

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



**Desenvolvimento de compostos híbridos baseados nos
farmacóforos peróxido e 8-aminoquinolina, como
candidatos para erradicação da malária**

Daniela Filipa Pintassilgo Miranda

MESTRADO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

Lisboa

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



**Desenvolvimento de compostos híbridos baseados nos
farmacóforos peróxido e 8-aminoquinolina, como
candidatos para erradicação da malária**

Daniela Filipa Pintassilgo Miranda

Dissertação orientada pela Professora Doutora Francisca Lopes

Dissertação apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2011

Aos meus pais

Agradecimentos

Na tentativa de não esquecer ninguém, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram durante estes dois últimos anos, sem as quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À Professora Doutora Francisca Lopes, pela orientação, dedicação, apoio e permanente disponibilidade. Pelos conhecimentos científicos transmitidos, críticas e sugestões, que contribuíram para a evolução do meu percurso académico.

Ao Professor Doutor Rui Moreira, por toda a orientação e apoio científico demonstrado durante a realização desta dissertação.

À Professora Rosário Bronze e Dr. João Ferreira, do laboratório de espectrometria de massa.

À Rita Capela, um agradecimento especial pelos conhecimentos teóricos e experimentais transmitidos, pela constante boa disposição, apoio, paciência, presença e amizade, tanto a nível profissional como pessoal.

À Professora Emília Valente, pelos conhecimentos transmitidos, carinho e alegria.

Ao Sr. Francisco, que se mostrou sempre prestável para ajudar nas questões relacionadas com o material, produtos e equipamento.

Aos colegas de mestrado e laboratório, pelo apoio e todos os momentos de boa disposição que deram animo aos dias de trabalho, ao Daniel Gonçalves, ao Fábio Santos, à Ana Newton, ao Ricardo Ferreira, ao Rudi Oliveira, à Marta Magalhães e à Marisa Nogueira.

À Vanessa Cabral, à Cátia Vieira e à Ana Neca pela grande amizade, motivação, apoio e presença constante nos bons e nos maus momentos.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos Tiago e Cláudia agradeço a motivação, compreensão, tolerância e amor, sem os quais a obtenção deste grau não teria sido possível. À minha querida avó Elvira, pela constante preocupação e palavras de conforto.

Às minhas amigas e amigos, em especial à Andreia Silva, o meu muito obrigada pelo constante apoio, motivação, carinho e todos os momentos de amizade partilhados ao longo destes anos.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	IV
Índice de Esquemas	VII
Índice de Tabelas.....	IX
Resumo.....	X
Abstract	XI
Glossário de Símbolos e Abreviaturas.....	XII
Capítulo 1. Introdução	1
1.1 A Malária.....	2
1.1.1 Agente etiológico – género <i>Plasmodium</i>	3
1.1.2 Ciclo de Vida dos parasitas <i>Plasmodium</i>	3
1.1.3 Hemozoína – Pigmento da Malária.....	5
1.2 Fármacos antimaláricos.....	7
1.2.1 Endoperóxidos.....	8
1.2.1.1 Mecanismo de acção.....	13
1.2.1.2 Metabolismo.....	17
1.2.2 8-Aminoquinolinas.....	19
1.2.2.1 Mecanismo de acção.....	20
1.2.2.2 Metabolismo.....	21
1.2.2.3 Toxicidade.....	24
1.3 Compostos híbridos.....	26
1.4 Âmbito da tese.....	29
Capítulo 2. Síntese e Caracterização de novos compostos híbridos antimaláricos	32
2.1 Síntese do híbrido Artemisinina-Primaquina.....	33
2.1.1 Artemisinina (1).....	35
2.1.2 Di-hidroartemisinina (2).....	36

2.1.3 Derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60).....	40
2.1.4 Derivado ácido carboxílico (62).....	48
2.1.5 Derivado aldeído (59).....	50
2.1.6 Aminoação Redutiva: Composto híbrido ART-PQ (58).....	54
2.1.6.1 Primaquina Neutra (28).....	56
2.1.6.2 Composto híbridos ART-PQ (58).....	58
2.2 Síntese dos híbridos 1,2,4,5-Tetraoxanos – Primaquina.....	60
2.2.1 Derivado éster (72).....	61
2.2.2 Derivado ácido (67).....	63
2.2.3 Híbrido com função amida (66).....	64
2.2.4 Híbrido com função amina.....	66
2.2.4.1 Derivado hidroxamato (73)	66
2.2.4.2 Derivado aldeído (71)	66
2.2.4.3 Composto híbrido 70	67
Capítulo 3. Estabilidade e actividade dos compostos híbridos sintetizados	69
3.1 Ensaio de estabilidade	70
3.1.1 Análise cromatográfica por HPLC.....	70
3.1.2 Estabilidade química e metabólica dos compostos híbridos 58, 66 e 70.....	71
3.1.2.1 Estudo de estabilidade em tampão fosfato.....	71
3.1.2.2 Estudo de estabilidade em plasma humano.....	72
3.1.2.3 Estudo da estabilidade em homogenato de fígado de rato.....	72
3.1.2.4 Análise dos resultados obtidos.....	73
3.1.3 Análise dos metabolitos obtidos por espectroscopia de massa.....	75
3.2 Actividade antimalárica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos compostos híbridos.....	75
Capítulo 4. Conclusões	80
4.1 Conclusões Gerais.....	81
Capítulo 5. Procedimento Experimental	83
5.1 Reagentes e solventes.....	84
5.1.1 Reagentes.....	84
5.1.2 Solventes.....	84
5.2 Cromatografia.....	85

5.3 Equipamento.....	85
5.4 Procedimentos de síntese e caracterização dos compostos.....	86
5.4.1 Síntese do composto híbridos Artemisinina – Primaquina (58).....	86
5.4.1.1 Neutralização da primaquina comercial.....	86
5.4.1.2 Artemisinina (1).....	87
5.4.1.4 Di-hidroartemisinina (2).....	87
5.4.1.4 Di-hidroartemisinina 10 α -benzoato (61).....	88
5.4.1.5 C-10 β allildeoxoartemisinina (60).....	89
5.4.1.6 C-10 β ácido carboxílico artemisinina (62).....	90
5.4.1.7 C-10 β hidroxamato artemisinina (63).....	91
5.4.1.8 C-10 β aldeído artemisinina (59).....	92
5.4.1.9 Híbrido ART-PQ (58).....	92
5.4.2 Síntese de híbridos de tetraoxanos.....	93
5.4.2.1 Ester tetraoxano (72).....	93
5.4.2.2 Ácido tetraoxano (67).....	94
5.4.2.3 Híbrido com função amida (66).....	95
5.4.2.4 Derivado hidroxamato (73).....	96
5.4.2.5 Derivado aldeído (71).....	96
5.4.2.6 Híbrido com função amina (70).....	96
5.5 Estabilidade dos híbridos sintetizados.....	97
5.5.1 Estabilidade em tampão fosfato.....	97
5.5.2 Estabilidade em plasma humano.....	98
5.5.3 Estabilidade em homogenato de fígado de rato.....	98
Capítulo 6. Bibliografia.....	99
Capítulo 7. Anexos.....	106

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Mapa representativo das actuais áreas endémicas com Malária, a nível global. Imagem adaptada de: http://www.cdc.gov/ (Centers for Disease Control and Prevention – consultado em Julho 2011).....	2
Figura 1.2 - Ciclo de vida dos parasitas <i>Plasmodium</i> no homem e nos mosquitos <i>Anopheles</i> fêmea. Imagem adaptada de [8].....	4
Figura 1.3 - Figura ilustrativa do vacúolo digestivo do parasita. Sucintamente, o citoplasma da célula hospedeira é ingerido pelo citostoma do parasita e incluído em vesículas transportadoras com uma dupla membrana. A degradação da hemoglobina tem início nestas vesículas que se fundem com o vacúolo digestivo onde o processo de degradação é completado, ocorrendo a maturação dos micro-cristais até então formados, na estrutura característica da hemozoína. Adaptado de [11].....	6
Figura 1.4 - Representação esquemática da estrutura da hematina e respectivas interações químicas que ocorrem com formação da estrutura cristalina hemozoína. Adaptado de [14]... 6	6
Figura 1.5 – Aducto formado entre o grupo heme e a artemisinina.....	15
Figura 1.6 - Representação dos três modos de acção possíveis para as moléculas híbridas. Adaptado de [51].....	27
Figura 1.7 - Representação dos diferentes tipos de moléculas híbridas consoante o <i>linker</i> que as constitui. Adaptado de [54].....	28
Figura 2.1 - Análise retrossintética do composto híbrido 58	34
Figura 2.2 - Representação do espectro de ¹ H-RMN da Artemisinina (1).....	35
Figura 2.3 - Representação parcial do espectro de ¹ H-RMN do derivado di-hidroartemisinina (2). Os protões de cada isómero apresentam uma cor característica, nomeadamente: isómero 2α e isómero 2β	37
Figura 2.4 - Modelo 3D dos diastereoisómeros da DHART: 2α e 2β , respectivamente. Adaptado de [3].....	38
Figura 2.5 - Representação parcial do espectro bidimensional COSY da di-hidroartemisinina (2), evidenciando a interacção entre os protões em C ₉ e C ₁₀ . Os protões de cada isómero apresentam uma cor característica, nomeadamente: isómero 2α e isómero 2β	38
Figura 2.6 - Representação parcial do espectro bidimensional HMQC da di-hidroartemisinina (2), evidenciando a interacção dos protões em C ₁₀ ao respectivo átomo de C. Os protões de cada isómero apresentam uma cor característica, nomeadamente: isómero 2α e isómero 2β	39

