_{org}}{[\text{composto}]_{\acute{a}gua}}$$

*Equação 1: Equação do coeficiente de partição (log P)*

A lipofilicidade pode ser manipulada através de modificações na estrutura do composto líder e é considerada um parâmetro crucial na otimização da potência e dos parâmetros ADMET de uma determinada molécula.<sup>56</sup> Está relacionada com uma maior potência antimicrobiana, avaliada em estudos *in vitro* ou *in vivo*. A adição de grupos alquila na posição C-5 do sistema quinolónico, como no caso da grepafloxacina, e/ou no grupo piperazínico da posição C-7 como no caso das quinolonas esparfloxacina, gatifloxacina, temafloxacina, levofloxacina, rufloxacina, entre outras, aumenta a lipofilicidade. Na esparfloxacina, a lipofilicidade é aumentada pela ligação de dois grupos metilo ao anel piperazínico. Este composto apresenta ainda um grupo 5-amino<sup>61</sup> que pode facilmente protonar e o aumento na atividade deste composto contra estirpes Gram-positivas foi atribuído à presença do grupo ciclopropilo na posição N-1<sup>12</sup>.

As fluoroquinolonas de terceira e quarta geração são mais lipofílicas e, apesar de esta característica estar associada à uma maior potência contra estirpes Gram-positivas, está também relacionada com uma diminuição da potência contra organismos Gram-negativos. Esta situação pode ser notada no caso da gatifloxacina, moxifloxacina e da gemifloxacina, que são mais ativas contra *S. aureus* mas sofrem uma redução na atividade contra organismos da família Enterobacteriaceae.<sup>12</sup>

### 3.2. CONSTANTE DE IONIZAÇÃO ( $P_{K_a}$ )

As quinolonas possuem três grupos ionizáveis: o grupo carboxilo na posição 3, presente no ácido nalidíxico, na flumequina e no ácido oxolínico e os azotos N-1 e N-4 do grupo piperazínico em posição C-7, como ocorre na ofloxacina, na norfloxacin ou na enoxacina. O azoto N-1 apenas protona a pH muito baixo. As fluoroquinolonas, assim como outros compostos anfotéricos, podem originar quatro espécies químicas, de acordo com o pH da solução aquosa: a espécie monoprotonada ( $H_2Q^+$ ), a espécie não ionizada ( $HQ^0$ ), a espécie zwitteriônica ( $HQ^\pm$ ) e a espécie aniônica ( $Q^-$ ). A forma monoprotonada ocorre em maior quantidade em meios ácidos, como no estomago, podendo ocorrer também a forma diprotonada, para valores de pH muito baixos. Em meios neutros, como é o caso do pH sanguíneo, a forma zwitteriônica predomina relativamente à forma não ionizada.<sup>62</sup> Este fato é contestado por alguns autores que afirmam que as formas não iônica e zwitteriônica aparecem em concentrações similares, em equilíbrio, em meios com pH neutro ou fracamente ácido.<sup>63</sup> A forma não iônica desempenha um papel importante no mecanismo de transporte e absorção, enquanto que a estrutura zwitteriônica é fundamental na ligação à DNA girase, pelo que a atividade antimicrobiana das fluoroquinolonas é dependente do pH.<sup>62,64</sup> As fluoroquinolonas com um grupo piperazina, como a ofloxacina e a norfloxacin (**13**, Figura 17), mostraram uma maior atividade quando o pH sobe de 5,6 para 8,3, já as quinolonas sem o grupo piperazínico, como o ácido nalidíxico e o ácido oxolínico, mostram aumento de atividade quando há diminuição do pH.<sup>65</sup>

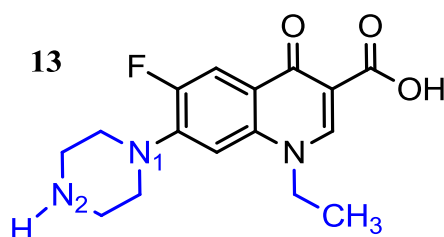


Figura 18. Representação da estrutura química da norfloxacin evidenciando os azotos do grupo piperazínico. (ChemDraw Ultra 12)

As constantes foram calculadas por métodos espectrofotométricos e por titulação potenciométrica. A primeira constante de ionização,  $pK_{a1}$ , corresponde a dissociação do próton do grupo carboxilo e a segunda constante de ionização,  $pK_{a2}$ , corresponde a perda do próton do grupo piperazínico.<sup>65</sup> O conhecimento das constantes de dissociação das quinolonas é importante para definir o estado de ionização dos compostos a qualquer pH, que por sua vez é importante para pressupor a capacidade de um composto para ser absorvido no trato gastrointestinal ou

atravessar as membranas biológicas a um valor de pH determinado, dado que nem todos os estados iónicos dos compostos são passíveis de serem absorvidos ou atravessar membranas.<sup>66</sup>

A dissociação ácido-base afeta a atividade biológica, a absorção e a solubilidade dos compostos e é definida pela constante de ionização, no caso de espécies neutras, ou por constante de dissociação, no caso de espécies iónicas. Este parâmetro termodinâmico relaciona o pH do meio com a carga elétrica da molécula.<sup>55,64</sup>

### 3.3. PERMEABILIDADE MEMBRANAR

Para que os fármacos possam atingir o sítio-alvo, é necessário que haja uma adequada absorção. A nível gastrointestinal (GI), a absorção é dependente da capacidade de dissolução do fármaco no conteúdo gástrico e da sua capacidade para atravessar o epitélio gastrointestinal para chegar à corrente sanguínea. Segundo a hipótese da partição em função do pH, essa capacidade é dependente do pH do meio, sendo que apenas moléculas não carregadas conseguem passar eficientemente essa barreira.

A taxa de penetração das fluoroquinolonas depende de vários parâmetros físico-químicos, como a lipossolubilidade e a hidrofobicidade, e da presença de magnésio.<sup>67</sup> Fármacos com baixa lipofilicidade e baixo coeficiente de partição possuem absorção incompleta, uma vez que a difusão membranar é por via paracelular que por sua vez é limitada pela baixa área de superfície de absorção e pelo tamanho molecular. Fármacos lipofílicos e solúveis no conteúdo gástrico atravessam facilmente a membrana e são completamente absorvidos devido à grande área de superfície do epitélio gastrointestinal. Por outro lado, fármacos muito lipofílicos possuem baixa solubilidade e não são capazes de se dissolverem totalmente para passar a barreira gastrointestinal.<sup>56</sup>

Os mecanismos de entrada das quinolonas na célula bacteriana constituem um tema de intenso debate. Alguns autores defendem que a entrada pode ocorrer por três vias: via dos canais porínicos, em que as moléculas hidrofílicas passam pela membrana com a ajuda de proteínas transmembranares designadas de porinas, via hidrofóbica, em que os compostos hidrofóbicos passam a membrana através dos lipo-polissacáridos ou por difusão através da bicamada fosfolipídica, e via “auto-promovida” em que os compostos removem catiões divalentes da

superfície da membrana, desestabilizando-a e expondo áreas por onde as quinolonas e outros antibióticos entram.<sup>59,68</sup>

### 3.4. SOLUBILIDADE

A solubilidade é um parâmetro de grande importância que depende da estrutura química e das condições em que é medida. Após a administração do fármaco, é necessário que este seja capaz de se dissolver no meio aquoso fisiológico, na sua forma livre. Só assim poderá atingir o sítio-alvo e realizar o seu efeito. A baixa solubilidade está normalmente relacionada com uma baixa biodisponibilidade. Porém, todas as quinolonas são relativamente solúveis entre pH 4 e 9.<sup>56,69,70</sup>

Para além da lipofilicidade, a estabilização da forma sólida para administração oral é outro fator que afeta significativamente a solubilidade de um fármaco. Esta estabilidade depende da estrutura das moléculas e da forma com que elas se agregam na estrutura cristalina.

O desenvolvimento de formulações para administração parentérica de quinolonas deve ter em conta que à pH fisiológico a espécie que domina é a zwitteriônica, onde a solubilidade é minimizada. Essa característica limita o desenvolvimento de formulações intravenosas, uma vez que o sangue é uma suspensão aquosa. Quinolonas como a ciprofloxacina, ofloxacina e a levofloxacina possuem solubilidade adequada a pH 7 para serem administrados por essa via sem ser necessárias modificações. Pelo contrário, a trovafloxacina, que apresenta excelente biodisponibilidade oral, necessita de modificações para poder ser administrada por via intravenosa. A adição do aminoácido L-alanil-L-alanil origina um pró-fármaco da trovafloxacina, a alatrovafloxacina (**30**, **figura 19**), 100 vezes mais solúvel. O pró-fármaco origina a trovafloxacina por clivagem metabólica da ligação amida, após a administração parenteral.<sup>71</sup>

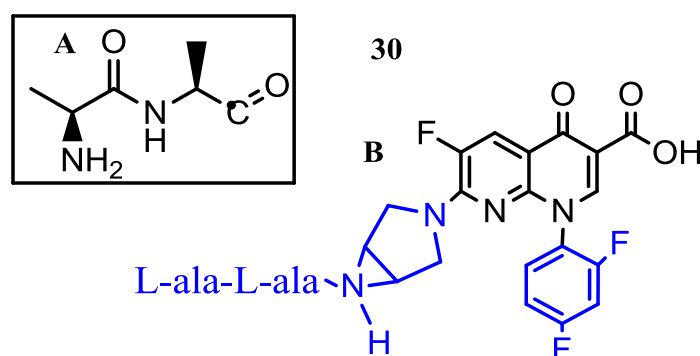


Figura 19. Representação da estrutura química da alatrovafloxacina (**29**): A - Estrutura da L-alanil-L-alanil. B: Estrutura química da alatrovafloxacina. Os substituintes característicos estão representados em azul. (ChemDraw Ultra 12)

O desenvolvimento de fármacos pouco solúveis não é vantajoso para a indústria farmacêutica, pois para que estes sejam comercializados, a indústria tem de investir numa formulação que permita a sua correta administração, aumentando os custos do medicamento e a dificuldade de desenvolvimento.<sup>72</sup> Para aumentar a solubilidade de quinolonas pouco solúveis em água pode-se recorrer à complexação da quinolona pouco solúvel com um hidrogel orgânico que aumente a dissolução e a taxa de absorção, ou encapsular o fármaco em lipossomas. No entanto, para doses elevadas estas alternativas revelam-se frequentemente incapazes de estabilizar os fármacos.<sup>69</sup>

### 3.5. COMPLEXAÇÃO COM IÕES METÁLICOS

A interação entre as quinolonas e alguns componentes celulares é mediada pela complexação entre estes antibióticos e catiões divalentes. Os complexos quinolónicos mais comuns são os formados por interações ião-dipolo que se estabelecem entre o carbonilo em posição 4, um dos oxigénios do grupo carboxilo e um catião metálico divalente, na proporção de 1:1, sendo também possível a formação de quelatos que envolvem ligação com o azoto terminal do grupo 7-piperazinico (desprotonado), como é o caso do complexo  $[Zn(nf)_4]$  (figura 20). Alguns complexos podem também ser diméricos, como no caso dos que se estabelecem com catiões divalentes de cálcio, magnésio e cádmio.<sup>70</sup>

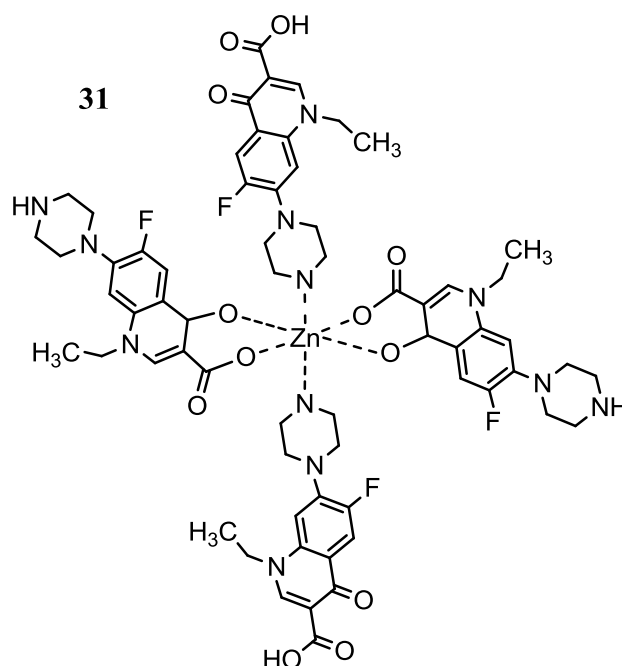


Figura 20. Representação da estrutura do complexo  $[Zn(norfloxacina)_4]$  (**31**) Adaptado de referência 73. (ChemDraw Ultra 12)

Segundo vários estudos, a formação de complexos é importantes na atividade biológica das quinolonas, considerando-se que a ligação das quinolonas ao DNA é modulada pelo catião divalente  $Mg^{2+}$ , que serve como uma ponte entre a quinolona e o grupo fosfato do DNA. As interações entre os anéis condensados das quinolonas e a cadeia simples formada pela DNA girase estabilizam o complexo, desestruturam o DNA bacteriano e conduzem à morte celular. Apesar de haver controvérsias acerca do mecanismo de ação das quinolonas, alguns estudos apontam ainda que para que o ácido nalidíxico se ligue à cadeia simples de DNA é necessária a presença de excesso de iões cobre em vez de iões magnésio.<sup>64,70</sup>

Em muitos casos a formação de complexos quinolona - catião divalente metálico origina compostos ainda mais ativos que os ligandos do tipo quinolónico que lhes deram origem, o que suscita atenção por parte dos investigadores. Diversos complexos deste tipo têm sido sintetizados para investigar as propriedades físico-químicas e biológicas, de modo a explorar possíveis aplicações para além da antimicrobiana, tais como no tratamento do Alzheimer ou mesmo como anti proliferativo, em tumores.<sup>74</sup>

Por outro lado, a complexação traz complicações para a absorção das quinolonas. Dado que a absorção depende, para além de outros fatores, da carga da espécie, e as quinolonas possuem a sua taxa máxima de absorção quando se encontram na forma zwitteriônica, se houver complexação com iões divalentes, ou ionização, a sua carga molecular é alterada e a absorção é comprometida.<sup>70</sup>