Figura 2.7 - Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do derivado DHART 10 α -Benzoato (61).....	41
Figura 2.8 - Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60).....	45
Figura 2.9 - Diagrama representativo do acoplamento entre os prótons H_a em C_{14} e H_b e H_c em C_{15} da dupla ligação do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60).....	45
Figura 2.10 - Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60), evidenciando a interação entre os prótons em C_{10} , C_{13} e C_{14}	46
Figura 2.11 - Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do produto secundário AHA (64)	47
Figura 2.12 - Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado ácido carboxílico (62), evidenciando a interação entre os prótons em C_9 , C_{10} e C_{13}	49
Figura 2.13 - Diagrama representativo do acoplamento entre o próton $\text{H}_{13\alpha}$ e os prótons H_β em C_{13} e H_α em C_{10} , do derivado ácido carboxílico (62).....	50
Figura 2.14 - Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do derivado hidroxamato (63 , amida de Weinreb).....	53
Figura 2.15 - Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado aldeído (59), evidenciando a interação entre o próton em C_{10} e os prótons em C_{13}	53
Figura 2.16 - Representação do espectro de ^1H -RMN da primaquina na forma neutra (28)...57	
Figura 2.17 - Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido ART-PQ (58)....58	
Figura 2.18 - Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do composto híbrido ART-PQ (58). Encontram-se evidenciados os acoplamento dos prótons metilénicos do grupo $-\text{CH}_2$ do <i>linker</i> com os prótons em C_{13} na ART	59
Figura 2.19 - Análise retrossintética dos compostos híbridos 66 e 70	60
Figura 2.20 - Representação do espectro de ^1H -RMN do derivado éster tetraoxano (72).....	63
Figura 2.21 - Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido tetraoxano-PQ (66).....	65
Figura 2.22 - Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do composto híbrido tetraoxano-PQ (66), evidenciando as interações dos prótons ligados aos átomos de N na estrutura da PQ.....	65
Figura 2.23 - Representação do espectro de ^1H -RMN do derivado hidroxamato (73).....	66
Figura 2.24 - Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido final tetraoxano-PQ (70).....	67
Figura 2.25 - Representação parcial do espectro bidimensional HMBC do composto híbrido tetraoxano-PQ (70), evidenciando a interação entre os prótons metilénicos do grupo CH_2 <i>linker</i> com os prótons em C_4 na estrutura da PQ.....	68

- Figura 3.1** - Cromatogramas obtidos durante a realização do estudo de estabilidade do composto híbrido **66** em homogenato de fígado de rato..... 72
- Figura 3.2** - Correlação entre o ln área em função do tempo para a metabolização do composto **66** em homogenato de fígado de rato, a 37°C..... 73
- Figura 3.3** - Actividade determinada por estudos *in vitro* dos compostos **58**, **66** e **70** como esquinzontocidas tecidulares sobre o parasita *P. berghei*. Os compostos híbridos foram adicionados às células de hepatoma humano Huh7 cerca de 1h antes da infecção com a enzima luciferase expressando as formas parasitárias de esporozoítos. Uma quantidade de DMSO equivalente à concentração mais alta de composto testada foi usada como ensaio controlo. Passadas 46h a confluência celular (pontos a vermelho) foi determinada por fluorescência e o nível de infecção (barras) foi medido quantificando-se a actividade da enzima luciferase por luminescência. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.....77

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 – Mecanismo da interacção do ferro, presente no vacúolo digestivo, com a artemisinina (A) e derivados 1,2,4,5 tetraoxanos (B). Adaptado de [32a,32b]	14
Esquema 1.2 – Metabolismo (Fase I e II) do derivado arteeter. Adaptado de [33].....	18
Esquema 1.3 - Via metabólica proposta para a cadeia lateral da PQ. Adaptado de [41].....	22
Esquema 1.4 - Equilíbrio químico entre os derivados 38 e 39 . Adaptado de [40].....	23
Esquema 2.1 - Reacções químicas efectuadas de modo a obter o derivado aldeído (59). <u>Reagentes e condições:</u> i) NaBH ₄ , MeOH, 0°C; ii) BzCl, Piridina, DCM, 0°C; iii) aliltrimetilsilano, ZnCl ₂ , DCE, crivos moleculares, 0°C; iv) NaIO ₄ , KMnO ₄ , Acetona/H ₂ O; v) TBTU, TEA, DCM, N,O-dimetilhidroxilamina.HCl, t.a.; vi) a) LiAlH ₄ , THF, 0°C, b) KHSO ₄ (solução aquosa).....	34
Esquema 2.2 - Mecanismo da reacção de redução com NaBH ₄ , em meio prótico.....	36
Esquema 2.3 - Mecanismo de síntese do intermediário DHART 10 α -Benzoato (61).....	40
Esquema 2.4 - Representação esquemática das possíveis estruturas de ressonância do anel aromático presente no derivado DHART 10 α -Benzoato (61).....	42
Esquema 2.5 - Possível mecanismo de síntese de: a) intermediário C-10 β alildeoxoartemisinina (60), b) produto secundário AHA (64). Ambas as reacções são catalisadas pelo ácido de Lewis ZnCl ₂ . Adaptado de [5].....	44
Esquema 2.6 - Possível mecanismo de síntese do derivado 10-Carba da ART contendo o grupo funcional carboxila terminal (62), através da oxidação do derivado 60 com KMnO ₄ e NaIO ₄ . Adaptado de [7,8].....	48
Esquema 2.7 - Mecanismo proposto para a formação da amida de Weinreb 63 (intermediário hidroxamato) e síntese, por redução com LiAlH ₄ , do derivado aldeído 59 . Adaptado de [12,13].....	52
Esquema 2.8 - Mecanismo de síntese do composto híbrido final 58 por aminação redutiva entre o derivado aldeído (59) e PQ neutra (28), na presença de NaBH(OAc) ₃ como agente redutor. Adaptado de [15,16].....	55
Esquema 2.9 - Representação esquemática das possíveis estruturas de ressonância do anel quinolínico da PQ (28).....	57
Esquema 2.10 - Reacções químicas efectuadas na síntese dos compostos híbridos 66 e 70 . <u>Reagentes e condições:</u> i) HCO ₂ H, ACN, H ₂ O ₂ 50%, t.a.; ii) Re ₂ O ₇ , DCM, 2-adamantanona, t.a.; iii) NaOH 10M, MeOH, 80°C; iv) Primaquina difosfato, TBTU, TEA, DCM, 0°C; v)	

TBTU, TEA, DCM, N,O-dimetilhidroxilamina.HCl, t.a.; vi) a) LiAlH ₄ , THF, 0°C, b) KHSO ₄ (solução aquosa); vii) primaquina neutra, NaBH(CH ₃ COO) ₃ , CH ₃ CO ₂ H, DCM.....	61
Esquema 2.11 - Mecanismo proposto para síntese do derivado éster tetraoxano (72).....	62
Esquema 3.1 – Possível via de metabolização dos compostos híbridos 58 , 66 e 70 pelo citocromo p450, ao nível do fígado, com formação do metabolito carboxiprimaquina.....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Classificação dos compostos antimaláricos de acordo com a fase do ciclo infeccioso sobre a qual tem acção. Adaptado de [13].....	7
Tabela 1.2 – Actividade antimalárica, testada <i>in vitro</i> , dos compostos 14a-k, WR 148999 (13) e ART (1) contra estirpes de <i>P. falciparum</i> K1 e NF54. Adaptado de [30].....	12
Tabela 3.1 - Eluente escolhido e respectivos tempos de retenção obtidos para os compostos híbridos estudados. <u>Condições</u> : coluna RC18 250 × 4 mm, 5 µm, λ = 270 nm e fluxo de 1 ml/min.....	71
Tabela 3.2 - Valores das constantes de velocidade (k_{obs}) e tempos de semi-vida ($t_{1/2}$) calculados para os compostos 58, 66 e 70, com base nos resultados obtidos por HPLC em homogenato de fígado de rato, a 37°C.....	73
Tabela 3.3 – Actividade como esquizontocida sanguíneo, determinada <i>in vitro</i> , peso molecular e ClogP da artemisinina e dos compostos híbridos 58 , 66 e 70	76
Tabela 3.4 – Actividade dos compostos híbridos 66 e 70 no desenvolvimento do <i>Plasmodium berghei</i> ANKA em <i>Anopheles gambiae</i>	78

Resumo

Nesta dissertação foram sintetizados compostos híbridos baseados nos farmacóforos peróxido e 8-aminoquinolinas, como potenciais candidatos na erradicação da malária. Com esta abordagem pretendeu-se desenvolver novos compostos, capazes de actuar nas fases sanguínea e hepática do ciclo de vida do parasita, e na sua transmissão aos mosquitos vectores. Os híbridos sintetizados, formados por ligação da estrutura da primaquina à artemisinina (**58**) ou a compostos da classe dos 1,2,4,5-tetraoxanos (**66** e **70**), foram caracterizados por espectroscopia de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e técnicas bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC. Adicionalmente foram analisados por espectroscopia de massa de alta e baixa resolução e por análise elementar.

Foram realizados estudos de estabilidade em tampão fosfato pH 7,4, plasma humano e homogenato de fígado de rato a 37°C, os quais demonstraram que estes compostos eram bastante estáveis tanto em tampão fosfato pH 7,4 como em plasma humano. No entanto, em homogenato de fígado de rato sofreram degradação apresentando tempos de semi-vida entre 7 e 55 horas. Os compostos **58** e **70**, contendo um *linker* com função amina entre ambos os farmacóforos, evidenciaram uma reactividade substancialmente maior presumivelmente devido à maior susceptibilidade de oxidação metabólica que apresentam. Por espectroscopia de massa foi identificada a carboxiprimaquina como um dos metabolitos formados aquando da metabolização pelo citocromo P450.

A actividade antimalárica foi testada *in vitro* contra a fase sanguínea da estirpe de *Plasmodium falciparum* W2. Embora nenhum dos compostos híbridos apresente actividade superior à artemisinina, todos apresentam boa actividade antimalárica na ordem dos nanomolar. Adicionalmente foi testada a actividade contra a fase hepática onde todos mostraram actividade superior à da primaquina, nas concentrações mais altas testadas (5 e 10 µM). O único composto testado *in vivo* (**70**), como bloqueador da transmissão da doença em mosquitos da espécie *A. gambiae* infectados, mostrou ser tão activo quanto a primaquina na redução do número médio de oócitos e percentagem de mosquitos infectados, na maior concentração testada.

Em suma, desenvolveu-se uma nova classe de compostos híbridos com excelente actividade contra ambas as fases sanguínea e hepática da infecção e como bloqueadores da transmissão aos mosquitos vectores, o que indica que estes compostos podem ser considerados como *lead compounds* para a erradicação da malária.

Palavras-Chave: malária, compostos híbridos, artemisinina, primaquina, 1,2,4,5-tetraoxanos

Abstract

This work explores hybrid compounds based on peroxide and 8-aminoquinolines pharmacophores as potential candidates for malaria eradication. With this approach we sought to develop new chemical compounds able to act on the blood and liver stages of the parasite's life cycle, as well as on the disease transmission to mosquito vectors.