Foram reportadas algumas interações medicamentosas devidas à formação de complexos.<sup>74-76</sup> A administração de fluoroquinolonas juntamente com antiácidos compostos por hidróxido de alumínio ou magnésio provocam uma diminuição da concentração do antibiótico no plasma ou soro e na urina. Isto ocorre devido à formação de complexos entre a fluoroquinolona e os catiões metálicos, provocando a diminuição da biodisponibilidade da fluoroquinolona.<sup>76</sup> No entanto, o grau de interação varia de acordo com a estrutura da fluoroquinolona em questão. Quinolonas com grupos 3-carboxilo ou 4-carbonilo na sua estrutura vêm a sua absorção diminuída ao formarem quelatos com iões metálicos, como é o caso do ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina entre outros. O mesmo não ocorre com compostos com muitos substituintes na sua estrutura base e com um grupo piperazínico, que mostraram menos interações. Os derivados naftiridona, compostos com um grupo ciclopropilo na posição 1, com um substituinte na posição 5, com grupo metilo no anel piperazínico ou com um fluor na posição 8 também revelaram

estabelecer poucas interações conducentes a formação de quelatos, de acordo com os resultados de um estudo realizado em ratos onde foram testados vários derivados quinolónicos com diferentes combinações de substituintes.<sup>76,77</sup> A interação é mais relevante quando envolve catiões divalentes. Já os iões monovalentes, como os iões sódio e potássio, não alteram significativamente a absorção das quinolonas.<sup>70</sup>

O sucralfato, antiácido composto por hidróxido de alumínio e sacarose sulfatada, devido à sua natureza, também conduz a interação quando administrado com fluoroquinolonas. Uma vez no estômago, os iões de alumínio saem da estrutura da molécula do sucralfato e a sacarose sulfatada, carregada negativamente, vai interagir com a mucosa danificada formando uma barreira protetora.<sup>78</sup> As alternativas para os doentes sujeitos a terapias com fluoroquinolonas que requerem o uso de antiácidos passam pela administração de cimetidina e ranitidina.<sup>77</sup> Os medicamentos ou suplementos alimentares contendo ferro, zinco e outros catiões multivalentes devem ser evitados em doentes sujeitos ao tratamento com fluoroquinolonas por poderem também formar complexos.<sup>70</sup> Na figura abaixo pode-se observar a interação da ciprofloxacina com ião ferro utilizando o nitriloacetato (nta) para simplificar a estrutura do complexo.

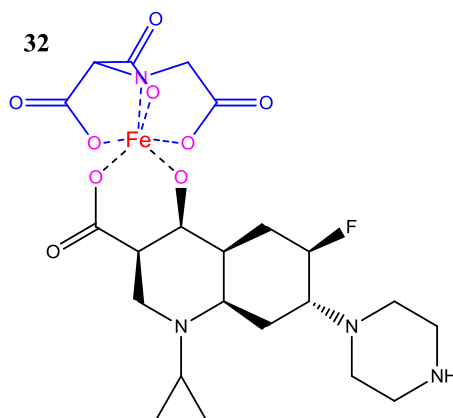


Figura 21. Representação da estrutura do complexo formado por ferro, nitriloacetato (nta) e ciprofloxacina [Fe(cip)(nta)] (32).

Adaptado de referência 79. (ChemDraw Ultra 12)

#### 4. MECANISMO DE AÇÃO DAS QUINOLONAS

Como já foi referido anteriormente, as quinolonas atuam em duas enzimas bacterianas alvo: a DNA girase e a Topoisomerase IV.<sup>80-82</sup> Ambas as enzimas são topoisomerases do tipo II, com estrutura tetramétrica, compostas por 2 pares de subunidades. Na célula procariótica ambas as enzimas têm a função de clivar a cadeia dupla do DNA, e voltar a ligá-la, de forma a eliminar o

superenrolamento ocasionado pela atividade da enzima helicase durante a replicação do DNA, mas através de mecanismos diferentes.<sup>83</sup>

Apesar das semelhanças, essas enzimas possuem diversas diferenças. A DNA girase é composta por duas subunidades A e duas subunidade B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente, e a sua principal função é a de eliminar o superenrolamento do DNA durante a replicação através da introdução de superenrolamentos negativos na cadeia de DNA dependente de ATP. Na ausência de ATP a DNA girase remove os superenrolamentos negativos do DNA, sendo o balanço ATP/ADP essencial na manutenção de níveis adequados de superenrolamento que provavelmente são necessários na síntese de DNA girase e no crescimento celular.<sup>84</sup> Apesar da topoisomerase IV ser capaz de eliminar e adicionar superenrolamentos negativos na cadeia de DNA, contrariando o superenrolamento positivo, a DNA girase é mais eficaz nessa função. Uma possível causa para esse fato é a forma como ambas as enzimas interagem com o DNA. A DNA girase envolve o DNA em torno de si. Já a topoisomerase IV, constituída por dois pares de subunidades codificadas pelos genes *parC* e *parE*, tem como principal função a separação das cadeias filhas do DNA após a replicação, permitindo a segregação dos cromossomas.<sup>81</sup>

A atividade bacteriana das quinolonas deve-se à sua capacidade de ligação ao complexo enzima-DNA, com conseqüente indução de alterações conformacionais que se irão refletir na ação das topoisomerases.<sup>85,86</sup> As quinolonas destroem a célula bacteriana através de dois processos. Por um lado, a falha na ação destas enzimas irá originar erros críticos em vários processos nucleares, tais como na replicação do DNA bacteriano, comprometendo a sobrevivência celular. Por outro lado, uma vez que o complexo enzima-DNA possui a capacidade de efetuar cortes na cadeia de DNA, o complexo enzima-DNA alterado irá fragmentar todo o genoma bacteriano. Pode-se dizer que as quinolonas transformam a DNA girase e a topoisomerase IV em toxinas celulares.<sup>83</sup>

## 5. PROBLEMAS ASSOCIADOS A UTILIZAÇÃO DE QUINOLONAS

Foram patenteadas nos últimos anos milhares de entidades químicas da classe das quinolonas, mas apenas algumas foram aprovadas para uso humano. Em alguns casos, isto ocorreu devido ao inapropriado espectro de ação, noutros devido ao débil perfil farmacocinético. Porém, na maioria dos casos a não aprovação ou não comercialização deve-se aos efeitos secundários provocados pelos compostos. De um modo geral, 5 a 8% de pacientes desenvolvem efeitos adversos às

quinolonas, sendo a maioria destes efeitos classificada de leve a moderado e auto limitante no tempo.<sup>87</sup>

O estudo e síntese de novos compostos quinolónicos leva, numa primeira fase, ao melhoramento dos parâmetros farmacocinéticos, da potência e do espectro de ação desses compostos. Numa segunda fase, são efetuadas manipulações sintéticas adicionais que visam reduzir ou eliminar os efeitos adversos, ao mesmo tempo que tentam aumentar a potência, ou pelo menos a mantê-la. Como veremos em seguida, certas alterações na estrutura nuclear das quinolonas ou dos seus substituintes modulam a frequência e a gravidade dos efeitos secundários desse grupo de compostos.<sup>88</sup>

A seleção de estirpes resistentes constitui outro problema associado às quinolonas, que é comum a todos os antibióticos e que representa um grave problema de saúde pública.<sup>89</sup> Os mecanismos mais comuns de desenvolvimento de resistência por parte das bactérias envolvem alterações na estrutura das enzimas alvo e nos mecanismos de entrada e saída do fármaco das bactérias, que serão elucidados posteriormente.<sup>90</sup>

### 5.1. EFEITOS SECUNDÁRIOS MAIS COMUNS

Em primeiro lugar é importante salientar a diferença entre toxicidade e efeitos secundários inerentes à utilização das quinolonas. A toxicidade está associada ao mau uso do fármaco, enquanto que os efeitos secundários ocorrem de forma indesejada e involuntária, mesmo com um uso correto dos medicamentos.<sup>91</sup> A maioria dos efeitos adversos, para cada uma das quinolonas correspondentes, já foram relatados anteriormente, restando salientar os efeitos mais comuns. Os efeitos secundários mais frequentes associados ao uso das quinolonas envolvem problemas gastrointestinais que resultam em náusea e diarreia. Estes sintomas estão também associados a outras classes de antibióticos, por destruírem a flora bacteriana intestinal. Surgem também problemas associados ao sistema nervoso central, como dor de cabeça e tonturas. As quinolonas mais recentes têm originado outros efeitos colaterais, como fototoxicidade<sup>36</sup>, prolongamento do intervalo QT<sup>37,54</sup>, exatema<sup>92</sup>, artropatia<sup>87</sup>, tendinopatia<sup>93</sup>, hepatotoxicidade, síndrome urémica hemolítica<sup>94</sup> e, quando utilizadas na oftalmologia, deslocamento da retina<sup>95,96</sup>.

## 5.2. SELEÇÃO DE ESTIRPES RESISTENTES AOS FÁRMACOS

A seleção de estirpes de bactérias resistentes a antibióticos é um problema geral, mas a seleção para resistência é muito mais rápida se ocorre o uso indevido dos antibióticos. O desenvolvimento de resistências é um grave problema de saúde pública que persiste no século XXI. Na Europa, após uma conferência com o título “The Microbial Threat”, em 1998, foram desenvolvidas diversas ações, tais como o projeto de Vigilância Europeia do Consumo de Antibióticos (ESAC)\* e o projeto de vigilância de resistência antimicrobiana (EARS)\*\* desenvolvidos pelo centro europeu de prevenção e controlo de doenças (ECDC) e o Programa de Prevenção e Controlo de Infecção e Resistência aos Antimicrobianos sob a responsabilidade da Direção Geral de Saúde (DGS) com a participação do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, I.P. (INFARMED)<sup>97</sup>: Estes projetos, que têm sido importante para combater o desenvolvimento rápido de resistências, baseiam-se essencialmente na disponibilização de informações sobre o consumo de antibióticos e sobre o uso racional dos antibióticos, pois existe uma forte correlação entre o consumo de antibióticos e os níveis de resistência a a esses antibióticos. As deliberações resultantes dessa conferência ficaram conhecidas como as “The Copenhagen recommendations”<sup>98,99</sup>

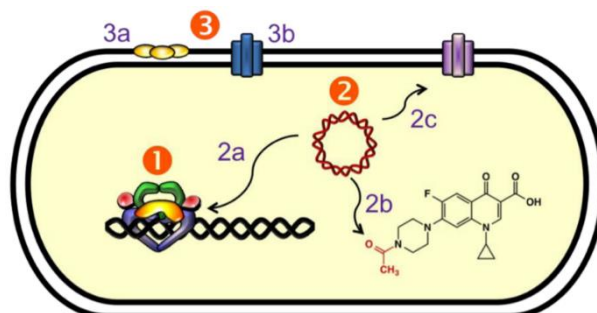
As infeções causadas por bactérias resistentes não respondem a tratamentos com antibióticos de primeira linha e requerem tratamentos longos e mais complexos. Em alguns casos, essas bactérias são resistentes a dois ou mais antibióticos, tornando o tratamento mais complicado e, em muitos casos, associados a elevada morbidade e mortalidade.<sup>89</sup> Para além disso, o custo dos tratamentos tornou-se um fator bastante relevante nos últimos anos, e o tratamento de infeções devidas a patógenos resistentes resulta em grande impacto na economia.<sup>100</sup>

Os microrganismos resistentes considerados mais problemáticos são os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies do género *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium difficile* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).<sup>99</sup> As quinolonas mostraram ser eficazes contra alguns destes organismos. No entanto, as quinolonas não são utilizadas como fármacos de primeira linha no tratamento de infeções do trato respiratório, em adultos, na Europa. As quinolonas são antibióticos de uso restrito, sendo apenas utilizadas em situações bem definidas, como por exemplo quando o doente não responde ou possui intolerância aos antibióticos de primeira linha.

\* Mais informações em <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/esac-net/Pages/index.aspx>

\*\* Mais informações em <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>

No entanto, segundo os últimos resultados do projeto ESAC, essa recomendação não está a ser respeitada, pois o padrão de prescrição desses antibióticos foi alterado e o consumo das quinolonas aumentou.<sup>101,102</sup>



*Figura 22. Representação esquemática dos mecanismos mais comuns de resistência contra as quinolonas. 1 – Mutações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV. 2 – Resistência mediada por plasmídeos. (2a) Proteínas Qnr; (2b) enzima variante aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC(6')-Ib-cr; (2c) bombas de efluxo codificadas por plasmídeos. 3 – Resistência mediada por mutações no cromossoma. (3a) Menor expressão de canais de porinas em organismos Gram-negativos; (3b) maior expressão de bombas de efluxo. Adaptado de referência 83.*

São vários os mecanismos utilizados pelas bactérias para se tornarem resistentes às quinolonas (Figura 21). De entre eles, o desenvolvimento de resistência às quinolonas mediada por mutações cromossômicas é o principal mecanismo onde há acumulação de mutações nos genes que codificam as enzimas alvo. A mutação mais frequente (>90%) é a alteração do aminoácido serina e de outros aminoácidos ácidos que interagem com a água e íons metálicos, responsáveis pela ponte entre a quinolona e as enzimas. Uma falha nessa interação origina uma menor ligação entre o composto quinolónico e o seu alvo. Mutações nos genes que codificam as subunidades das enzimas alvo correspondem a uma menor frequência,<sup>83</sup> no entanto diversos investigadores têm-se dedicado a mapear o genoma de estirpes resistentes às quinolonas com o intuito de descobrir as mutações que aí residem.<sup>103,104</sup> Mutações nos genes que codificam as bombas de influxo e efluxo correspondem a mais um artifício utilizado pelas bactérias para contornarem o efeito bactericida das quinolonas. Uma vez que as quinolonas entram na célula bacteriana de organismo Gram-positivos através das porinas, uma menor expressão destas proteínas resulta em menor influxo de fármaco, que resulta numa concentração intracelular inferior à mínima necessária para exercer efeito inibitório nas enzimas alvo e, bem assim, ação farmacológica.