The hybrid compounds synthesized, containing a linker between the structure of primaquine and artemisinin (58) or 1,2,4,5-tetraoxanes (66 and 70), were characterized by IR spectroscopy, ¹H NMR, ¹³C-NMR techniques and two-dimensional COSY, HMQC and HMBC. Furthermore, these compounds were analyzed by high and low resolution mass spectroscopy and elemental analysis.

Stability studies were performed in pH 7.4 phosphate buffer, human plasma and rat liver homogenate at 37° C. The hybrid compounds proved to be very stable both in phosphate buffer pH 7.4 and in human plasma. However, in liver homogenate compounds showed some reactivity with half-lives ranging from 7 to 55 hours. The hybrid compounds 58 and 70, containing an amine functionality bridging the two pharmacophores, was substantially more reactive, most likely due to their greater susceptibility to metabolic oxidation. We identified carboxyprimaquine as one of metabolites formed during metabolism, via cytochrome P450.

Antimalarial activity was tested in vitro against the blood stage of Plasmodium falciparum W2 strain. Despite no compound has shown a greater activity than artemisinin, we found that all had good antimalarial activity at the nanomolar's range. Additionally was tested in vitro the activity against the liver stage of infection and all compounds showed greater activity than primaquine, on the highest concentrations tested (5 and 10 μM). The only compound tested in vivo (70) as disease transmission-blocking in infected mosquitoes of the species A. gambiae, proved to be as active as primaquine when reducing the average number of oocytes and the percentage of infected mosquitoes on the highest concentration tested.

In conclusion, we developed a new class of hybrid compounds displaying excellent level of activity against the blood- and liver-stages of infection and transmission-blocking activity, thus indicating that they can be considered lead compounds for malaria eradication.

Keywords: malaria, hybrid compounds, artemisinin, primaquine, 1,2,4,5-tetraoxanes

Glossário de Símbolos e Abreviaturas

DCE – dicloroetano

4-AQ – 4-aminoquinolinas

8-AQ – 8- aminoquinolinas

ACN - acetonitrilo

AcOH – ácido acético

ACT – terapia combinada à base de artemisinina (*Artemisinin-Combination Therapies*)

AHA - anidro-artemisinina

ART - artemisinina

CNS – sistema nervoso central

COSY - *CO*rrelation *S*pectroscopY

CPQ – carboxiprimaquina

CQ – cloroquina

¹³C-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de carbono

CYP – citocromo

DCM – diclorometano

DHA – di-hidroartemisinina

ED₅₀ – dose efectiva que produz metade da resposta

G6PD - glucose-6-fosfato-desidrogenase

GSH – glutationa

HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

HOBt – 1-hidroxibenzotriazole

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução (*Hight Performance Liquid Chromatography*)

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de protão

IC₅₀ – concentração inibitória 50%

IV – espectroscopia de infra-vermelho

J – constante de acoplamento

K_i – constante de inibição

kobs – constante de velocidade de reacção de pseudo-primeria ordem

m/z - razão entre massa e carga do ião

NOESY - *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

OMS – organização mundial de saúde

PBS - tampão fosfato isotónico (*Phosphate Buffer Saline*)

PfATP6 – ATPase dependente de cálcio do parasita *Plasmodium*

ppm – parte por milhão

PQ - primaquina

R_f – factor de retenção

ROS – espécies reactivas de oxigénio

SERCAs - ATPases envolvidas no transporte de Ca^{2+} ao nível do retículo sarcoplasmático

SIDA – síndrome de imunodeficiência adquirida

$t_{1/2}$ – tempo de semi-vida

TBTU - O-(1H-benzotriazol-1-il)- N,N,N',N'-tetrametilurónio

TEA – trietilamina

TLC – cromatografia de camada fina

t_r – tempo de retenção

UV-Vis – ultravioleta-visível

Capítulo 1

Introdução

1.1 A Malária

Em consequência do enorme impacto social e económico que a malária tem sobre os indivíduos infectados, esta doença é apontada como um dos grandes obstáculos ao desenvolvimento humano na maioria dos países subdesenvolvidos.^[1] Globalmente, e de acordo com a OMS, ameaça cerca de 3,3 mil milhões de pessoas, afectando mais de 40% da população mundial.^[2] Anualmente, estima-se o aparecimento de cerca de 250 milhões de novos casos (225 milhões relatados em 2009) e perto de 1 milhão de mortes.^[2,3,4]

Ao longo das últimas décadas inúmeros esforços têm sido feitos na tentativa de erradicar a malária. Contudo, e embora algum sucesso se tenha verificado sobre largas áreas geográficas, o continente africano continua a ser o foco de infecção primordial, onde se registam mais de 80% dos casos. Nesta região cerca de 20% da taxa de mortalidade infantil deve-se aos efeitos severos provocados pela manifestação da doença, ocorrendo a morte de uma criança a cada 30 segundos.^[2,4] Áreas endémicas adicionais descritas na literatura passam pela América Central e do Sul, Ilha Hispaniola (Haiti e Republica Dominicana), Jamaica, Ásia, Europa Ocidental e região sul do Pacífico (Figura 1.1).^[4] Das 781 000 mortes relatadas pela OMS em 2009, estima-se que 91% dos casos tenham ocorrido no continente africano, seguindo-se o Sudoeste Asiático (6%) e algumas regiões do Mediterrâneo Oriental (2%). A nível global, 85% dos casos de morte ocorreram em crianças com idade inferior a 5 anos.^[3]



Figura 1.1

Mapa representativo das actuais áreas endémicas com Malária, a nível global. Imagem adaptada de: <http://www.cdc.gov/> (Centers for Disease Control and Prevention – consultado em Julho 2011).

1.1.1. Agente etiológico – género *Plasmodium*

A malária tem como agente etiológico o parasita protozoário do género *Plasmodium*, transmitido aos humanos via picada de mosquitos *Anopheles* fêmea. Uma vez hospedado no homem este agente é responsável pela infecção dos glóbulos vermelhos, após extensa multiplicação ao nível do fígado.^[2]

Actualmente, conhecem-se mais de 400 espécies de *Plasmodium*. Contudo, apenas cinco são responsáveis pela transmissão da doença ao homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Ocasionalmente outras espécies podem ainda ser responsáveis pelos casos de malária detectados.^[1,5,6] Das cinco espécies de *Plasmodium* referidas, o *P. falciparum* é a mais virulenta responsável por mais de 90% dos casos reportados globalmente.^[1,5] O *P. vivax*, normalmente identificado em áreas fora do continente africano, embora menos mortal é altamente incapacitante pelos efeitos severos que provoca nas condições de vida dos indivíduos infectados. Tal como o *P. ovale*, esta espécie tem a capacidade de entrar num estágio de latência sob a forma de hipnozoítos, no fígado, durante meses após infecção, facto que torna difícil a sua erradicação. De modo semelhante, o *P. malariae* pode permanecer, durante décadas, assintomático na fase sanguínea.^[5]

É importante realçar que a enorme variedade de espécies de insecto *Anopheles*, associada à existência de diferentes espécies de *Plasmodium*, têm contribuído para uma variação global dos padrões epidemiológicos da malária. A título de exemplo relata-se o facto de os parasitas *P. vivax* serem capazes de se desenvolverem em mosquitos *Anopheles* em regiões de baixas temperaturas climáticas, contrariamente ao *P. falciparum*, o que conseqüentemente altera o seu alcance geográfico (predominantemente fora de regiões tropicais e subtropicais).^[5,6]

1.1.2. Ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium*

Todas as espécies *Plasmodium* apresentam duas formas de replicação durante o seu ciclo de vida - a fase assexuada, que ocorre no hospedeiro humano, e a fase sexuada que se desenvolve nos mosquitos *Anopheles* (Figura 1.2).^[7]

O ciclo infeccioso no homem (Figura 1.2, **a**) inicia-se com a picada de um mosquito fêmea infectado e conseqüente inoculação do parasita, presente nas glândulas salivares sob a forma de esporozoítos (1). Uma vez na circulação sanguínea do hospedeiro humano, o parasita invade o fígado (2) onde se multiplica originando esquizontes esféricos multinucleados que contêm entre 2.000 a 40.000 merozoítos. Esta fase é assintomática e apresenta um tempo de

incubação variável entre 5 - 21 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* infectante. Nos *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos entram num estado quiescente indeterminado que pode durar de meses a anos, designando-se estas formas celulares latentes de hipnozoítos.^[5,7,8]

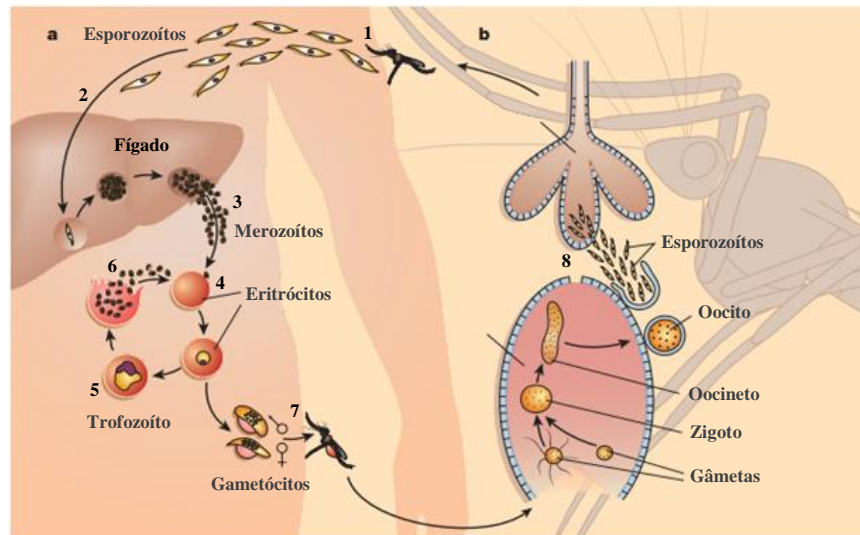


Figura 1.2

Ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium* no homem e nos mosquitos *Anopheles* fêmea. Imagem adaptada de [8].