A seleção de estirpes bacterianas resistentes devido a mutações no seu genoma não explica, por si só, a crescente taxa de resistência desenvolvida pelas bactérias. A descoberta do plasmídeo *qnr* em 1998, clarificou este fenómeno e provou que, para além das mutações cromossômicas, as bactérias desenvolveram resistências às quinolonas mediada por plasmídeos (RQMP)<sup>82</sup>. O plasmídeo *qnr* (*quinolone resistance*) é transferido de forma horizontal (célula – célula) e

transporta os genes que codificam as proteínas *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* e *qnrD*, proteínas essas que têm a função de proteger a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição das quinolonas. Este plasmídeo tem-se disseminado de forma geral, geograficamente e também para outros géneros de bactérias.<sup>44,103,105</sup> Para além dessas proteínas, há enzimas de acetilação, como a variante da aminoglicosídeo acetiltransferase, AAC(6')-Ib-cr, que inativam a norfloxacina e a ciprofloxacina através da acetilação<sup>44,82,83</sup> e também bombas de efluxo proteicas, como a QepA e a OqxAB, que transportam fluoroquinolonas para fora da célula bacteriana e que também são transportadas, através de plasmídeos, entre células bacterianas.<sup>82,106,107</sup>

## 6. UTILIZAÇÃO VETERINÁRIA DAS QUINOLONAS E O IMPACTO NA SAÚDE HUMANA

As fluoroquinolonas são consideradas uma importante classe de antibióticos na prática veterinária, juntamente com as tetraciclina, os macrólidos, as penicilinas, os aminoglicosídeos e combinações de antimetabolitos como por exemplo sulfonamidas e trimetoprim.<sup>108</sup> Estes fármacos são utilizados em animais de estimação, em animais de explorações agro-pecuárias e em animais de aquacultura. Na pecuária, os antibióticos são utilizados na terapia e na profilaxia de doenças infecciosas, como infeções respiratórias, infeções urinárias e prostatites. Duas outras finalidades do uso de antibióticos em animais de exploração pecuária são o aumento da taxa de crescimento e da eficiência alimentar.<sup>109,110</sup>

As fluoroquinolonas aprovadas para o uso em pequenos animais englobam a difloxacina, a orbifloxacina, a marbofloxacina e a enrofloxacina, sendo esta a mais utilizada. Em aves e gado, as fluoroquinolonas aprovadas são a danofloxacina, a sarafloxacina e também a enrofloxacina. Outras quinolonas também utilizadas em animais são a ciprofloxacina, a pradofloxacina e a ofloxacina.<sup>109,111</sup>

Na dermatologia veterinária, as fluoroquinolonas são muito utilizadas em infeções cutâneas, principalmente no pioderma canino. São também utilizadas na otite canina, na micobacteriose felina e, *off-label*, em infeções oculares.<sup>109</sup>

Como já foi referido, as fluoroquinolonas são administradas em animais de criação para aumentar a taxa de crescimento, através da diminuição da flora microbiota intestinal. A flora intestinal contém microrganismos que competem pelos nutrientes ingeridos e que produzem metabolitos que reduzem o crescimento do animal. Com a administração de antibióticos, há uma menor

competição e produção de metabolitos que afetam o crescimento, potenciando assim uma aceleração no crescimento dos animais.<sup>112</sup>

Na maior parte das vezes, a administração dos antibióticos aos animais de criação é realizada em grandes quantidades, através da comida e da água que os animais consomem, sendo grande parte destes compostos lançados para o ecossistema e contaminando as águas e os solos.<sup>113</sup> No entanto, o consumo humano das fluoroquinolonas também é problemático na contaminação dos ecossistemas, uma vez que após a administração, as fluoroquinolonas não sofrem metabolização completa no organismo e são eliminadas para os esgotos ainda com alguma capacidade antimicrobiana, já que o núcleo quinolónico por si só possui atividade, ainda que baixa.<sup>114</sup>

Nos centros de tratamento municipais de água, as fluoroquinolonas não são completamente removidas pelos processos disponíveis de tratamento de águas.<sup>115</sup> A acumulação de fluoroquinolonas nas águas, nos solos e em sedimentos provoca uma série de alterações nos ecossistemas, nomeadamente toxicidade para os organismos procarióticos aquáticos, como a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, a planta *Lemna minor* e a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, destruição de comunidades microbianas do solo, desequilíbrio do ciclo de nutrientes aquáticos, para além do desenvolvimento de resistência contra antibióticos pelas bactérias existentes nos solos e nos rios. Diversos estudos têm-se focado na determinação da concentração de fluoroquinolonas em várias fontes de água, como rios, águas provenientes de estações de tratamento de águas municipais e de aquacultura, e nos solos. Como base nestes estudos, a contaminação por quinolonas é considerada uma ameaça para os ecossistemas ambientais e para a saúde e segurança humana.<sup>114,116</sup>

A utilização de antibióticos no tratamento, profilaxia ou como fator de crescimento dos animais de criação para consumo humano, ou apenas o contato com pequenas doses de fluoroquinolonas nos solos ou nas águas, pode dar origem a uma bactéria resistente. Essa bactéria é transmitida para a população através do consumo da carne que pertenceu ao animal que recebeu antibiótico, do contato direto com material contaminado (fezes, saliva, etc.), através do consumo de água, e através de legumes e verduras criadas em solo contaminado com fluoroquinolonas, gerando graves problemas para a população.<sup>108,117</sup>

## 7. PERSPETIVAS FUTURAS DA UTILIZAÇÃO DE QUINOLONAS EM TERAPÊUTICA

Além da sua utilização como agentes antibacterianos, as quinolonas têm sido consideradas para outras aplicações farmacológicas. Fazendo uso de novas técnicas de varrimento, como *high-throughput screening*, de bibliotecas de compostos e da química combinatória, foram sintetizados inúmeros derivados quinolónicos e analisados para diversos fins. Apoiados principalmente na biologia molecular e na química analítica, equipas multidisciplinares de investigadores efetuaram análises em diversos compostos, utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, com o intuito de encontrar afinidades entre os compostos e novos alvos terapêuticos. Recentemente, uma nova onda de artigos foi publicados sobre as atividades “não-clássicas” dos derivados quinolónicos, como anticancerígena, anti-inflamatória, antituberculosa, antiviral e ainda sobre o seu potencial no tratamento de doenças neurocognitivas, como o alzheimer, devido à sua estrutura (“scaffold”) multivalente.<sup>11,118</sup>

Num artigo de revisão, Richter, S. refere que “As quinolonas podem ser consideradas como fármacos de três-gumes: Dependendo de leves detalhes na sua estrutura, podem mudar de antibacteriano para anticancerígeno ou para agentes antivirais.”<sup>119</sup>

### 7.1. QUINOLONAS COM ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA E ANTI-INFLAMATÓRIA

A inibição da topoisomerase II é um efeito indesejável da ação das quinolonas antimicrobianas que deve ser minimizado. Foram efetuadas análises às quinolonas já comercializadas e em fase pré-clínica foram realizadas, de forma a avaliar a sua capacidade inibidora da topoisomerase II, enzima análoga eucariótica da DNA girase bacteriana, e gerar citotoxicidade. Esses estudos mostraram que as quinolonas são semi-seletivas, atuando apenas na DNA girase se esta for pelo menos duas vezes mais sensíveis às quinolonas que as topoisomerases I e II eucarióticas. Caso contrário, as quinolonas atuarão nas topoisomerases humanas, desencadeando citotoxicidade, como é o caso da rosaxacina. Por outro lado, o modo de atuação dos fármacos antineoplásicos que atuam na topoisomerase II é semelhante ao demonstrado pelas quinolonas na inibição da DNA girase, produzindo um complexo de clivagem (DNA girase-quinolona) da cadeia dupla de DNA.<sup>120</sup> Por esses motivos, foram desenvolvidos estudos que confirmaram a possibilidade de desenvolvimento de fármacos antineoplásicos baseados no núcleo quinolona.

Estruturalmente, diversas modificações podem ser introduzidas de forma a modelar a atividade contra as topoisomerases eucariotas, nomeadamente: a coplanaridade entre o substituinte C3 e o

anel quinolínico é importante para a atividade na topoisomerase eucariótica; em derivados com um grupo carboxilo na posição C-3 a introdução de grupos na posição C-2 pode desestabilizar a orientação coplanar do grupo carboxilo diminuindo a inibição dessas topoisomerases; a introdução de um grupo fenilo ou anéis heteroaromáticos na posição C-2 potencia a atividade citotóxica, no entanto a distancia entre os anéis é essencial na manutenção da atividade; a adição de grupos hidroxilo ao grupo fenilo da posição C-2 também potencia a citotoxicidade.<sup>11,121,122</sup>

A **Vareloxina (33, figura 23)** é a primeira quinolona anticancerígena que atua por intercalação nas cadeias de DNA, inibe a topoisomerase II e induz clivagem seletiva da dupla cadeia, interfere no ciclo mitótico e bloqueia a fase G2 e a apoptose. Estudos pré-clínicos mostraram que a vareloxina possui atividade citotóxica dependente da dose e que atua em múltiplos modelos de tumores. Possui um perfil de segurança aceitável, quando testado em doentes com tumores sólidos recorrentes/refratários.<sup>123</sup> A vareloxina ou também chamada vosaroxina está a ser desenvolvida pela empresa de produtos farmacêuticos Sunesis, especializada no desenvolvimento e comercialização de novas terapêuticas oncológicas com potencial utilização no tratamento de tumores sólidos e hematopoiéticos. De momento, a vareloxina encontra-se na fase 3 dos ensaios clínicos com o nome de marca Qinprezo™. Foi testada em combinação com a citarabina, em doentes com leucemia mieloide aguda recorrente ou refratária. A combinação Vareloxina-citarabina angariou o estatuto de medicamento órfão, atribuído pela FDA.<sup>124</sup>

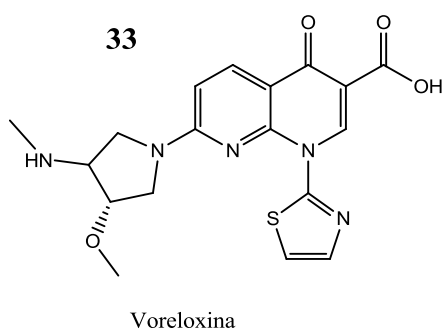


Figura 23. Representação da estrutura química da Vareloxina ou Vosaroxina (33). (ChemDraw Ultra 12)

Em 2004, Takada et al. publicaram os resultados de um estudo em que investigaram diversos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e a dexametasona, um anti-inflamatório esteroide, na ação anti-inflamatória e na proliferação celular, através da análise dos seus efeitos na ativação NF- $\kappa$ B induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF), na cinase I $\kappa$ B $\alpha$ , e na sua degradação, na expressão do gene repórter de proteínas relacionadas com a inflamação reguladas pelo NF- $\kappa$ B e na proliferação tumoral. Os resultados descritos comprovam os efeitos de supressão da ligação do

NF- $\kappa$ B ao DNA, induzido pelo TNF através da inibição da ativação da IKK e degradação da I $\kappa$ B $\alpha$ , inibição da expressão do gene repórter dependente de NF- $\kappa$ B e das proteínas reguladas pelo NF- $\kappa$ B como a COX-2 e a ciclina D1, diminuindo a sua expressão. Por sua vez, a expressão da enzima COX-2 está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam a iniciação da inflamação pela ativação do NF- $\kappa$ B, podendo levar à proliferação celular. Assim, o estudo comprovou a capacidade de inibição da proliferação celular dependente do TNF e de enzimas que possam desencadear a inflamação e, por sua vez, a proliferação tumoral.<sup>125</sup> Em 2013, foram selecionados compostos da família das tiazolidina-4-onas pertencentes à biblioteca de compostos que de alguma forma interagem com o sítio ativo do NF- $\kappa$ B e foram sintetizados 31 compostos que também foram subsequentemente avaliados relativamente à capacidade anti-inflamatória e anti-cancerígena. Desses compostos, o composto **34** (Figura 23) destacou-se pela sua grande atividade anti-inflamatória e os compostos **34** e **35** (Figura 23) mostrarem ser os mais ativos contra linhas celulares humanas BT-549, HeLa, COLO-205 e ACHN, demonstrando atividade anticancerígena dependente do fator NF- $\kappa$ B e desencadeando morte celular por apoptose. A atividade antitumoral destes últimos compostos foi confirmada *in vivo* através do modelo das células tumorais ascíticas de Ehrlich.<sup>126</sup>

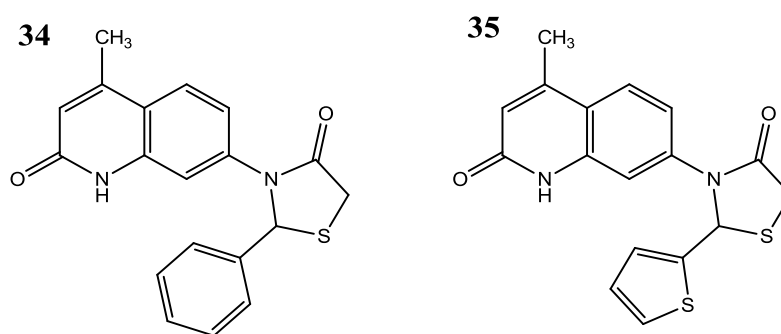


Figura 24. Representação da estrutura química dos compostos **34** e **35**. (ChemDraw Ultra 12)

As plantas constituem uma fonte de modelos e compostos líder extremamente importante no desenvolvimento de novos fármacos, particularmente em áreas como os antineoplásicos, para combate ao cancro, os antivíricos, para combate à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), os fármacos para doenças degenerativas, como Alzheimer e outras formas de demência, os antiparasitários, para combate à malária, leishmaniose, e outras parasitoses e ainda os analgésicos, para aliviar ou suprimir a dor. Diversos medicamentos antitumorais comercializados hoje em dia têm origem em substâncias extraídas de plantas. São exemplos o paclitaxel, a camptotecina, a vinblastina e a podofilotoxina assim como medicamentos para doenças cardíacas,

infeciosas e para a dor, como a digitoxina, a quinina, a artemisinina, a codeína, a morfina entre muitos outros. O desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais é um desafio que envolve ultrapassar diversos obstáculos, mas é também uma fonte ilimitada de possíveis compostos líder que podem dar origem a medicamentos importantes para o tratamento de patologias que ainda não têm cura. A extração, isolamento e elucidação estrutural de compostos provenientes de plantas representa um problema difícil e laborioso. Os avanços recentes em tecnologias como a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectrometria de massa (MS) e a análise cristalográfica por raios-X, permitem a identificação e facilitam o isolamento do produto. A química combinatória por sua vez contribui no aprimoramento do desenvolvimento ao permitir a criação de bibliotecas de análogos sintéticos do composto líder de origem natural e de compostos semissintéticos. Após a otimização dos ensaios de varrimento de alto rendimento dos compostos estar concluída, os compostos podem ser testados para pesquisar atividade biológica e, caso necessário, efetuar as modificações necessárias para o seu aperfeiçoamento.<sup>127,128</sup>

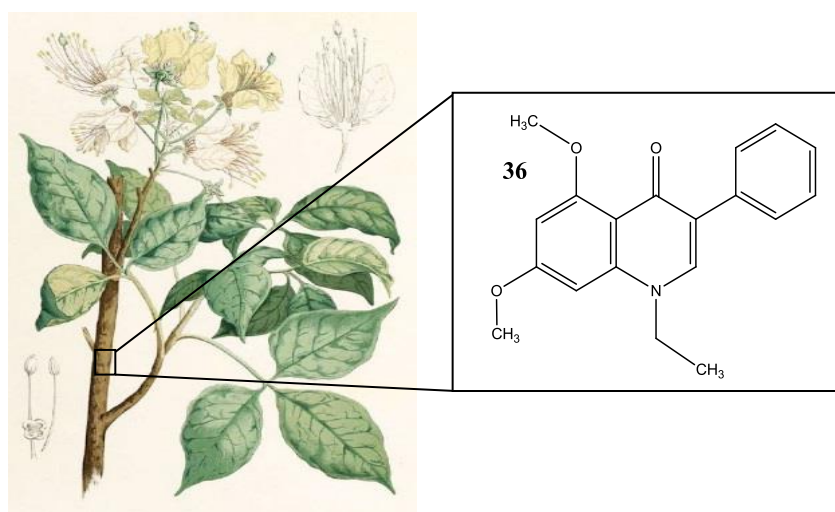


Figura 25: Representação da estrutura química da crataemina (36), obtida a partir da *Crataeva nurvala*. (ChemDraw Ultra 12)

A *Crataeva nurvala* (Figura 25) da família *Capparidaceae* é uma planta muito utilizada na Índia para tratamento de uropatias obstrutivas e não obstrutivas. Possui também propriedades anticancerígenas, antitumorais, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras. Em 2013, um grupo de investigadores indianos que se dedicam a investigar novas aplicações clínicas de plantas indianas publicaram um artigo onde descrevem a descoberta de vários compostos com atividade anticancerígena extraídos dessa planta. Neste conjunto de compostos está incluído um derivado quinolônico designado por **crataemina (36, Figura 25)**. A crataemina foi testada em três linhas de células tumorais, cancro cervical humano (HeLa), cancro de próstata humana (PC-3) e cancro de

mama humana (MCF-7), tendo mostrado atividade contra as três linhas de células e com maior atividade contra as duas primeiras.<sup>128</sup>

## 7.2. QUINOLONAS COMO AGENTE ANTITUBERCULOSO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente pela *Mycobacterium tuberculosis*. A doença pode estar no estado latente ou ativo e cerca de um terço da população mundial é portadora da bactéria embora não apresente sintomas nem transmita a doença. A infecção latente provocada pelo *M. tuberculosis* é um resultado comum do não tratamento ou do tratamento incompleto da bactéria, para além do possível problema da resistência aos fármacos. No caso da infecção se tornar ativa, pode gerar graves problemas para o infetado e para as pessoas em redor, sendo o indivíduo infetado um reservatório para futuras infecções e contágio. A transmissão é feita por via aérea, pela tosse, espirro ou expectoração, e basta algumas bactérias inaladas para ocorrer infecção. Normalmente, a infecção afeta os pulmões, e os principais sintomas da tuberculose pulmonar ativa são tosse com expectoração e, por vezes, com sangue, dor no peito, fraqueza, perda de peso, febre e suores noturnos. Pessoas com doenças que afetam o sistema imune têm uma maior probabilidade de se tornarem doentes com tuberculose ativa. A coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV- *human immunodeficiency virus*) e por TB é uma das principais causas de mortalidade no mundo.<sup>129,130</sup>

O longo período requerido para tratamento da tuberculose faz com que haja uma menor adesão à terapêutica. Este fato, juntamente com eventuais tratamentos inapropriados e perda de qualidade dos medicamentos, pode desencadear a seleção de estirpes resistentes da micobactéria. A tuberculose multirresistente (MDR-TB) é uma forma de tuberculose causada por bactéria resistente que não responde pelo menos a isoniazida e a rifampicina, tendo então de se recorrer aos medicamentos de segunda linha. A duração do tratamento aumenta, podendo durar mais de dois anos, o que causa por vezes efeitos secundários severos e aumenta consideravelmente o custo do tratamento. Em 2006 foram reportadas estirpes resistentes a todos os medicamentos antituberculóticos de primeira e de segunda-linha. Estas estirpes foram testadas e estudadas, sendo classificadas como organismos com resistência extensiva ou total aos medicamentos antituberculosos (XDR-TB). Este tipo de resistência é, definida pela resistência à isoniazida e a rifampicina (MDR-TB), a todas as fluoroquinolonas e pelo menos a três medicamentos injetáveis de segunda linha, como a capreomicina, canamicina e amicacina.<sup>129,131</sup>

O tratamento da tuberculose ativa, sensível aos medicamentos de primeira linha, é feito durante 6 meses, com quatro medicamentos antimicrobianos: Isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Já os medicamentos de segunda linha englobam a canamicina, a amiacina, a etionamida, o ácido para-aminosalicílico, a capreomicina e a cicloserina.<sup>102</sup> Segundo a WHO, as fluoroquinolonas ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina são as quinolonas mais utilizadas atualmente na Europa como medicamentos de segunda linha no tratamento da tuberculose. Nos Estados Unidos da América, a gatifloxacina, levofloxacina e moxifloxacina pertencem à lista dos medicamentos normalmente utilizados no tratamento da tuberculose embora a utilização para esse fim não tenha sido aprovada pela FDA. Porém, a sua utilização no tratamento da tuberculose multirresistente tem aumentado, devido ao seu perfil farmacocinético favorável exibido por estes compostos (excelente biodisponibilidade oral e possibilidade de atingir concentrações plasmáticas superiores ao MIC), potência e espectro de ação.<sup>118,132,133</sup>

O pioneiro na investigação de fluoroquinolonas como medicamentos antituberculosos foi Tsukamura, que num estudo publicado em 1985<sup>REF</sup> demonstrou a eficácia do uso da ofloxacina em combinação com outros fármacos, durante 6 a 8 meses, para tratamento da tuberculose. Em resultado desse estudo, as fluoroquinolonas tornaram-se indispensáveis no tratamento da tuberculose multirresistente e como alternativa aos medicamentos de segunda linha. Devido ao constante desafio imposto pelas bactérias, vários grupos de investigação prosseguem na busca de medicamentos mais potentes que contornem as resistências desenvolvidas pelas bactérias e retardem o desenvolvimento de outras. Guerrini et. al. verificaram que o composto **37** (figura 26) exibe uma potência quatro vezes superior à exibida pela ciprofloxacina, uma fluoroquinolona “standard” para tratamento de TB.<sup>118,134</sup>

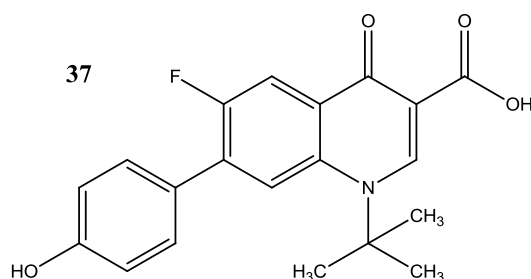


Figura 26. Representação da estrutura química do composto **37**. (ChemDraw Ultra 12)

Nos últimos anos têm-se debatido o uso deste composto como agente antituberculoso de primeira linha mas existem diversos prós e contras que devem ser tidos em causa. Por um lado, o uso de fluoroquinolonas pode reduzir significativamente o tempo de tratamento. Por outro, existe

o risco de desenvolver uma maior seleção de estipes resistentes às fluoroquinolonas, devido ao maior uso dessa classe no tratamento de infecções respiratórias não específicas e na pneumonia adquirida na comunidade. O número de estirpes XDR-TB pode também aumentar se houver redução da eficácia das fluoroquinolonas contra organismos MDR-TB.<sup>135,136</sup> Os ensaios clínicos para avaliar a possibilidade de introduzir fluoroquinolonas como medicamento antituberculoso de primeira linha encontram-se na fase III, com a designação REMoxTB, e têm como finalidade a análise da eficácia da terapêutica combinada de moxifloxacina com etambutol, isoniazida, pirazinamida e rifampicina, no tratamento de tuberculose pulmonar. O acompanhamento e detalhes do estudo podem ser visualizados em: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00864383?term=tuberculosis?moxifloxacin&rank?3>.

### 7.3. QUINOLONAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL

Foi demonstrado em alguns estudos que as quinolonas interagem com o cromossoma bacteriano, o que suportou a hipótese de que as quinolonas se podem ligar aos ácidos nucleicos virais. Deu-se então início à investigação da atividade antiviral das quinolonas. Em estudos preliminares, foi constatado que a ofloxacina inibe a síntese de DNA e RNA viral e que a L-ofloxacina exibe atividade protetora da citólise celular mediada pelo HIV-1. As células sobreviventes perdem a capacidade de produzir antígenos CD4 na superfície e também a capacidade de produzir vírus infecciosos. Com base nestes resultados, têm sido efetuados diversos estudos com o objetivo de encontrar compostos com a estrutura química ideal para atuar nos vírus da SIDA, nomeadamente o HIV-1 e HIV-2. Foram entretanto registadas várias patentes de compostos com a estrutura base 3-carboxi-4-quinolona que exibem atividade antiviral e antirretroviral.

Em 1999, Hagihara e seus colaboradores sintetizaram diversos compostos baseados na estrutura das fluoroquinolonas e com grupos arilpiperazinil como substituintes. Os compostos foram testados em células cronicamente infetadas com o vírus HIV-1, tendo sido constatado que alguns desses compostos tinham atividade anti-HIV-1. Foram assim reveladas algumas das características que a estrutura deve possuir para ter atividade antiviral. Outros investigadores investiram também nesta área, conjugando modificações para otimizar essa atividade. De todo este esforço resultaram compostos quinolónicos com potente atividade antiviral como é o caso do **elvitegravir** (38, Figura 27).<sup>119,137-142</sup>

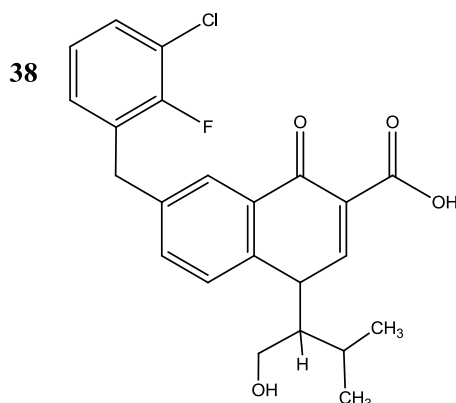


Figura 27. Representação da estrutura química do elvitegravir. (ChemDraw Ultra 12)

O **elvitegravir** é uma fluoroquinolona com atividade antiviral principalmente ativa contra o retrovírus HIV. O seu modo de ação passa pela inibição da transferência de cadeia da enzima integrase do HIV, inibindo desta forma a replicação do HIV-1, do HIV-2 e de vários subtipos, incluindo os vírus resistentes a múltiplos medicamentos anti-virais.<sup>143,144</sup> Em 2012, o elvitegravir foi aprovado para utilização em terapêutica de combinação com outros três medicamentos utilizados no tratamento do HIV-1 (colbicistat, emtricitabina e fumarato de tenofovir disproxil) com o nome de marca *Stribild*<sup>®</sup>. No dia 21 de abril de 2014 a empresa Gilead Sciences anunciou a aprovação da utilização do elvitegravir no tratamento da infeção por HIV-1 em adultos, após ter sido rejeitado, em 2013, por deficiências na documentação e validação de certos testes de qualidade e métodos. Em novembro de 2013, a comissão europeia aprovou o elvitegravir, com o nome de marca Vitekta<sup>®</sup> ou com o nome de marca Stribild<sup>®</sup>, para o tratamento de infeções por HIV-1 em adultos.<sup>145–147</sup>

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (VHC) pertencente à família *Flaviviridae*. A infeção é muitas vezes assintomática e autolimitada, mas em casos de infeção crónica pode haver comprometimento hepático severo, como hepatocarcinoma, cirrose e falha hepática, sendo uma das maiores causas de transplante de fígado. Segundo os dados da WHO, cerca de 3% da população mundial já foi afetada pelo vírus e aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo são portadores crónicos, com risco de desenvolver cirrose hepática e/ou cancro hepático. Na europa, a prevalência do HCV é de 0,5 a 2%,<sup>148</sup> e o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade de inibir novos alvos do ciclo de vida do vírus da hepatite C é uma área de investigação muito ativa nos últimos anos. A proteína viral 5b não estrutural (do inglês non-structural protein 5b – NS5B) é uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp) que é crucial na replicação viral. Não existindo no humano, é um excelente alvo para o desenvolvimento de novas

terapêuticas. Kumar et al. dedicaram-se à descoberta de novos inibidores da polimerase NS5B e selecionaram um composto com estrutura quinolónica (**38**, figura 27) com grande potencial na inibição da polimerase em estudo. Esse composto foi encontrado após a aplicação da técnica HTS, e esse “hit” com capacidade de inibir NS5B foi posteriormente estudado, verificando-se que a sua estrutura permite a interação com o sítio NNI-2 da polimerase, inibindo a sua atividade. Com base nesta estrutura, sintetizaram diversos compostos com modificações nos grupos substituintes e verificaram que a otimização preliminar gerou compostos atrativos. A investigação deste composto continua em desenvolvimento pelo grupo, e outros grupos de investigação têm-se também focado nas quinolonas como futuros fármacos para a terapêutica da hepatite C.<sup>149,150</sup>