Independentemente do tempo necessário para o completo desenvolvimento, os esquizontes maduros acabam por provocar o rompimento das células hepáticas, ocorrendo libertação na corrente sanguínea de milhares de merozoítos (3) que infectam os eritrócitos do hospedeiro - fase sanguínea (4). No interior dos eritrócitos estas células parasitárias sofrem extensas modificações morfológicas formando-se uma estrutura específica, o trofozoíto (5). Após replicação assexuada, o trofozoíto origina novos esquizontes que quando maduros causam ruptura dos eritrócitos com libertação de novos merozoítos na corrente sanguínea (6). Nesta fase da infecção cada esquizonte produz entre 8 - 20 merozoítos a cada 48h (ou 72h no caso do *P. malariae*). O rápido aumento do número de parasitas livres em circulação leva ao aparecimento dos primeiros sintomas característicos da doença: ciclos periódicos de febre. Alternativamente, alguns merozoítos transformam-se em gametócitos dimorficamente sexuais (feminino e masculino), entrando o parasita na fase sexuada do ciclo infeccioso. Os gametócitos não causam ruptura dos eritrócitos, o que possibilita a sua ingestão por um mosquito *Anopheles* durante a hemofagia (7).^[5,7,8]

No aparelho digestivo do novo hospedeiro (Figura 1.2, **b**) os gametócitos completam o seu desenvolvimento sexual em que os gâmetas masculinos e femininos se fundem originando o zigoto. Este durante o seu processo de desenvolvimento diferencia-se num oocineto móvel que penetra a parede do estômago do hospedeiro, originando depois um oocisto que, após extensas divisões, origina os esporozoítos. Estes promovem a ruptura da parede do oocisto e, uma vez livres em circulação, migram para as glândulas salivares do vector completando-se o ciclo infeccioso (8).^[7,8]

É importante realçar que decorrem cerca de 2 a 3 semanas desde que os mosquitos fêmeas são infectados até á completa maturação dos esporozoítos, capazes de infectar o homem. Durante este período de tempo estes insectos têm que se manter vivos para ocorrer transmissão da malária, facto importante a ter em consideração para medidas a tomar no controle da doença.^[7]

1.1.3. Hemozoína – Pigmento da Malária

Segundo a literatura disponível, em 1717 Lancisi fez a primeira associação entre a malária e a presença de um pigmento característico, de cor escura, nos órgãos dos indivíduos infectados. Este pigmento da malária, como ficou conhecido, permitiu em anos posteriores a identificação do mosquito vector *Anopheles*, pela sua presença no estômago destes insectos. A sua formação ocorre na fase sanguínea do ciclo infeccioso, resultando da metabolização da hemoglobina presente nos eritrócitos.^[9,10]

Durante o desenvolvimento do estado trofozoíto do parasita, cerca de 80% do citoplasma dos glóbulos vermelhos infectados é consumido e metabolizado, ocorrendo extensa degradação da hemoglobina presente nestas células.^[11,12] Este processo metabólico ocorre no vacúolo digestivo do parasita, embora se pense que seja iniciado nas vesículas transportadoras (Figura 1.3). Da digestão da hemoglobina resultam fragmentos de péptidos que são posteriormente hidrolisados a aminoácidos livres, necessários ao desenvolvimento do parasita. Adicionalmente é libertado o grupo prostético destas células – grupo heme (protoporfirina IX de ferro). Os possíveis danos provocado por este grupo são minimizados pela sua rápida oxidação de Fe(II) a Fe(III), com formação da hematina (Figura 1.4, a). Formam-se dímeros, β hematina, que polimerizam para formar a hemozoína (Figura 1.4, b). Embora ainda não se encontre totalmente esclarecido, aparentemente este é o mecanismo usado pelos parasitas *Plasmodium* como meio de destoxificação do grupo heme.^[10,11,13,14]

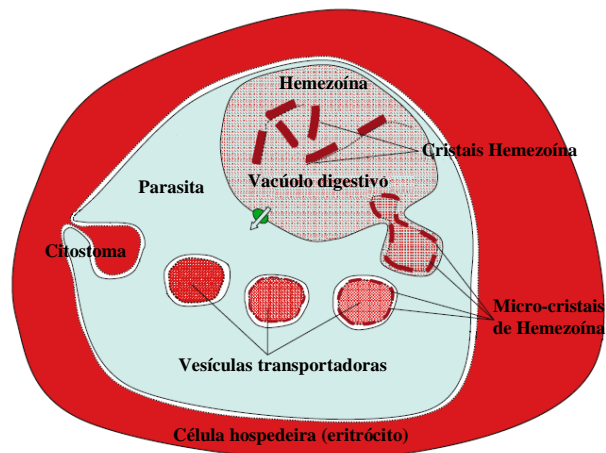


Figura 1.3

Figura ilustrativa do vacúolo digestivo do parasita. Sucintamente, o citoplasma da célula hospedeira é ingerido pelo citostoma do parasita e incluído em vesículas transportadoras com uma dupla membrana. A degradação da hemoglobina tem início nestas vesículas que se fundem com o vacúolo digestivo onde o processo de degradação é completado, ocorrendo a maturação dos micro-cristais até então formados, na estrutura característica da hemozoína. Adaptado de [11].

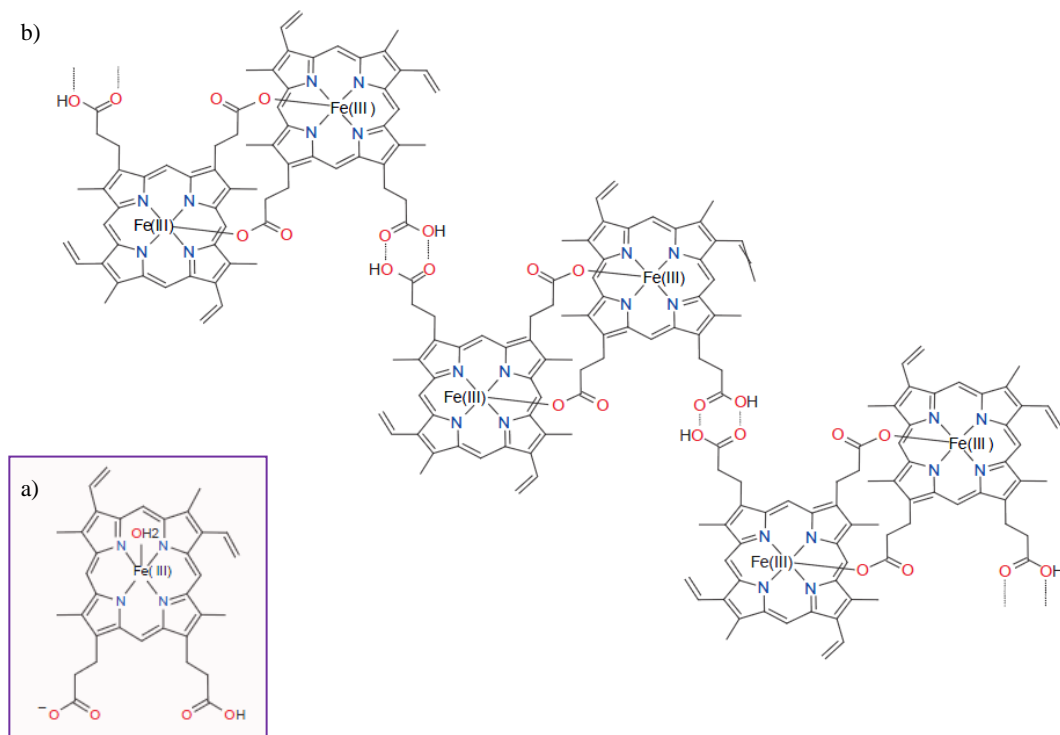


Figura 1.4

Representação esquemática da estrutura da hematina e respectivas interações químicas que ocorrem com formação da estrutura cristalina hemozoína. Adaptado de [14]

1.2. Fármacos antimaláricos

A expansão global da malária tem sido atribuída, maioritariamente, às falhas verificadas nos programas de controlo aplicados. Estes passam especificamente por tentativas de erradicação dos insectos vectores, desenvolvimento de uma vacina eficaz e desenvolvimento de novos fármacos. Adicionalmente, os casos de resistências aos fármacos tradicionais são cada vez mais frequentes tornando-se fundamental a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. As duas grandes abordagens que têm sido aplicadas no desenvolvimento de novas moléculas efectivas contra as estirpes resistentes consistem: i) no desenvolvimento de compostos análogos aos fármacos antimaláricos já existentes; ii) na identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de fármacos específicos que actuem ao nível destes.^[15,16]

Tradicionalmente, e de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita sobre a qual actuam, os compostos antimaláricos podem ser classificados como: i) esquizontocidas tecidulares primários ou fármacos profiláticos causais, quando actuam sobre as formas parasitárias pré-eritrocíticas; ii) esquizontocidas tecidulares secundários, se actuam sobre as formas parasitárias exo-eritrocíticas latentes das espécies *P. vivax* e *P. malariae* evitando os casos de recaídas; iii) esquizontocidas sanguíneos ou agentes supressores se actuarem nas formas assexuadas eritrocíticas das espécies *Plasmodium*; iv) gametocitocidas, cuja acção recai sobre as formas sexuadas do parasita; v) esporontocidas, quando inibem o desenvolvimento das formas esporogénicas no mosquito vector evitando a transmissão da doença ao hospedeiro humano (Tabela 1.1).^[17]

Tabela 1.1

Classificação dos compostos antimaláricos de acordo com a fase do ciclo infeccioso sobre a qual tem acção. Adaptado de [13]

Classificação	Compostos antimaláricos
Esquizontocida tecidular	Primaquina, pirimetamina, sulfonamidas
Esquizontocida sanguíneo	Cloroquina, mefloquina, quinina, halofantrina, artemisinina Pirimetamina, sulfonamidas, sulfonas, outros antibioticos, atovaquona
Gametocitocida	Primaquina para os parasitas <i>P.falciparum</i> Quinina para os parasitas <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. ovale</i>
Esporontocida	Primaquina, cloroquina

Embora a grande maioria dos fármacos antimaláricos actue ao nível das formas parasitárias intra-eritrocíticas, as fases hepática e de gametócios constituem alvos específicos vantajosos que devem ser igualmente considerados.^[18] A descoberta de compostos activos capazes de actuar em ambas as fases hepática e sanguínea do ciclo de vida do parasita continua a ser algo desejável mas de pouco conhecimento até ao momento.