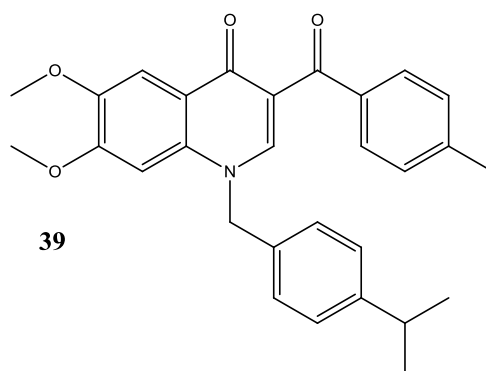


Figura 28. Representação da estrutura química do composto **39**. (ChemDraw Ultra 12)

#### 7.4. QUINOLONAS COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

Segundo os dados da organização mundial de saúde, 207 milhões de pessoas contraíram malária em 2012 e aproximadamente 627 mil pessoas morreram com a doença, sendo que 90% das mortes ocorreram na África subsaariana. A malária matou 482 mil crianças abaixo dos cinco anos, o que dá uma média de um falecimento em cada minuto. Apesar destes números assustadores, entre 2000 e 2012 foram salvas 3.3 milhões de vidas, das quais 90% eram crianças abaixo dos 5 anos, devido ao aumento de escala das intervenções contra a malária, através de ações multinacionais, como por exemplo os programas “Roll Back Malaria” e “Medicines for Malaria Venture (MMV). O problema das resistências a todas as classes de agentes anti maláricos, incluindo a artemisinina e derivados, é uma grande ameaça ao controlo da doença. O uso generalizado e indiscriminado dos medicamentos anti maláricos exerceu uma forte pressão seletiva nos parasitas para desenvolver maior resistência, piorando ainda mais os números. Assim, o desenvolvimento de novas classes de fármacos antimaláricos, ativos contra novos alvos do parasita, é essencial para o controlo e erradicação da doença.<sup>151-153</sup>

A malária resulta de uma infecção causada por protozoários do género *Plasmodium*, sendo o *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax* as causas mais comuns da malária humana. No entanto, existem relatos de infecção por *P. knowlesi*, o parasita causador de malária em macacos. Os parasitas são transportados pelo mosquito fêmea anófeles e inoculados nos humanos. A sintomatologia inicial é não-específica, assemelhando-se aos sintomas de uma infecção viral comum. É nesta fase que se deve dar início ao tratamento, para uma recuperação completa e rápida. Caso contrário a infecção continuará a evoluir, dando origem a malária severa, com sintomas como o coma, acidose metabólica, anemia severa, hipoglicémia, falha renal aguda e edema pulmonar.<sup>153</sup>

Os medicamentos anti maláricos podem atuar nas diversas fases do ciclo de vida dos parasitas, nomeadamente, enquanto esporozoíto, na fase hepática, na fase sanguínea e na fase sexual. Apesar de já haver mais investigação no desenvolvimento de medicamentos que interferem na fase hepática do parasita e na fase vetorial, a maioria dos esforços têm-se focado na fase eritrocitária, a fase onde aparecem os primeiros sintomas da doença.<sup>154</sup>

As mitocôndrias são essenciais no ciclo de vida dos Plasmócitos e existem diversas diferenças entre as mitocôndrias dos plasmócitos e as mitocôndrias dos humanos, pelo que a cadeia mitocondrial fornece alvos excelentes para a terapêutica anti malárica. Sabe-se que a cadeia de transporte de eletrões dos parasitas intraeritrocitários desempenha um papel crucial na viabilidade do parasita. Com base nestas informações, os grupos de química medicinal têm vindo a desenvolver projetos com o intuito de encontrar novos fármacos capazes de atuar ao nível da cadeia de transporte de eletrões do plasmódio, através da interação com enzimas e complexos que a compõe.

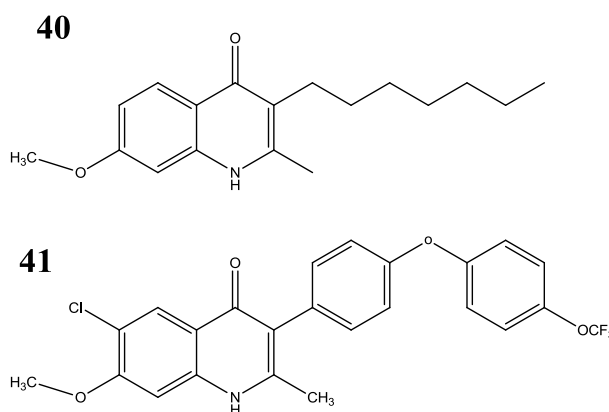


Figura 29. Representação da estrutura química dos compostos Endoquina (**40**) e ELQ-300 (**41**). (ChemDraw Ultra 12)

Algumas quinolonas têm sido extensivamente investigadas como agentes inibidores do complexo *bc1* do plasmódio, através da sua capacidade de ligação ao sítio quinol oxidativo ( $Q_0$ ) do complexo III ou citocromo *bc1*. Foram sintetizados e estudados diversos compostos, de forma a encontrar a melhor relação estrutura-atividade para a inibição desse complexo. Num artigo publicado em 1948, Salzer e colaboradores descreveram a **endoquina (40, figura 29)**, como um composto com grande potência anti malárica, na sequência de testes em aves infetadas com plasmódio aviário, num modelo experimental aviário.<sup>155</sup> Recentemente, alguns investigadores descobriram o composto **ELQ-300 (41, figura 29)**, obtido a partir de modificações efetuados na estrutura da endoquina, e verificaram que o composto possuía grande seletividade e potência na inibição do complexo *bc1* do plasmódio, sendo considerado um bom candidato para o portefólio de novos medicamentos do projeto Medicines for Malaria Venture (MMV), que visa o desenvolvimento de novos medicamentos contra a malária, mais eficazes e economicamente acessíveis. Outros compostos também se mostraram promissores antimaláricos, no entanto foi o composto ELQ-300 que foi selecionado para a fase dos ensaios pré clínicos, por ter atividade antiplasmodial superior aos anteriores, demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo* contra as fases eritrocitária e hepática do parasita e pela sua grande seletividade. Baseado no mesmo princípio, foram identificados outros compostos com atividade antiplasmodial, bastante promissores, nomeadamente o **decoquinato (42, figura 30)** e o **RCQ (43, figura 30)**, que foram desenvolvidos por Da Cruz *et al.* e Cowley *et al.* respetivamente.<sup>156</sup>

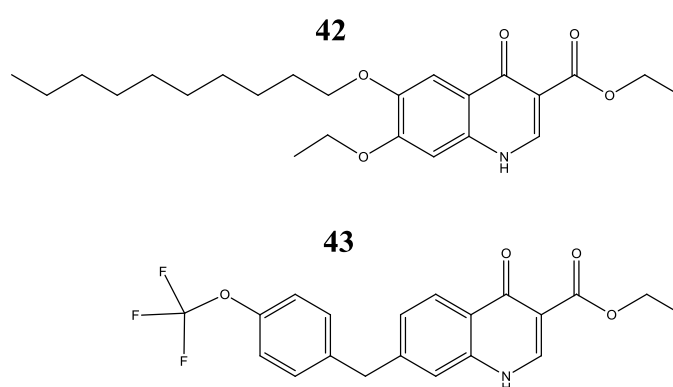


Figura 30. Representação da estrutura química dos compostos Decoquinato (42) e RCQ (43). (ChemDraw Ultra 12)

A enzima NADH:ubiquinona oxidoreductase (PfNDH2) é uma desidrogenase relacionada com a cadeia transportadora de eletrões do plasmódio. Constituindo um novo alvo na investigação de novos medicamentos contra a malária. Segundo Pidathala *et al.*, a hidroxi-2-dodecil-4-(1H)-quinolona (**HDQ (44, figura 31)**) é o único inibidor conhecido desta desidrogenase. Através de

métodos quimioinformáticos, foram selecionados racionalmente 17 mil compostos derivados do HDQ para o varrimento de alta-produtividade (HTS), de que resultou a identificação e o estudo de relações estrutura-atividade em 20 quimiótipos, e por fim foi selecionado o composto com maior potencial antimalárico. O **CK-2-68 (45, figura 31)** mostrou possuir várias vantagens, entre as quais se destaca uma grande atividade anti malárica contra linhas de *P. falciparum* 3D7, seletividade para a enzima PfNDH2, em comparação com outras enzimas respiratórias, baixa citotoxicidade e grande estabilidade na presença de microssomas hepáticos humanos e grande biodisponibilidade oral. Estas vantagens vão de acordo do perfil de medicamentos definido para o tratamento da malária não complicada. Neste mesmo estudo é de salientar que alguns compostos mostraram a capacidade de inibir tanto a enzima PfNDH2 como o complexo *bc*<sub>1</sub>, sendo uma potencial vantagem sobre os inibidores de apenas um alvo, tanto ao nível da eficácia dos tratamentos como no retardamento do desenvolvimento de resistências.<sup>152,156</sup>

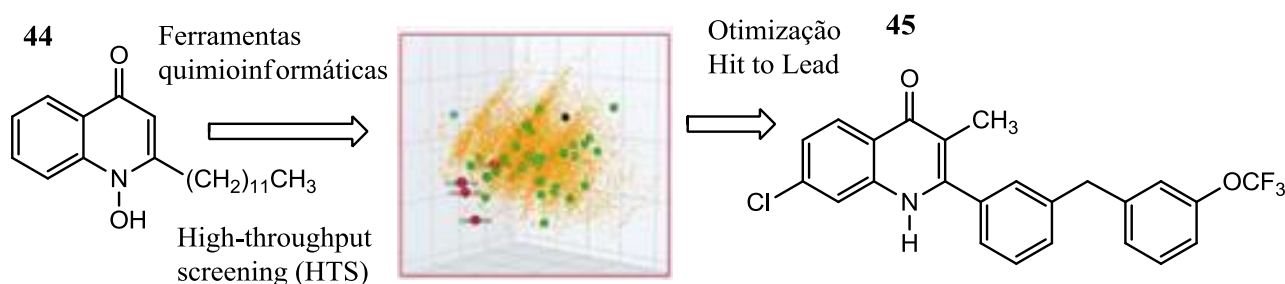


Figura 31. Representação gráfica do processo que conduziu ao desenvolvimento do composto CK-2-68 a partir da estrutura química do composto HDQ - 7-cloro-3-metil-2-(4-(4-trifluorometoxi)benzil)fenil)quinolin-4(1H)-ona, que envolveu a utilização de ferramentas quimioinformáticas e de varrimento de alto-rendimento (do inglês High Throughput screening HTS) na otimização do composto inicial (Hit to Lead). Adaptado da referência 152. (ChemDraw Ultra 12)

## 7.5. QUINOLONAS NAS DOENÇAS NEURO-DEGENERATIVAS

A doença de alzheimer é a forma mais comum de demência. Em 2010 a Europa possuía cerca de 10 milhões de casos de doentes com alzheimer e as estimativas sugerem que em 2050 esse número terá aumentado para 14 milhões de casos. Estes dados mostram a urgente necessidade de novas providências para conter esse crescimento. O desenvolvimento de novos medicamentos para diminuir a progressão da doença, curar e prevenir constituem prioridade no programa da organização mundial de saúde “Mental Health Gap Action” (mhGAP).<sup>157</sup>

A doença do alzheimer (DA) é uma síndrome caracterizado por distúrbios em várias funções cerebrais, incluindo memória, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. Patofisiologicamente é caracterizada por lesão e morte de neurónios. A origem ainda não é clara, mas pensa-se estar relacionada com diversos fatores, tais como a acumulação de proteínas Tau hiperfosforiladas, originando emaranhados de neurofibrilas ou com a formação de

fibrilas amiloides que se depositam no exterior do neurónio, formando as placas senis e por vezes nas paredes e nos capilares sanguíneos cerebrais que dão origem a angiopatia. De qualquer forma, o estresse oxidativo é a principal causa de neuroinflamação, evidenciada em estudo pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias no líquido cérebro-espinal, em pessoas portadoras da DA. Também está relacionada com a cascata de processos que dão origem a danos neuronais e à DA.<sup>157</sup>

Os recetores canabinóides caracterizados até ao momento são o recetor CB1 e recetor CB2. Os recetores canabinóides, os seus ligandos endógenos (endocanabinóides) e as proteínas responsáveis pela captação e inativação dos endocanabinóides constituem alvos potencialmente interessantes no tratamento de várias doenças. Os agonistas dos recetores canabinóides do tipo 2 (CB2) desempenham um importante papel na dor aguda, dor inflamatória, dor do pós-operatório, dor do cancro e na dor neuropática. Outras potenciais indicações terapêuticas dos agonistas de CB2 incluem esclerose múltipla, esclerose amiotrófica lateral, doença de Huntington's, AVC, aterosclerose, inflamação gastrointestinal, doenças hepáticas crónicas, desordens nos ossos e cancro. Vários estudos reportam ainda que os agonistas e antagonistas dos recetores CB2 são agentes imunomoduladores no tratamento de várias doenças inflamatórias.

Pasquini e seus colaboradores têm vindo a estudar os efeitos de alguns derivados 3-carboxi-4-quinolónicos nos recetores CB2, tendo recentemente identificado e reportado uma série de 3-carboxamido-4-quinolonas 6-substituídas como ligandos altamente seletivos para o recetor CB2 sendo o composto **46** (**Figura 32**) caracterizado por um perfil agonista, com comprovado efeito antinocicetivo in vivo. No entanto, o equilíbrio entre a lipofilicidade e a solubilidade aquosa ainda requer otimização, uma vez que o composto mostra fraca solubilidade aquosa, o que compromete a sua biodisponibilidade.

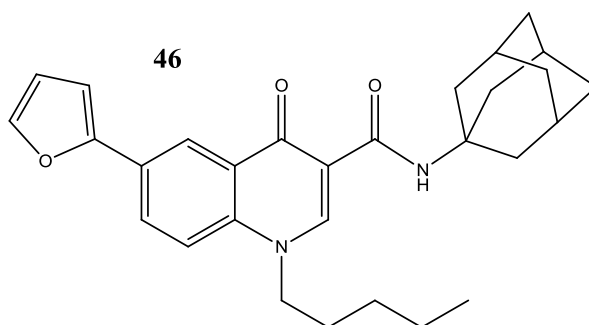


Figura 32. Representação da estrutura química do composto 46. (ChemDraw Ultra 12)

Os medicamentos utilizados no combate à doença de alzheimer, como a galantamina, a rivastigmina e o donepezilo, são inibidores da acetilcolinesterase que tratam os sintomas da doença, pois inibem a ação da enzima acetilcolinesterase, aumentando a concentração de acetilcolina na fenda sináptica. Reconhecendo também a importância da neuroinflamação no desenvolvimento da doença de alzheimer, investigadores idealizam um medicamento multipotente, que atue como inibidor da acetilcolinesterase e como antioxidante.<sup>158</sup>

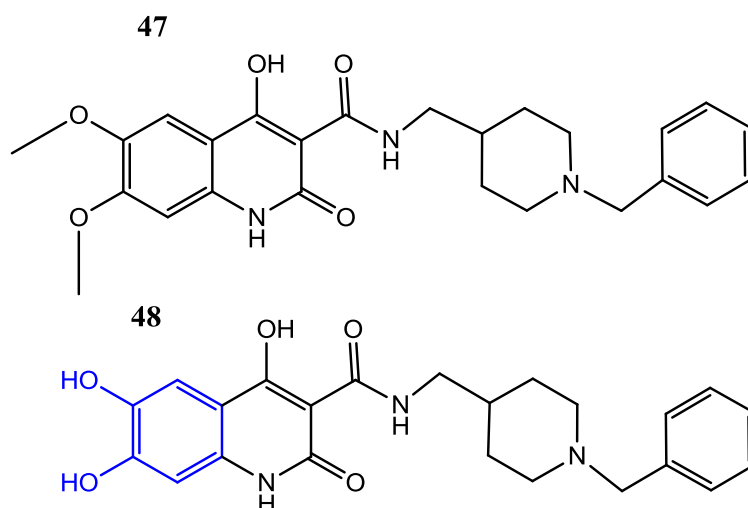


Figura 33. Representação da estrutura química dos compostos 46 e 47. O grupo catecol está representado em azul. (ChemDraw Ultra 12)

As cumarinas, análogos, com oxigênio, das quinolonas, são eficientemente utilizadas como anticolinérgicos. Assim, Pudlo *et al.* juntou à estrutura quinolónica um grupo benzilpiperidina, com o objetivo de encontrar um fármaco multipotente, com atividade anticolinérgica e antioxidante. A combinação originou compostos interessantes e, desses compostos, os compostos 47 e o 48 foram selecionados como os mais potentes. O composto 47 mostrou ser um bom inibidor da acetilcolinesterase e o composto 48 mostrou uma grande atividade antiradicalar, sem interferir com a atividade anticolinesterásica, propriedades estas providas pelo grupo catecol anexado ao anel aromático (figura 33).<sup>158</sup>

O recetor colinérgico muscarínico M<sub>1</sub> (mAChR) constitui outro alvo possível no desenho de terapêuticas para as doenças neurodegenerativas, como no alzheimer, e até mesmo na esquizofrenia. Esse recetor é expresso no hipocampo, no corpo estriado e no córtex pré-frontal e a estimulação desse recetor por agonistas mostrou conduzir a uma diminuição na fosforilação da proteína tau, uma das principais teorias de causalidade da doença do alzheimer.<sup>159</sup> Dos diversos compostos que foram caracterizados como ligandos seletivos alostéricos do mAChRm, o 1-(4-

metoxibenzil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico (do inglês “benzyl quinolone carboxylic acid” BQCA), foi o que exibiu maior seletividade para o subtipo  $M_1$ , com boa biodisponibilidade oral, com a propriedade de modulador alostérico positivo e agonista alostérico e com um grande grau de cooperatividade com neurotransmissores endógenos, como a acetilcolina. Combinando estas duas descobertas, Davie e seus colaboradores investigaram e reportaram a síntese e validação farmacológica de diversos análogos do BQCA, sendo o composto 11 o mais relevante. Este composto serviu de modelo estrutural na avaliação do sítio de ligação do BQCA no recetor, através do método da co-cristalização, e possivelmente poderá funcionar como uma boa ferramenta farmacológica numa grande gama de aplicações.<sup>160</sup>

A enzima monoamino oxidase (MAO) é uma flavoenzima mitocondrial responsável pelo catabolismo oxidativo dos neurotransmissores, tais como a noradrenalina, dopamina e serotonina, no sistema nervoso central e em tecidos periféricos. Inibidores seletivos do subtipo MAO-B correspondem a importantes alvos para o tratamento e diminuição dos sintomas de doenças como Alzheimer e Parkinson. Foram isolados inibidores seletivos da MAO-B com estrutura quinolónica dos frutos da *Evodia rutaecarpa* em 2003, por Lee et al.. Num estudo posterior, estes autores verificaram que as quinolonas alcaloides isoladas possuíam efeito potente e seletivo de inibição da MAO-B cerebral de ratinhos. Um dos compostos foi considerado como composto líder promissor no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de Alzheimer e de Parkinson.<sup>161</sup>

## 7.6. OUTRAS ATIVIDADES DAS QUINOLONAS

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor com maior efeito inibitório no sistema nervoso central (SNS) que exerce os seus efeitos fisiológicos ao ligar-se aos recetores da membrana neuronal,  $GABA_A$ ,  $GABA_B$  e  $GABA_C$ , sendo o  $GABA_A$  o recetor com mais aplicações farmacológicas por interagir com as benzodiazepinas e originar efeitos como ansiolítico, anticonvulsivo, relaxante muscular e efeitos hipnótico-sedativos. Existem diversos compostos que interagem com o sítio de ligação das benzodiazepinas tais como pirazoloquinolinonas, ciclopirrolonas, piridodiindoles, quinolinas e flavonas. Após a verificação da capacidade de interação de derivados de 4-quinolonas com os recetores  $GABA_A$ , Lager e seus colaboradores otimizaram o farmacóforo 4-quinolona do composto líder **48**, propondo diversos compostos com elevada afinidade para o recetor da benzodiazepina.<sup>162</sup>

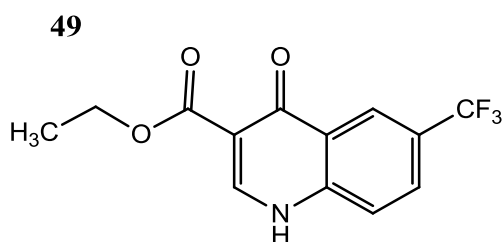


Figura 34. Representação da estrutura química do composto quinolónico com afinidade para o recetor GABA<sub>A</sub>, utilizado como modelo (49). (ChemDraw Ultra 12)

Muito recentemente, Xiao e seus colaboradores concluíram que é possível desenvolver antifúngicos a partir de fluoroquinolonas, através de modificações na posição C-7. Esta descoberta surgiu no decurso de um estudo daquele grupo que tinha como objetivo o desenvolvimento de híbridos de quinolonas com flavonoides com atividade como inibidores multi-alvo das topoisomerasas bacteriana.<sup>163</sup>

Em 1986, Leclerc e colaboradores dedicavam-se à pesquisa de compostos com atividade inotrópica positiva, para utilização no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, com boa biodisponibilidade oral e perfil de segurança adequado. Utilizaram o modelo computacional SYBYL para indicar quais as propriedades que o composto deviam ter para ser utilizado com essa finalidade, e concluíram que os derivados piridil-2-quinolona possuíam atividade inotrópica positiva.<sup>164,165</sup> Mais recentemente, Abouzid e colaboradores analisaram três séries de derivados de piridazinona e, entre eles, foram selecionados compostos com estrutura 6-(3-etoxicarbonil-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-6-il)-4,5-dihi-dro-3(2H)-piridazinona. Os compostos **50** e **51**, mostraram capacidade vasodilatadora moderada.<sup>166</sup>

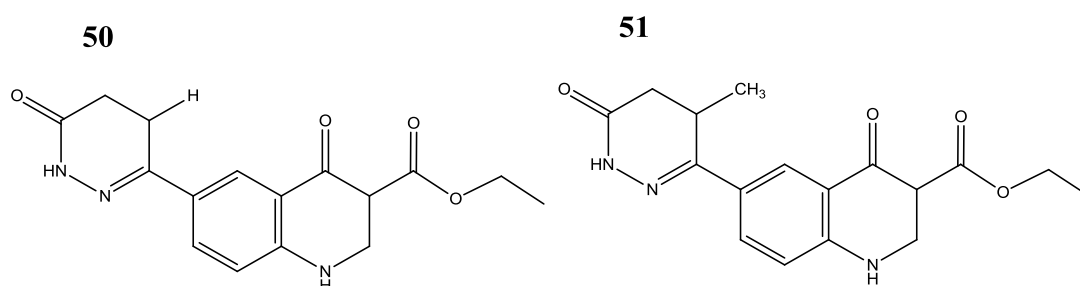


Figura 35. Representação da estrutura química dos composto derivados da estrutura 6-(piridazinona)-3-quinolona com moderada atividade vasodilatadora, **50** e **51**. (ChemDraw Ultra 12)

Na década de 90, o flosequinano (**52**, figura 36), também conhecido por BTS 49465 (**52**, figura 34), foi um pró-fármaco comercializado pela empresa farmacêutica inglesa Boots com o nome de marca Manoplax<sup>®</sup> para utilização no tratamento de doenças cardiovasculares, devido à sua atividade vasodilatadora e propriedades farmacocinéticas adequadas que permitiam a administração

oral. A empresa Boots investiu vários milhões no desenvolvimento no manoplax® e ficou numa situação financeira muito complicada quando o seu medicamento de “ouro” saiu do mercado devido aos resultados do estudo de longo prazo designado por PROFILE (Prospective Randomized Flosequinan Logevity Evaluation) em que mostraram um aumento na taxa de mortalidade em doentes que utilizavam 100 mg de Manoplax® em comparação com placebo. Os estudos pré-clínicos realizados não foram suficientes, e alguns resultados foram desvalorizados. <sup>167-169</sup>

Durante a sua curta comercialização (12/1992 a 07/1993), de todos os efeitos secundários reportados, 80% foram considerados efeitos adversos graves e 70% foram casos de morte. Estes efeitos nefastos foram atribuídos ao metabolito sulfonado do flosequinano, o flosequinoxano (**53**, **figura 36**). Este metabolito é farmacologicamente semelhante ao flosequinano mas é mais potente, atinge concentrações plasmáticas superiores ao composto original e permanece durante muito mais tempo em circulação. Enquanto o flosequinano possui um tempo de semi-vida de 90 minutos o flosequinoxano possui 36,5 horas, que pode ser ainda maior em casos de insuficiência renal. Estes parâmetros farmacocinéticos exagerados estão na base das taxas aumentadas de efeitos adversos e morte. <sup>94, 170-173</sup>

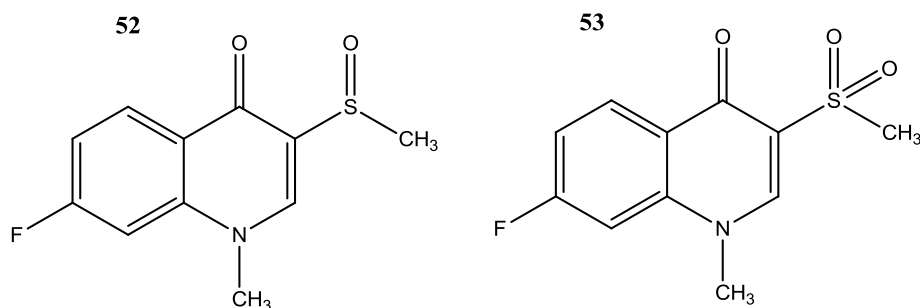


Figura 36. Representação da estrutura química do flosequinano (**52**) e do seu metabolito ativo, flosequinoxano (**53**). (ChemDraw Ultra 12)

## 8. CONCLUSÃO

A química medicinal é uma área crucial no desenvolvimento de novos compostos com atividade farmacológica e as quinolonas quase correspondem a uma marioneta nas mãos dos químicos medicinais. A grande versatilidade e flexibilidade do núcleo bicíclico das quinolonas combinado com a facilidade na síntese de novos derivados, contribui para o sucesso desse grupo de compostos, justamente classificados como uma grande família de fármacos multifacetados. Isto pode ser comprovado através dos largos milhares de compostos sintetizados e dos estudos publicados sobre a descrição de relações quantitativas entre estrutura química e atividade

biológica e sobre as propriedades físico-químicas desta classe de compostos. Destacam-se as suas propriedades como agentes antimicrobianos, com um espectro de ação que foi sendo alargado, surgindo simultaneamente a curiosidade acerca do verdadeiro modo de atuação destes compostos, descrito em outros tantos estudos, mesmo que ainda sem consenso sobre a forma de interação com as enzimas alvo ou outros alvos não proteicos.

Foram descobertos e sintetizados compostos quinolónicos com estruturas otimizadas para o fim a que eram destinados. Os seus mecanismos de ação foram interpretados e as relações entre a estrutura química e atividade farmacológica estudadas. Tiveram a sua atividade e seletividade comprovada, sendo posteriormente melhorados e, nalguns casos, promovidos para a fase dos ensaios clínicos e comercialização.

Além do precioso contributo das quinolonas na terapêutica das infeções bacterianas, outros compostos desta classe atingiram notoriedade para tratamento de outras patologias ou encontram-se em fases avançadas de desenvolvimento. A vareloxina encontra-se na terceira fase dos ensaios clínicos, com o nome de marca Qinprezo, para tratamento de certos tumores. Algumas fluoroquinolonas são eficazmente utilizadas no tratamento da tuberculose. O elvitegravir já está a ser comercializado para o tratamento do HIV-1. Para além destas aplicações das quinolonas, outras estão ainda em estudo, destacando-se a aplicação na terapêutica de patologias degenerativas, como a doença de alzheimer e a doença de Parkinson até e a aplicação como cardiotónicos.