1.2.1. Endoperóxidos

Os endoperóxidos são uma classe promissora de compostos antimaláricos que engloba o fármaco artemisinina e duas sub-classes: i) os endoperóxidos semi-sintéticos, isto é, os derivados sintetizados a partir da artemisinina, e ii) os endoperóxidos sintéticos, que correspondem a todos os compostos sintéticos com função peroxídica.^[19]

De um modo geral, os endoperóxidos apresentam inúmeras vantagens quando comparados com outros agentes antimaláricos: i) eliminação mais rápida da parasitemia, relativamente a outros fármacos; ii) ausência de casos de resistência reportados apesar de terem um uso clínico difundido (após 42 anos desde a sua descoberta com antimalárico ainda não surgiram evidências clínicas significativas de estripes resistentes); iii) pouca ou nenhuma resistência cruzada com outros compostos antimaláricos.

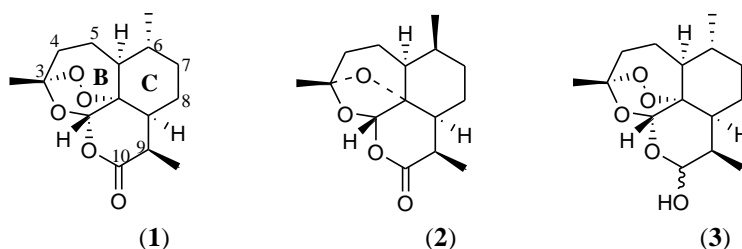
Por outro lado, uma das maiores desvantagens associada a esta classe de compostos baseia-se no reduzido tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) que geralmente apresentam, o que pode promover o reaparecimento da infecção. Adicionalmente, devido à sua lipofilia, a artemisinina e derivados apresentam a capacidade de atravessar ambas as barreiras hematoencefálica e placentária. Por isto, alguns estudos apontam para os potenciais efeitos neurotóxicos e embriotóxicos destes compostos. Contudo, administrações por via oral dos análogos artesunato e arteméter têm-se verificado relativamente seguras e apesar das evidências pré-clínicas, inúmeras doses em várias formulações desta classe de agentes antimaláricos têm sido administradas aos humanos sem a ocorrência de casos significativos de toxicidade.^[19,20,21,22]

A artemisinina, ART ou Qinghaosu, é um endoperóxido sesquiterpénico descoberto por cientistas chineses, em 1970. Este composto extraído das folhas da planta *Artemisia annua* (qinghao) apresenta uma estrutura química totalmente diferente dos tradicionais compostos

antimaláricos, tendo demonstrado por isso elevado potencial no tratamento de casos multirresistentes. Esta característica, associada ao seu baixo rendimento de extracção (por cada 1kg de folhas isolam-se 8g de composto) estimulou inúmeros cientistas, em todo o mundo, para a descoberta da sua síntese química. Como resultado, foi reportado a sua semi-síntese a partir do ácido artemisínico e, mais tarde em 1983, o método completo de síntese.^[23,24]

Após a descoberta da artemisinina (1), vários derivados foram sintetizados, muitos dos quais se encontram hoje em uso clínico. Este fármaco consiste quimicamente numa lactona sesquiterpénica que contém como farmacóforo uma ponte peroxídica (1,2,4-trioxano) essencial á sua actividade. É uma molécula extremamente termoestável, que apresenta pouca solubilidade tanto em água como em óleo, razão pela qual apenas é administrada por via injectável.^[19,24-21]

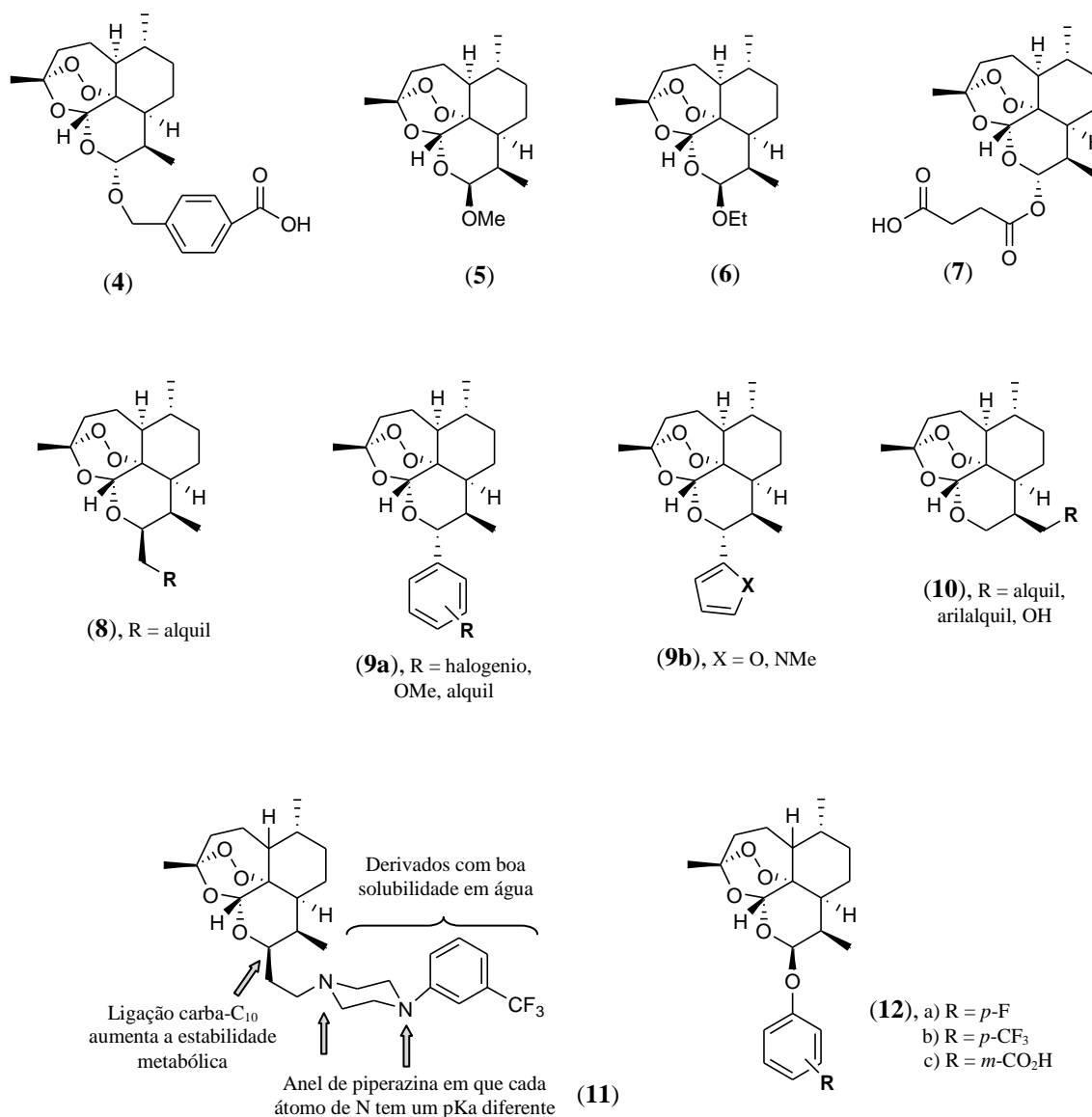
A artemisinina é facilmente reduzida por hidrogenação catalítica, obtendo-se o derivado deoxiartemisinina (2) que não apresenta actividade antimalárica. Contudo, e contrariamente a redução da lactona presente na sua estrutura química e conseqüente conversão num lactol origina o derivado di-hidroartemisinina (3) que apresenta *in vitro* actividade superior. Esta reacção é promovida pelo agente reductor NaBH_4 e representa o ponto de partida no desenvolvimento de derivados de primeira geração.^[25]



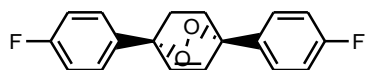
Por modificações específicas em C_{10} foi possível melhorar algumas propriedades químicas da artemisinina (1) desenvolvendo-se derivados mais hidrossolúveis - artesunato (4) - ou mais lipossolúveis - arteméter (5) e arteeter (6). Estes dois últimos compostos são administrados por via intramuscular, e embora tenham actividade antimalárica superior apresentam tempos de semi-vida inferiores em plasma e evidências de toxicidade ao nível do CNS, quando testados em ratos e cães.^[11,24,21] Para o tratamento da malária severa, causada pelo *P. falciparum*, a administração intravenosa de fármacos é a via preferencial. Assim formulações solúveis em água são vantajosas, como é o caso do sal de sódio do ácido artesúnico, o

fármaco actualmente escolhido de entre os referidos derivados. Para colmatar a instabilidade hidrofílica do artesunato desenhou-se o sal de sódio do ácido artelinico (7). Comparativamente a 5 e 6, este sal é não só mais estável em solução aquosa como apresenta um $t_{1/2}$ superior, variável entre 1,5h e 3h.^[11,26]

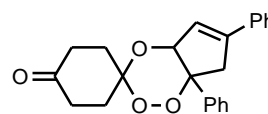
Devido à sua rápida conversão em DHA, inúmeros análogos semi-sintéticos da artemisinina mais estáveis e potentes têm surgido nos últimos anos. Destes destacaram-se os derivados carba- C_{10} (8), aril/heteroaril- C_{10} (9a e b) e C_{14} modificados (10) da DHA. Estudos que datam o ano de 2002 permitiram comparar o análogo carba- C_{10} TDR 40292 (11) com os derivados arteméter e artesunato. Concluiu-se que este composto não só apresenta actividade superior, quer *in vitro* quer *in vivo*, como é mais estável e não é metabolizado a DHA. A substituição do grupo metilo do arteméter por um grupo arilo originou os derivados 12 a-c, nos quais substituintes nas posições *para* do anel aromático favorecem a sua actividade e hidrólise ao metabolito DHA.^[11]



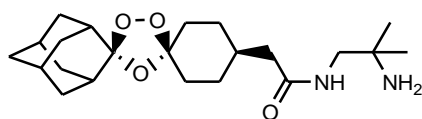
A ART e derivados semi-sintéticos, obtidos por via natural, têm um fornecimento limitado a partir da planta *Artemisia annua*. Este facto afecta a sua disponibilidade, a qual não é suficiente para cobrir todos os casos de malária espalhados pelo mundo. Assim, iniciou-se a tentativa de síntese e exploração de novos derivados sintéticos, substitutos da ART, baseados no farmacóforo 1,2,4-trioxano.^[24] Actualmente, é possível distinguirem-se quatro tipos de endoperóxidos sintéticos os quais diferem na estrutura do farmacóforo que contêm: 1,2-dioxanos (**13a**), 1,2,4-trioxanos (**13b**), 1,2,4-trioxolanos (**13c**) e 1,2,4,5-tetraoxanos (**13d**). Estes derivados apresentam um mecanismo de acção semelhante ao da ART e, normalmente, apresentam uma actividade antimalárica na ordem dos nanomolares.^[27-28]