A evolução dos derivados quinolónicos prossegue, pois será necessário contornar problemas advindos de resistências bacterianas e virais aos fármacos e responder à constante necessidade de novas terapêuticas para as doenças. A versatilidade e disponibilidade estrutural fazem deste grupo uma inesgotável fonte de esperança.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Busse, W., Ganellin, C. & Mitscher, L. Vocational training for medicinal chemists: Views from industry. *European journal of medicinal chemistry* **31**, 747–60 (1996).
2. Lombardino, J. G. & Lowe, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. *Nature reviews. Drug discovery* **3**, 853–62 (2004).
3. Andriole, V. The quinolones: Past, present, and future. *Clinical infectious diseases* **41**, 113–119 (2005).
4. Price, J. Some reactions of 1-methyl-4-quinolone-3-carboxylic acid, a degradation product of the alkaloids. *Australian Journal of Scientific Research* **2A**, 272–281 (1949).
5. Emami, S., Shafiee, A. & Foroumadi, A. Quinolones: recent structural and clinical developments. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **3**, 123–136 (2005).
6. Siporin, C., Heifetz, C. L. & Domagala, J. M. *The New Generation of Quinolones*. CDC Press. New York: Infectious Disease Therapy. Volume 5. (1990)
7. Emmerson, A. M. & Jones, A. M. The quinolones: decades of development and use. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51 Suppl 1**, 13–20 (2003).
8. Blondeau, J. M. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of ophthalmology* **49 Suppl 2**, S73–S78 (2004).
9. Sarkar, A., Anderson, K. C. & Kellogg, G. E. Computational analysis of structure-based interactions and ligand properties can predict efflux effects on antibiotics. *European journal of medicinal chemistry* **52**, 98–110 (2012).
10. Dougherty, T. J., Beaulieu, D. & Barrett, J. F. New quinolones and the impact on resistance. *Drug discovery today* **6**, 529–536 (2001).
11. Ahmed, A. & Daneshtalab, M. Nonclassical biological activities of quinolone derivatives. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: A publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences* **15**, 52–72 (2012).
12. Andriole, V. T. *The Quinolones*. Academic Press. (2000).
13. Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J. & Tulkens, P. M. Quinolones in 2005: An update. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **11**, 256–280 (2005).
14. Sheehan, G. & Chew, N. S. *The history of quinolones in Fluoroquinolone Antibiotics*. Ronald, A. R. & Low, D. E. Birkhäuser Basel: 1-10 (2002)
15. Appelbaum, P. C. & Hunter, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives. *International journal of antimicrobial agents* **16**, 5–15 (2000).
16. King, D., Malone, R. & Lilley, S. New classification and update on the quinolone antibiotics. *American family physician* **61**, 2741-2748 (2000).
17. Naber, K. G. & Adam, D. Classification of fluoroquinolones. *International journal of antimicrobial agents* **10**, 255–257 (1998).

18. Andersson, M. I. & MacGowan, A. P. Development of the quinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51 Suppl 1**, 1–11 (2003).
19. Wise, R., Lockley, R., Dent, J. & Webberly, M. Pharmacokinetics and tissue penetration of enoxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **26**, 17–19 (1984).
20. Ball, P. Efficacy and safety of levofloxacin in the context of other contemporary fluoroquinolones: A review. *Current therapeutic research, clinical and experimental* **64**, 646–661 (2003).
21. Brunner, M. et al. Target Site Concentrations of Ciprofloxacin after Single Intravenous and Oral Doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3724–3730 (2002).
22. Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R. & Yar, M. S. Ciprofloxacin: Review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **25**, 577–589 (2010).
23. Lode, H. et al. Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 1338–1342 (1987).
24. Xie, S. et al. Preparation and evaluation of ofloxacin-loaded palmitic acid solid lipid nanoparticles. *International journal of nanomedicine* **6**, 547–555 (2011).
25. Subramanian L., Ganesan, V., Ramasubramaniyan, P., Solairaj, P. & Jeganath, S. Formulation and evaluation of ofloxacin nanoparticles by emulsion polymerization method. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* **3**, 193–196 (2012).
26. Namasivayam, S. K. R. & Robin, A. T. G. Preparation, optimization, and characterization of Biocompatible nanoalbumin-ofloxacin (BSANP-OF) conjugate and evaluation of control release, antibacterial activity against clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **6**, 235-239 (2013).
27. Bach, D. et al. Rufloxacin once daily versus ciprofloxacin twice daily in the treatment of patients with acute uncomplicated pyelonephritis. *The Journal of urology* **154**, 19–24 (1995).
28. Moretti, M. V., Pauluzzi, S. & Cesana, M. Penetration of Rufloxacin into the Cerebrospinal Fluid in Patients with Inflamed and Uninflamed Meninges. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 73-77 (2000).
29. Ishikawa, H. et al. Studies on antibacterial agents. I. Synthesis of substituted 6,7-dihydro-1-oxo-1H,5H-benzo[i,j]quinolizine-2-carboxylic acids. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **37**, 2103–2108 (1989).
30. Kuwahara, K., Kitazawa, T., Kitagaki, H., Tsukamoto, T. & Kikuchi, M. Nadifloxacin, an antiacne quinolone antimicrobial, inhibits the production of proinflammatory cytokines by human peripheral blood mononuclear cells and normal human keratinocytes. *Journal of dermatological science* **38**, 47–55 (2005).
31. Ball, P., Fernald, A. & Tillotson, G. Therapeutic advances of new fluoroquinolones. *Expert opinion on investigational drugs* **7**, 761–783 (1998).
32. Kang, S. L., Rybak, M. J., Mcgrath, B. J., Kaatz, G. W. & Seo, S. M. Pharmacodynamics of Levofloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin, Alone and in Combination with Rifampin, against

Methicillin- Susceptible and -Resistant Staphylococcus aureus in an In Vitro Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 2702–2709 (1994).

33. Barry, A. L. & Fuchs, P. C. In Vitro Activities of Sparfloxacin, Tosufloxacin, Ciprofloxacin, and Fleroxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 955-960 (1991).

34. Efthimiadou, E. K., Karaliota, A. & Psomas, G. Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation. *Journal of inorganic biochemistry* **104**, 455–466 (2010).

35. Beberok, A., Wrześniok, D., Otręba, M. & Buszman, E. (in press). Impact of sparfloxacin on melanogenesis and antioxidant defense system in normal human melanocytes HEMA-LP – An in vitro study. *Pharmacological Reports* (2014). DOI 10.1016/j.pharep.2014.07.015.

36. Pierfitte, C. & Royer, R. The link between sunshine and phototoxicity of sparfloxacin. *British journal of clinical pharmacology* **49**, 609–612 (2000).

37. Kang, J., Wang, L., Chen, X. L., Triggle, D. J. & Rampe, D. Interactions of a series of fluoroquinolone antibacterial drugs with the human cardiac K<sup>+</sup> channel HERG. *Molecular pharmacology* **59**, 122–126 (2001).

38. Patmore, L., Fraser, S., Mair, D. & Templeton, A. Effects of sparfloxacin, grepafloxacin, moxifloxacin, and ciprofloxacin on cardiac action potential duration. *European journal of Pharmacology* **406**, 449–452 (2000).

39. Ball, P. Quinolone-induced QT interval prolongation: a not-so-unexpected class effect. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **45**, 557–9 (2000).

40. Goldstein, E. J. C. Possible role for the new fluoroquinolones (levofloxacin, grepafloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin, sparfloxacin, and DU-6859a) in the treatment of anaerobic infections: review of current information on efficacy and safety. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **23 Suppl 1**, 25–30 (1996).

41. Granneman, G. R., Carpentier, P., Morrison, P. J. & Pernet, A. G. *Pharmacokinetics of Temafloxacin in humans after single oral doses* **35**, 436 - 441 (1991).

42. Ajayi, F. O., Sun, H. & Perry, J. Adverse Drug Reactions: A Review of Relevant Factors. *The Journal of Clinical Pharmacology* **40**, 1093–1101 (2000).

43. Oliphant, C. M., Pharm, D. & Hershey, M. S. Quinolones : A Comprehensive Review. *American family physician* **65**, 455–464 (2002).

44. Bolon, M. K. The newer fluoroquinolones. *The Medical clinics of North America* **95**, 793–817 (2011).

45. Saravolatz, L. D. & Leggett, J. Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: The role of 3 newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **37**, 1210–1215 (2003).

46. Pestova, E., Millichap, J. J., Noskin, G. & Peterson, L. R. Intracellular targets of moxifloxacin: A comparison with other fluoroquinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **45**, 583–590 (2000).

47. Brighty, K. E. & Gootz, T. D. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **39 Suppl B**, 1–14 (1997).
48. Hsiao, C. J., Younis, H. & Boelsterli, U. A. Trovafloxacin, a fluoroquinolone antibiotic with hepatotoxic potential, causes mitochondrial peroxynitrite stress in a mouse model of underlying mitochondrial dysfunction. *Chemico-biological interactions* **188**, 204–13 (2010).
49. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use. Public Statement on Trovan/Trovan IV/Turvel/Turvel IV - Withdrawal of the marketing authorisations. EMEA/2335/01 (2001).
50. McCulley, J. P., Caudle, D., Aronowicz, J. D. & Shine, W. E. Fourth-generation fluoroquinolone penetration into the aqueous humor in humans. *Ophthalmology* **113**, 955–9 (2006).
51. Hwang, D. G. Fluoroquinolone resistance in ophthalmology and the potential role for newer ophthalmic fluoroquinolones. *Survey of ophthalmology* **49 Suppl 2**, S79–S83 (2004).
52. Comstock, T., Morris, T., Gearinger, L. & DeCory, H. Clinical outcomes with besifloxacin ophthalmic suspension 0.6% in the treatment of bacterial conjunctivitis due to potentially consequential pathogens. *Dove press journal - Clinical Optometry* **6**, 25–35 (2014).
53. Mather, R., Karenchak, L. M., Romanowski, E. G. & Kowalski, R. P. Fourth Generation Fluoroquinolones: New Weapons in the Arsenal of Ophthalmic Antibiotics. *American Journal of Ophthalmology* **133**, 463–466 (2002).
54. Bischoff, U., Schmidt, C., Netzer, R. & Pongs, O. Effects of fluoroquinolones on HERG currents. *European journal of pharmacology* **406**, 341–343 (2000).
55. Cabot, J. M., Fuguet, E. & Roses, M. (In press) Internal Standard Capillary Electrophoresis as a High Throughput Method for pKa Determination in Drug Discovery and Development. *ACS combinatorial science* (2014). DOI: 10.1021/co500059p.
56. Valko, K. & Reynolds, D. P. High-Throughput Physicochemical and In Vitro ADMET Screening *A Role in Pharmaceutical Profiling* **3**, 83–100 (2005).
57. Sanz-Nebot, V. & Valls, I. Acid-base behavior of quinolones in aqueous acetonitrile mixtures. *Acta Chemica Scandinavica* **51**, 896–903 (1997).
58. Chapman, J. S. & Georgopapadakou, N. H. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **32**, 438–42 (1988).
59. Piddock, L., Jin, Y. & Griggs, D. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**, 261–270 (2001).
60. Luciano, J. et al. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: De Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. *Revista virtual de Química* **1**, 227–240 (2009).
61. Miyamoto, T. et al. Synthesis and structure-activity relationships of 5-substituted 6,8-difluoroquinolones, including sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent with improved potency. *Journal of medicinal chemistry* **33**, 1645–1656 (1990).

62. Rusu, A. et al. Triprotic site-specific acid-base equilibria and related properties of fluoroquinolone antibacterials. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **66**, 50–57 (2012).
63. Takács-Novák, K. et al. Protonation equilibria of quinolone antibacterials. *Journal of pharmaceutical sciences* **79**, 1023–1028 (1990).
64. Park, H.R., Kim, T. H. & Bark, K. M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European journal of medicinal chemistry* **37**, 443–460 (2002).
65. Park, H., Chung, K. & Lee, H. Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **21**, 849–854 (2000).
66. Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M. & Estelrich, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **15**, 1845–9 (1997).
67. Lecomte, S., Baron, M. H., Chenon, M. T., Couprie, C. & Moreau, N. J. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**, 2810–2816 (1994).
68. Vázquez, J. L. et al. Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin: influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity. *International journal of pharmaceutics* **220**, 53–62 (2001).
69. Cheng, Y. et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: An in vitro study. *European journal of medicinal chemistry* **42**, 1032–1038 (2007).
70. Turel, I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews* **232**, 27–47 (2002).
71. Gootz, T. D. & Brighty, K. E. Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Medicinal research reviews* **16**, 433–86 (1996).
72. Lipinsk, C. Avoiding investment in doomed drugs, is poor solubility an industry wide problem. *Current Drug Discovery Technology* **4**, 17–19 (2001).
73. Chen, Z., Xiong, R., Zhang, J. & Chen, X. 2D molecular square grid with strong blue fluorescent emission: A complex of norfloxacin with zinc (II). *Inorganic Chemistry* **40**, 4075–4077 (2001).
74. Tarushi, A. et al. First- and second-generation quinolone antibacterial drugs interacting with zinc(II): Structure and biological perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry* **121**, 53–65 (2013).
75. Garrelts, J. C., Godley, P. J., Peterie, J. D., Gerlach, E. H. & Yakshe, C. C. Sucralfate significantly reduces ciprofloxacin concentrations in serum. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**, 931–3 (1990).
76. Mizuki, Y., Fujiwara, I. & Yamaguchi, T. Pharmacokinetic interactions related to the chemical structures of fluoroquinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **37 Suppl A**, 41–55 (1996).