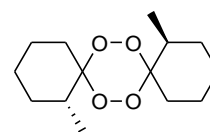
(**13a**) $IC_{50} = 70$ nM (NF54)



(**13b**) $IC_{50} = 28$ nM (Nigerian)

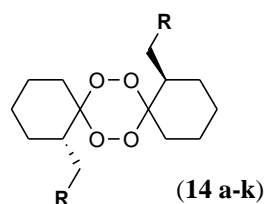


(**13c**) $IC_{50} = 1$ nM (K1), 0,91 nM (NF54)



(**13d**) $IC_{50} = 6,9$ nM (D6), 3,4 nM (W2)

A síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos teve início no ano de 1992, quando Vennerstorm e os seus colaboradores desenvolveram três compostos desta classe. Quando testada a sua actividade antimalárica apenas o derivado WR 148999 (**13d**) demonstrou ser tão potente quanto a artemisinina, tornando-se o protótipo para a síntese de novos compostos. Estudos posteriores com base neste farmacóforo revelaram que a presença de um grupo alceno (**14a**), alcino (**14b**) e éter (**14j** e **14k**) mantinham ou aumentavam a actividade antimalárica, contrariamente aos grupos ácido carboxílico (**14f** e **14g**) e álcool (**14h**) que diminuíam a potência dos derivados. A baixa actividade *in vivo* demonstrada pelos derivados éster concluiu-se ser consequência da hidrólise química ou enzimática destes compostos aos respectivos ácidos carboxílicos, que por sua vez são inactivos.^[27,29,30]



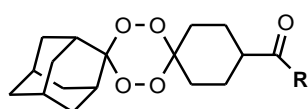
(**14 a-k**)

Tabela 1.2

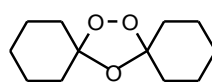
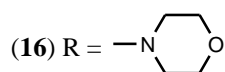
Actividade antimalárica, testada *in vitro*, dos compostos **14a-k**, **13d** e ART (**1**) contra estirpes de *P. falciparum* K1 e NF54. Adaptado de [30]

Composto	R	IC50 (nM)	
		K1	NF54
14a	HC=CH ₂	19	23
14b	C≡CH	13	13
14c	C ₆ H ₅	> 200	> 200
14d	CH ₂ COOEt	14	16
14e	COOC ₂ H ₅	6,2	6,5
14f	CH ₂ COOH	> 200	> 200
14g	COOH	> 200	> 200
14h	OH	> 200	> 200
14i	OCOC ₆ H ₅	> 200	> 200
14j	OCH ₃	15	16
14k	OCH ₂ C ₆ H ₅	18	26
WR 148999 (13)	-	28	39
ART (1)	-	10	12

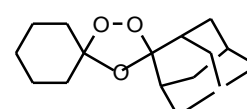
De modo a aumentar a solubilidade dos compostos em meio aquoso sintetizaram-se tetraoxanos assimétricos com grupos funcionais básicos, como aminas e amidas. Adicionalmente, testou-se a introdução do grupo adamantilo obtendo-se os compostos **15** e **16**. Quando testada a actividade de ambos os compostos contra estirpes de *P. falciparum* 3D7 sensíveis à cloroquina obtiveram-se, respectivamente os valores de IC₅₀: 2,3 nM e 5,2 nM. Os resultados observados comprovaram que, tal como obtido para os derivados 1,2,4-trioxanos (**17** e **18**), estas modificações aumentavam a estabilidade e actividade antimalárica. Por comparação com o arteméter (**5**, ED₅₀ = 5.88 mg kg⁻¹ e ED₉₀ = 10.57 mg kg⁻¹), obtiveram-se ainda melhores valores de ED em *P. berghei* para o derivado **16**: ED₅₀ = 3.18 mg kg⁻¹ e ED₉₀ = 3.88 mg kg⁻¹.^[27,31] Resultados semelhantes e igualmente bons foram obtidos para outros compostos deste tipo posteriormente sintetizados: **19** com ED₅₀ = 6.61 mg kg⁻¹ e **20** com ED₅₀ = 7.93 mg kg⁻¹.^[31]



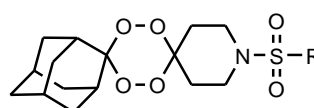
(15) R = HN-



(17) Inactivo



(18) Potente e mais estável



(19) R = Et

(20) R = Pr

1.2.1.1. Mecanismo de acção

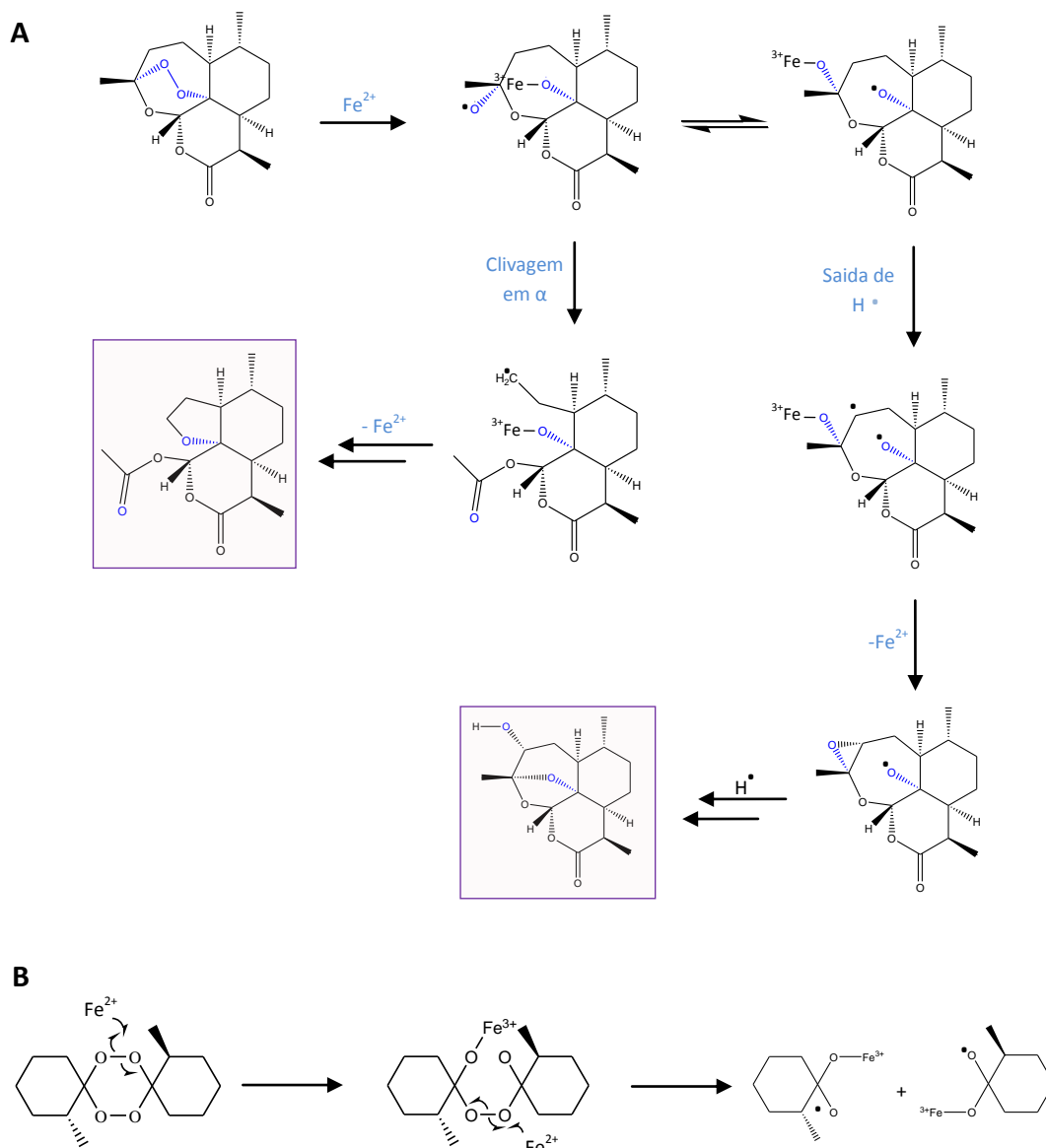
O mecanismo de acção da artemisinina e derivados tem sido alvo de estudos intensivos desde a sua descoberta. Concretamente, sabe-se que os compostos incluídos nesta classe actuam sobre todas as espécies de *Plasmodium* capazes de infectar os humanos, tendo-se relatado valores de IC_{50} de 4,2 nM para o artesunato (4), 4,3 nM para a di-hidroartemisinina (3) e 16,2 nM para o arteméter (5). As formas parasitárias assexuadas são as mais susceptíveis, sendo estes agentes particularmente activos sobre as estruturas metabolicamente activas, os trofozoítos, durante todo o seu processo de maturação. Adicionalmente actuam sobre a fase inicial do desenvolvimento dos gametócitos, interferindo com a transmissão do parasita ao mosquito vector. Outra propriedade importante é o facto de inibirem o metabolismo dos parasitas de modo mais rápido que outros agentes antimaláricos usados no tratamento da doença. Dado que a maioria dos casos de morte verificados em crianças, no continente africano, ocorrem nas primeiras 12 a 24 horas após infecção, esta propriedade farmacodinâmica revela-se potencialmente benéfica.^[25,21,32]

Actualmente, são consideradas diversas hipóteses como possíveis mecanismos de acção, tais como: i) formação de radicais centrados nos átomos de oxigénio e carbono que interferem com a acção de inúmeras proteínas, podendo inclusivé actuar como agentes alquilantes e ii) inibição da proteína PfATP6.^[25]

➤ Formação de radicais centrados nos átomos de oxigénio e carbono:

O primeiro indício que permitiu propor um mecanismo de acção surgiu a partir de evidências de que a ponte peroxídica característica da estrutura química destes compostos, era fundamental para a sua actividade antimalárica. Meshnick e colaboradores propuseram, em 1991, que o átomo de Fe^{2+} presente no grupo heme da hemoglobina desencadeava a redução da ponte peroxídica com conseqüente quebra e formação de radicais centrados no átomo de oxigénio (Esquema 1.1). Uma vez formados estes radicais poderiam reagir com alvos intracelulares das células parasitárias, como proteínas e/ou lípidos, ou sofrer rearranjos (1,5-H shift) com formação de radicais centrados no átomo de carbono (Esquema 1.1).^[19,32,22,33]

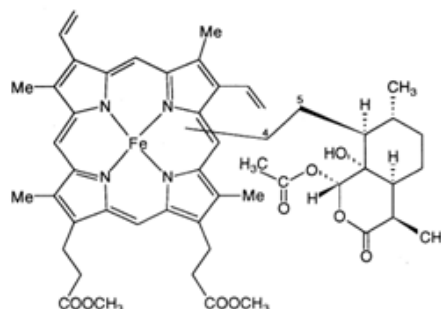
Anos mais tarde verificou-se experimentalmente que quantidades significativas destas espécies radicalares apenas eram obtidas quando testadas concentrações elevadas deste tipo de compostos ($> 100 \mu M$). Estes resultados puseram em causa esta hipótese para o mecanismo de acção uma vez que estes fármacos têm actividade a concentrações cerca de 1000 vezes inferiores às testadas.^[22,34]



Esquema 1.1

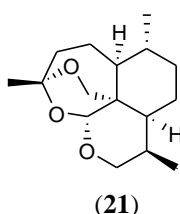
Suposto mecanismo da interacção do ferro, presente no vacúolo digestivo, com a artemisinina (**A**) e derivados 1,2,4,5 tetraoxanos (**B**). Ambos os compostos finais assinalados em **A** não apresentam actividade antimalárica. Adaptado de [32a, 32b].