77. Wolfson, J. S. & Hooper, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* **2**, 378–424 (1989).
78. Parpia, S. H. et al. Sucralfate Reduces the Gastrointestinal Absorption of Norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 99-102 (1989).
79. Wallis, S., Gahan, L., Charles, B. & Hambley, T. Synthesis and X-Ray Structural Characterization of an iron (III) complex of the fluoroquinolone antimicrobial ciprofloxacin, [Fe(CIP)(NTA)]<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O (nta = nitriloacetato). *Polyhedron* **14**, 2-7 (1995).
80. Martínez-martínez, L., Pascual, A. & Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**, 797–799 (1998).
81. Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews* **61**, 377–392 (1997).
82. Strahilevitz, J., Jacoby, G. a, Hooper, D. C. & Robicsek, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews* **22**, 664–689 (2009).
83. Aldred, K. J., Kerns, R. J. & Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53**, 1565–1574 (2014).
84. Menzel, R. & Gellert, M. Regulation of the genes for E. coli DNA gyrase: Homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**, 105–113 (1983).
85. Kampranis, S. C. & Maxwell, a. Conformational Changes in DNA Gyrase Revealed by Limited Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 22606–22614 (1998).
86. Hiasa, H. Mechanism of Quinolone Action. A drug induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 9401–9409 (1997).
87. De Sarro, A. & De Sarro, G. Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Current medicinal chemistry* **8**, 371–384 (2001).
88. Domagala, J. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **33**, 685–706 (1994).
89. Alanis, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research* **36**, 697–705 (2005).
90. Jacoby, G. a. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **41 Suppl 2**, 120–126 (2005).
91. Sousa, J., Alves, G., Fortuna, A. & Falcão, A. Third-and Fourth-generation Fluoroquinolone Antibacterials: A Systematic Review of Safety and Toxicity Profiles. *Current drug safety* **9**, 89-105 (2014).
92. Bron, N. J., Dorr, M. B., Mant, T. G., Webb, C. L. & Vassos, B. The tolerance and pharmacokinetics of clinafloxacin (CI-960) in healthy subjects. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **38**, 1023–1029 (1996).

93. Pouzaud, F. et al. In vitro discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: involvement of oxidative stress. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **308**, 394–402 (2004).
94. Ball, P. Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51 Suppl 1**, 21–27 (2003).
95. Etminan, M., Forooghian, F. & Brophy, J. Oral fluoroquinolones and the risk of retinal detachment. *The Journal of the American Medical Association* **13**, 1414-1419 (2012).
96. Pasternak, B., Svanström, H., Melbye, M. & Hviid, A. Association between oral fluoroquinolone use and retinal detachment. *The journal of the American Medical Association* **310**, 2184–2190 (2013).
97. Direção Geral de Saúde. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e Resistências aos Antimicrobianos Orientações Programáticas. (2013).
98. Gyssens, I. C. Quality measures of antimicrobial drug use. *International journal of antimicrobial agents* **17**, 9–19 (2001).
99. Goossens, H. European Strategies to Control Antibiotic Resistance and Use. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **17**, 1-8 (2014).
100. McGowan, J. E. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerging infectious diseases* **7**, 286–292 (2001).
101. Adriaenssens, N. et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe (1997-2009). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **66 Suppl 6**, 47–56 (2011).
102. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde IP./ Ministério da saúde. Prontuário Terapêutico **11**. 42-48 (2012).
103. Nasri Yaiche, M. et al. Type II and type IV topoisomerase mutations in clinical isolates of *Morganella morganii* harbouring the qnrD gene. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **13**, 34 (2014).
104. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M. & Nakamura, S. DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. *Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase gyrA Gene of Escherichia coli* **34**, 1271–1273 (1990).
105. Somasundaram, S. & Manivannan, K. An Overview of Fluoroquinolones. *Annual Review & Research in Biology* **3**, 296–313 (2013).
106. Yamane, K. et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 3354–3360 (2007).
107. Kim, H. Bin et al. oqxAB encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 3582–3584 (2009).
108. Schwarz, S., Kehrenberg, C. & Walsh, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International journal of antimicrobial agents* **17**, 431–437 (2001).

109. Ihrke, P., Papich, M. & Demanuelle, T. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology* **10**, 193–204 (1999).
110. Teuber, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology* **4**, 493–499 (2001).
111. Sarkozy, G. Quinolones: A class of antimicrobial agents. *Veterinary Medicine* **46**, 257–274 (2001).
112. Dibner, J. J. & Richards, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry science* **84**, 634–643 (2005).
113. Martinez, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution* **157**, 2893–2902 (2009).
114. Sturini, M. et al. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water research* **46**, 5575–5582 (2012).
115. Van Wieren, E. M., Seymour, M. D. & Peterson, J. W. Interaction of the fluoroquinolone antibiotic, ofloxacin, with titanium oxide nanoparticles in water: adsorption and breakdown. *The Science of the total environment* **441**, 1–9 (2012).
116. Robinson, A. a, Belden, J. B. & Lydy, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **24**, 423–430 (2005).
117. Aarestrup, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International journal of antimicrobial agents* **12**, 279–285 (1999).
118. Mugnaini, C., Pasquini, S. & Corelli, F. The 4-quinolone-3-carboxylic acid motif as a multivalent scaffold in medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry* **16**, 1746–1767 (2009).
119. Richter, S., Parolin, C., Palumbo, M. & Palù, G. Antiviral properties of quinolone-based drugs. *Current drug targets. Infectious disorders* **4**, 111–116 (2004).
120. Yamashita, Y., Ashizawa, T., Morimoto, M., Hosomi, J. & Nakana, H. Antitumor quinolones with mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage activity. *Cancer research* **52**, 2818–2822 (1992).
121. Eissenstat, M. & Kuo, G. 3-benzyl-quinolones: Novel, potent inhibitors of mammalian topoisomerase II. *Bioorganic & medicinal chemistry Letters* **5**, 1021–1026 (1995).
122. Wentland, M. P. et al. Mammalian topoisomerase II inhibitory activity of 1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(2,6-dimethyl-4-pyridinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid and related derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 2801–2809 (1993).
123. Advani, R. H. et al. Voreloxin, a first-in-class anticancer quinolone derivative, in relapsed/refractory solid tumors: a report on two dosing schedules. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 2167–2175 (2010).
124. Sunesis Pharmaceuticals, I. QINPREZO (Vosaroxin). Disponível em: <http://www.sunesis.com/products-in-development/product/QINPREZO.php>. Consultado a 19/09/2014

125. Takada, Y., Bhardwaj, A., Potdar, P. & Aggarwal, B. B. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* **23**, 9247–9258 (2004).
126. Suthar, S. K. et al. Novel quinolone substituted thiazolidin-4-ones as anti-inflammatory, anticancer agents: design, synthesis and biological screening. *European journal of medicinal chemistry* **63**, 589–602 (2013).
127. Balunas, M. J. & Kinghorn, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences* **78**, 431–441 (2005).
128. Sinha, S. et al. A new cytotoxic quinolone alkaloid and a pentacyclic steroidal glycoside from the stem bark of *Crataeva nurvala*: study of anti-proliferative and apoptosis inducing property. *European journal of medicinal chemistry* **60**, 490–496 (2013).
129. World Health Organization (WHO)-Tuberculosis. Fact sheet N°104 Reviewed March 2014 (2014).
130. Gomez, J. E. & McKinney, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* **84**, 29–44 (2004).
131. Lange, C. et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *The European respiratory journal* **44**, 23–63 (2014).
132. World Health Organization. Management of tuberculosis and HIV coinfection - Clinical Protocol for the WHO European Region. (2013).
133. American Thoracic Society CDC and Infectious Diseases Society of America MMWR. Centers for Disease Control and Prevention, Treatment of Tuberculosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **52**, (2003).
134. Guerrini, V. et al. New fluoroquinolones active against fluoroquinolones-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tuberculosis* **93**, 405–411 (2013).
135. Takiff, H. & Guerrero, E. Current prospects for the fluoroquinolones as first-line tuberculosis therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 5421–5429 (2011).
136. Ginsburg, A., Grosset, J. & Bishai, W. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet infectious diseases* **3**, 432–442 (2003).
137. Hagihara, M. et al. Synthesis and anti-HIV activity of arylpiperazinyl fluoroquinolones: a new class of anti-HIV agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **9**, 3063–3068 (1999).
138. Ohmine, T. et al. Anti-HIV-1 activities and pharmacokinetics of new arylpiperazinyl fluoroquinolones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **12**, 739–742 (2002).
139. Sato, M. et al. Quinolone carboxylic acids as a novel monoketo acid class of human immunodeficiency virus type 1 integrase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 4869–4882 (2009).

140. Shimura, K. & Kodama, E. N. Elvitegravir: A new HIV integrase inhibitor. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **20**, 79–85 (2009).
141. Sato, M. et al. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 1506–1508 (2006).
142. Wang, Z. & Vince, R. Synthesis of pyrimidine and quinolone conjugates as a scaffold for dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **18**, 1293–1296 (2008).
143. Shimura, K. et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *Journal of virology* **82**, 764–774 (2008).
144. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P./Ministério da Saúde. Relatório de avaliação prévia do medicamento para uso humano em meio hospitalar. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MAIS\\_NOVIDADES/DETALHE\\_NOVIDADE?itemid=9684507](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MAIS_NOVIDADES/DETALHE_NOVIDADE?itemid=9684507). Consultado a 19/09/2014
145. Gilead Submits New Drug Application to U.S. FDA for HIV Integrase Inhibitor Elvitegravir for Treatment- Experienced Patients. Disponível em: <http://www.gilead.com/news/press-releases/2012/6/gilead-submits-new-drug-application-to-us-fda-for-hiv-integrase-inhibitor-elvitegravir-for-treatmentexperienced-patients>. Consultado em 18/09/2014.
146. European Commission Approves Gilead's Vitekta™, an Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-1 Infection. 1–3 (2013). Disponível em: <http://www.gilead.com/news/press-releases/2013/11/european-commission-approves-gileads-vitekta-an-integrase-inhibitor-for-the-treatment-of-hiv1-infection>. Consultado a 21/09/2014.
147. New Drug Applications for Cobicistat and Elvitegravir for HIV Therapy Accepted by U.S. FDA. Disponível em: <http://www.gilead.com/news/press-releases/2014/4/gilead-sciences-new-drug-applications-for-cobicistat-and-elvitegravir-for-hiv-therapy-accepted-by-us-fda>. Consultado a 21/09/2014
148. World Health Organization. Hepatitis C. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Consultado a 21/09/2014
149. Hendricks, R. T. et al. Non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. Part 1: Synthetic and computational exploration of the binding modes of benzothiadiazine and 1,4-benzothiazine HCV NS5b polymerase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**, 3637–3641 (2009).
150. Pratt, J. K. et al. Inhibitors of HCV NS5B polymerase: synthesis and structure-activity relationships of N-1-heteroalkyl-4-hydroxyquinolon-3-yl-benzothiadiazines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **15**, 1577–1582 (2005).
151. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report. World Health Organization (2013).
152. Pidathala, C. et al. Identification, design and biological evaluation of bisaryl quinolones targeting Plasmodium falciparum type II NADH:quinone oxidoreductase (PfNDH2). *Journal of medicinal chemistry* **55**, 1831–1843 (2012).

153. World Health Organization. Guidelines of the treatment of Malária. 1–194 (2010).
154. Rodrigues, T. et al. Quinolin-4(1H)-imines are potent antiplasmodial drugs targeting the liver stage of malaria. *Journal of medicinal chemistry* **56**, 4811–4815 (2013).
155. Salzer, W., Timmler, H. & Andersag, H. A new type of compounds active against avian malaria. *Chemische Berichte* **81**, 12–19 (1948).
156. Nixon, G. L. et al. Targeting the mitochondrial electron transport chain of Plasmodium falciparum: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future medicinal chemistry* **5**, 1573–1591 (2013).
157. Duthey, B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias, Update on 2004. A Public Health Approach to Innovation 1 – 77 (2013).
158. Pudlo, M. et al. Quinolone-benzylpiperidine derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant hybrids for Alzheimer disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* **22**, 2496–2507 (2014).
159. Sadot, E. et al. Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates tau phosphorylation in transfected PC12 cells. *Journal of neurochemistry* **66**, 877–880 (1996).
160. Davie, B. J. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of analogues of benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) designed to bind irreversibly to an allosteric site of the M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of medicinal chemistry* **57**, 5405–5418 (2014).
161. Han, X. H. et al. Quinolone alkaloids from evodiae fructus and their inhibitory effects on monoamine oxidase. *Archives of pharmacal research* **30**, 397–401 (2007).
162. Lager, E. et al. 4-quinolone derivatives: high-affinity ligands at the benzodiazepine site of brain GABA A receptors. synthesis, pharmacology, and pharmacophore modeling. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 2526–2533 (2006).
163. Xiao, Z.-P. et al. Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone-flavonoid hybrids as potent antibiotics against drug-resistant microorganisms. *European journal of medicinal chemistry* **80**, 92–100 (2014).
164. Leclerc, G., Marciniak, G., Decker, N. & Schwartz, J. Cardiotonic agents. 1. Synthesis and structure-activity relationships in a new class of 3-, 4-, and 5-pyridyl-2(1H)-quinolone derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **29**, 2427–2432 (1986).
165. Leclerc, G., Marciniak, G., Decker, N. & Schwartz, J. Cardiotonic agents. 2. Synthesis and structure-activity relationships in a new class of 6-, 7-, and 8-pyridyl-2(1H)-quinolone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **29**, 2433–2438 (1986).
166. Abouzid, K., Abdel Hakeem, M., Khalil, O. & Maklad, Y. Pyridazinone derivatives: Design, synthesis, and in vitro vasorelaxant activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* **16**, 382–389 (2008).
167. The Pharmaletter. “No Chage” On Boots Pharma. Disponível em: <http://www.thepharmaletter.com/article/no-change-on-boots-pharma>. Consultado a 22/09/2014

168. The Pharmaletter. Manoplax defeated but Boot shares rally. Disponível em: <http://www.thepharmaletter.com/article/manoplax-defeated-but-boots-shares-rally>. Consultado em 23/09/2014
169. Falotico, R. & Haertlein, B. Positive inotropic and hemodynamic properties of flosequinan, a new vasodilator, and a sulfone metabolite. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **14**, 412-418 (1989).
170. Smith, D. A. & Obach R. S. Metabolites and Safety: What Are the Concerns, and How Should We Address Them? *Chemical Research in Toxicology* **19**, 1570-1579 (2006)
171. Fura, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug Discovery Today* **11**, 133-142 (2006)
172. Kamali F. & Edwards C. Possible Role of Metabolite in Flosequinan-Related Mortality. *Clinical Pharmacokinetics* **29**, 396-403 (1995)
- 173 Zimmermann, N. et al. Mechanisms of the contractile effects of flosequinoxan. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **351**, 385-390 (1995)