Estudos posteriores sugeriram que a selectividade destes compostos poderia ser devida à formação de aductos covalentes entre a estrutura da artemisinina/derivados e componentes celulares do parasita, surgindo o grupo heme como um importante alvo de alquilação (Figura 1.5). Uma vez formados, estes aductos actuam inibindo a polimerização dos grupos heme resultantes da degradação da hemoglobina, ocorrendo assim acumulação de heme livre e aumento do stress oxidativo. [25,22,35]

**Figura 1.5**

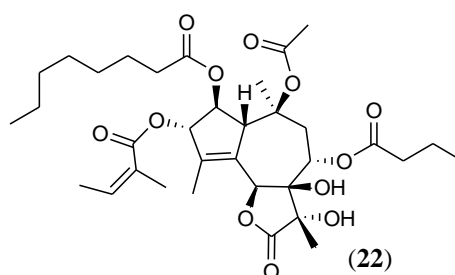
Aducto formado entre o grupo heme e a artemisinina.

Embora diversos estudos apontem esta hipótese como o mecanismo de acção destes compostos, há evidências na literatura que referem que estes aductos, quando desenvolvidos *in vitro* e testada a sua acção em células eritrocíticas infectadas, não apresentam qualquer actividade antimalária. Adicionalmente, verificou-se experimentalmente que alguns derivados da artemisinina, com elevada actividade, não reagem com o grupo heme (derivado 10-deoxoartemisinina, **21**), e conseqüentemente não interferem com a formação da hemozoína. Assim, coloca-se em causa se a inibição da formação desta estrutura se encontra ou não relacionada com a actividade antimalária destes compostos.^[32,36]

**(21)**

➤ Inibição da proteína PfATP6:

Outras hipóteses alternativas ao mecanismo de acção têm surgido nos últimos anos. A mais recente, e que tem sido alvo de intensos estudos experimentais, baseia-se nas semelhanças estruturais entre ambos os sesquiterpenos: artemisinina e taspigargina (**22**).^[32]



A tapsigargina é uma lactona sesquiterpénica isolada da planta *Thapsia garganica*, que actua numa vasta variedade de organismos, por inibição das ATPases envolvidas no transporte de Ca^{2+} ao nível do retículo sarcoplasmático (SERCAs). Este processo ocorre à custa de ATP. Nos parasitas *Plasmodium* foram identificadas Ca^{2+} -ATPase ortólogas às dos mamíferos – PfATP6 (*P. falciparum*), PvSERCA (*P. vivax*) e PbSERCA (*P. berghei*). Estudos experimentais desenvolvidos nos oócitos de *Xenopus laevis* demonstraram a sua inibição por alquilação com inúmeros derivados da artemisinina, tendo inclusive a artemisinina uma constante de inibição semelhante à tapsigargina ($K_i \sim 150$ nM). Adicionalmente, para confirmar que ambos os compostos sesquiterpénicos actuam de igual modo desenvolveram-se estudos de competição: se a tapsigargina e a artemisinina interagem da mesma maneira com o alvo de acção, quando administrados em simultâneo é esperada a ocorrência de processos competitivos. Tais especulações teóricas foram experimentalmente comprovadas.^[24,32,36,37]

Contudo, inúmeras questões acerca deste possível mecanismo continuam por esclarecer, nomeadamente o local específico com o qual estes compostos interagem aquando da inibição destas enzimas, e as consequências celulares desta acção. Adicionalmente, um estudo recente relatado em 2010 por Cardi *et al.* concluiu que não é possível demonstrar o efeito da artemisinina sobre a actividade da PfATP6, e que por isso a acção deste composto sobre o parasita da malária é provavelmente mais complexa do que se pensava.^[24,37]

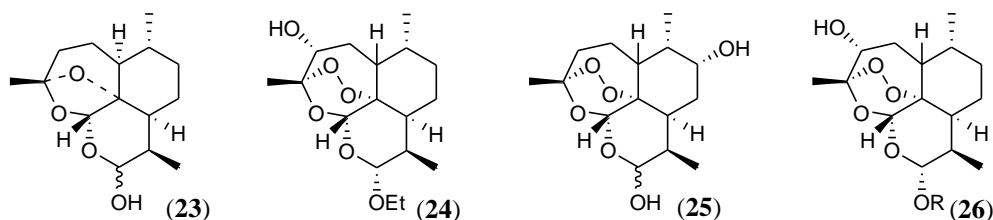
Em suma, e apesar das inúmeras hipóteses que continuam a surgir, actualmente ainda permanecem desconhecidos o verdadeiro alvo e mecanismo de acção desta classe de compostos.

1.2.1.2. Metabolismo

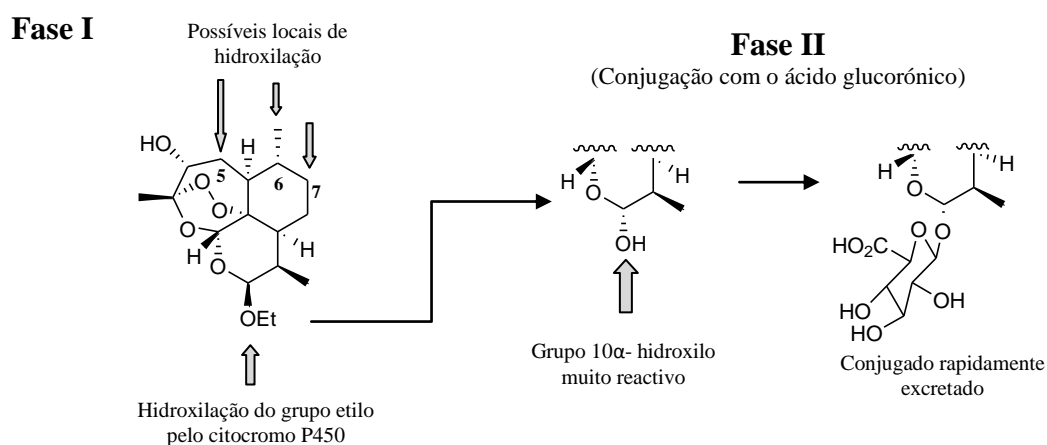
A artemisinina e derivados semi-sintéticos são extensivamente metabolizados no fígado, após administração. Uma vez absorvidos são convertidos pelo citocromo P450 na DHA - o principal metabolito activo da maioria dos análogos usados clinicamente. Devido à sua estrutura química, este composto sofre posteriormente conjugação com o ácido glucorónico durante a fase II do metabolismo, originando metabolitos inactivos que são rapidamente eliminados por excreção. O $t_{1/2}$ da DHA é cerca de 45 minutos e a velocidade de hidrólise dos derivados neste composto é variável. Enquanto o artesunato é rapidamente hidrolisado, sendo a sua actividade mediada pela DHA, os derivados lipossolúveis arteméter e arteeter apresentam menores velocidades de conversão contribuindo desta forma para a actividade farmacológica.^[11,21,38,32]

De modo a conhecer as vias metabólicas associadas a esta classe de compostos têm sido realizados diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Concretamente sabe-se que, enquanto a metabolização da artemisinina gera compostos inactivos como a deoxiartemisinina (**2**) e di-hidrodeoxiartemisinina (**23**), os derivados artesunato (**4**), arteméter (**5**) e arteeter (**6**) são rapidamente convertidos em vários metabolitos activos, de entre os quais se destaca a DHA (**3**). Na figura 2.6 encontram-se alguns dos possíveis metabolitos identificados (**24-26**), resultantes de hidroxilações catalisadas pelo citocromo P450. Especificamente identificou-se que os *CYP2B6*, *CYP2C19* e *CYP3A4* catalisam as reacções características da fase I do metabolismo, embora estejam igualmente envolvidas outras enzimas desta superfamília, ainda não identificadas^[19,33,39]

O *CYP3A4* encontra-se principalmente envolvido no metabolismo do derivado arteméter, catalisando a desalquilação oxidativa deste composto a DHA. Alguns dos metabolitos derivados das hidroxilações da artemisinina (**1**) nos anéis B e C apresentam boa actividade antimalárica, embora sejam rapidamente eliminados pelas reacções de fase II do metabolismo, com conversão em conjugados solúveis em água (Esquema 1.2).^[33]



É importante referir que, até à data, em todos os estudos de metabolismo realizados em mamíferos não se verificou inibição irreversível induzida pelos análogos da artemisinina no citocromo P450. Tais observações permitem concluir que o grupo heme destas enzimas não activa, por redução, estes compostos com formação de ROS que consequentemente poderiam alquilar e inibir estas proteínas. Assim, torna-se claro que o citocromo P450 catalisa hidroxilações e *O*-desalquilações, sem interagir com a ponte peroxídica.^[33]



Esquema 1.2

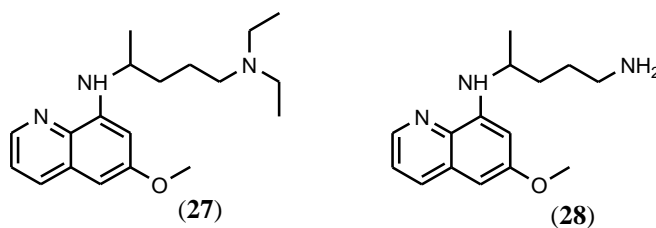
Metabolismo (Fase I e II) do derivado arteeter. Adaptado de [33].

A partir da realização de estudos experimentais, e após a administração por via oral da artemisinina a indivíduos saudáveis, verificou-se metabolização ao nível do fígado com um efeito de primeira passagem considerável. Os resultados obtidos permitiram concluir que a biodisponibilidade oral deste composto, comparativamente a uma suspensão intramuscular em óleo, é de apenas 32%. A eliminação destes compostos por via renal é insignificante. Adicionalmente, factores como o pH, enzimas presentes nos tecidos, sangue e fígado, e a via de administração afectam igualmente o metabolismo desta classe de compostos.^[33,20]

1.2.2. 8-Aminoquinolinas

Dos inúmeros compostos que fazem parte desta classe de antimaláricos destacou-se, em 1925, a Pamaquina (**27**). Sintetizado por um químico alemão, este fármaco mostrou-se activo contra os gametócitos do parasita, sendo capaz de prevenir o reaparecimento da doença em indivíduos infectados com *P. vivax* e bloquear a sua transmissão. Contudo, anos mais tarde revelou-se ser extremamente tóxico, causando o abandono do seu uso terapêutico.^[29,40-41]

Nos anos posteriores seguiu-se o desenvolvimento de compostos análogos mais seguros e menos prejudiciais que culminou na síntese da Primaquina (PQ, **28**), em 1946 nos Estados Unidos da América. A actividade deste fármaco foi extensivamente testada revelando ser o mais eficaz e com menor nível de toxicidade associado, quando comparado com outros compostos 8-AQ desenvolvidos. O seu uso como gametocitocida e esquizontocida tecidular combinado com o uso da cloroquina (CQ, 4-AQ), potente esquizontocida sanguíneo, e dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) como insecticida promoveram a erradicação da malária das regiões de clima subtropical e temperado no início dos anos 1960. Com base neste cenário, a comunidade científica e a indústria farmacêutica colocaram de parte a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos, mesmo sendo evidentes alguns problemas inerentes á terapia utilizada. Em 1980, devido ao aquecimento global e ao aumento dos casos de migração/turismo, voltaram a ser reportados casos de malária nas regiões anteriormente referidas.^[40,41]



Usada com elevado sucesso durante as ultimas décadas, a PQ continua a combater a malária por três formas distintas: i) profilaxia, contra todas as espécies do parasita, ii) terapia contra o reaparecimento da doença, nos indivíduos extensivamente expostos às espécies *P. vivax* ou *P. ovale*, iii) cura radical nos indivíduos infectados por ambas as espécies anteriormente referidas. Adicionalmente, nas áreas endêmicas da doença este fármaco é usado como gametocitocida prevenindo a sua transmissão do hospedeiro humano infectado ao mosquito vector.^[40]

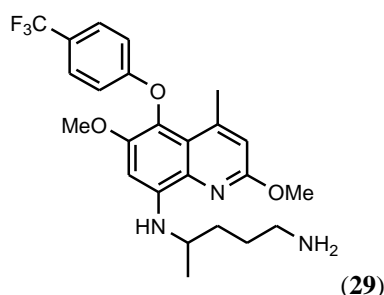
Geralmente, 200 mg de PQ levam à cura total da doença, sendo a dosagem adoptada para administração de 15 mg/dia durante 14 dias. A necessidade destas administrações diárias deve-se ao curto $t_{1/2}$ deste composto, que varia entre 4h e 6h. Este agente antimalárico também apresenta algumas desvantagens e limitações, o que faz com que seja contra-indicado a crianças com idade inferior aos 4 anos e mulheres grávidas. A realização de um teste prévio à actividade da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é fundamental, e dado não ter actividade sobre as formas parasitárias presentes no interior dos eritrócitos infectados, deve ser co-administrado com um esquizontocida sanguíneo.^[40,41]

A resistência do parasita da malária à PQ é extremamente baixa, sendo praticamente ausentes os casos reportados. Embora alguns casos de reaparecimento da malária causada por *P. vivax* tenham sido reportados, após tratamento com esta 8-AQ, a sua frequência, intensidade e distribuição não aparentam ser alarmantes.^[40]

1.2.2.1. Mecanismo acção

Os inúmeros estudos realizados nas últimas décadas permitiram concluir que, após administração da PQ, eram evidentes alterações específicas nas membranas das mitocôndrias de algumas formas parasitárias, nomeadamente, nos esquizontes exo-eritrocíticos, gametócitos e trofozoítos presentes na fase sanguínea do ciclo de infecção. Tal facto fez com que se considerassem as membranas, especificamente a membrana interna da mitocôndria, como o alvo de acção deste agente antimalárico. Esta hipótese foi adicionalmente reforçada pelas interacções estabelecidas entre a PQ e vários fármacos que têm a sua acção sobre a mitocôndria. Especificamente, o uso conjunto de PQ e mirincamicina (composto análogo à clindamicina) resultou na cura radical em macacos infectados com *P. cynomolgi* e a azitromicina teve acção sinérgica com a PQ e tafenoquina (**29**), *in vitro*, contra *P. falciparum*. Estudos posteriores sugeriram ainda que a exposição à PQ afecta a estrutura da mitocôndria e inibe o desenvolvimento do parasita em fases do seu ciclo de vida que necessitam da função mitocondrial activa. Embora esta função ainda não seja completamente evidente, sabe-se que é fundamental para a sobrevivência destes parasitas. Os resultados obtidos por Basso *et al.*, recentemente relatados na literatura, comprovaram que a estrutura da PQ é capaz de causar uma desordem ao nível da estrutura dos lípidos constituintes das membranas da mitocôndria, o que pode influenciar o normal funcionamento de uma ou mais proteínas, as quais se encontram embebidas neste ambiente lipídico.^[41,42]

Outro mecanismo de acção considerado baseia-se no stress oxidativo gerado no interior dos eritrócitos pela produção de ROS aquando do metabolismo da PQ. Os metabolitos reactivos resultantes actuam suprimindo as defesas celulares, ao mesmo tempo que atacam macromoléculas essenciais. Contudo, e embora não exista ainda informação conclusiva que demonstre se a actividade antimalárica da PQ é devida à sua acção directa ou mediada pelos metabolitos resultantes, a metabolização das 8-AQ parece ser necessária tanto para a sua eficácia como para a sua toxicidade.^[40,41,42]



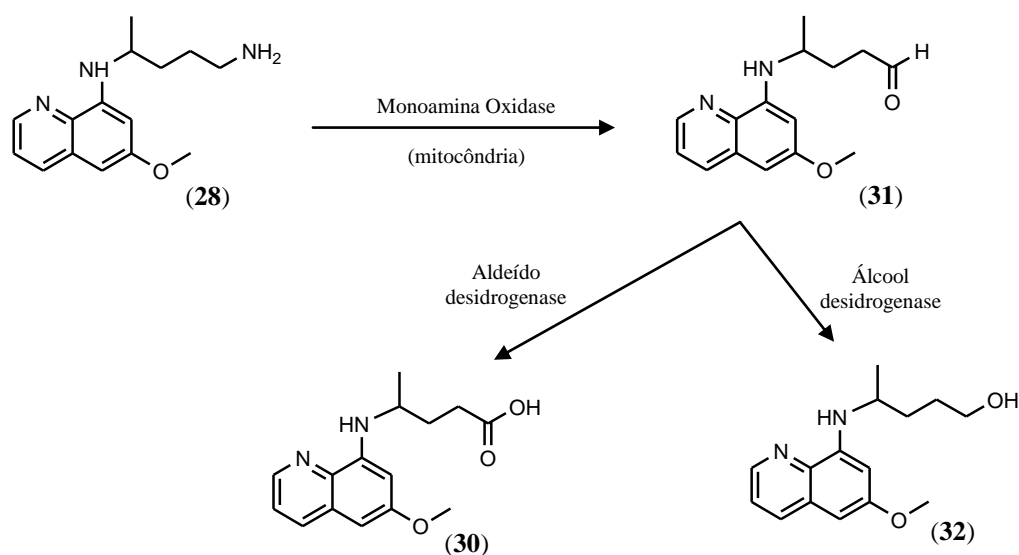
1.2.2.2. Metabolismo

Desde a sua descoberta que inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de identificar os possíveis metabolitos da PQ. Actualmente sabe-se que este fármaco é rapidamente absorvido ao nível do tracto gastrointestinal, acumulando-se posteriormente no fígado, coração, pulmões e músculo-esquelético. Apresenta baixa biodisponibilidade oral, sendo rapidamente metabolizado com formação da carboxiprimaquina (**30**, CPQ) – o principal metabolito da PQ identificado em ratos, macacos e humanos. Adicionalmente, este agente antimalárico é metabolizado a muitos outros compostos, alguns já identificados outros ainda não, detectados tanto na urina como no plasma. De um modo geral, e de acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, os principais metabolitos da PQ podem ser divididos nos seguintes grupos: i) carboxiprimaquina, ii) compostos hidroxilados, iii) compostos diméricos, iv) compostos contendo um átomo de enxofre e v) restantes metabolitos.^[40,43]

O derivado ácido carboxílico da PQ (**30**) foi o primeiro metabolito identificado e descrito, ocorrendo a sua formação por uma via metabólica independente da acção do citocromo p450 (Esquema 1.3). De acordo com estudos relatados na literatura, a cadeia lateral da PQ é biotransformada, por acção de oxidases livres no meio celular, com formação de um derivado contendo a função aldeído (**31**). Este derivado é, posterior e maioritariamente, convertido por

acção da enzima aldeído desidrogenase na CPQ, ou alternativamente no derivado contendo a função álcool (32) por acção da enzima álcool desidrogenase.^[40,41]

Estudos de actividade revelaram que a CPQ é substancialmente menos activa que a PQ, facto que sugere a importância do grupo amina terminal da cadeia alifática na actividade destes compostos. O facto de este metabolito não ser detectado na urina sugere a ocorrência de transformações adicionais, prévias à sua excreção, com provável formação de espécies reactivas e tóxicas.^[40,43]



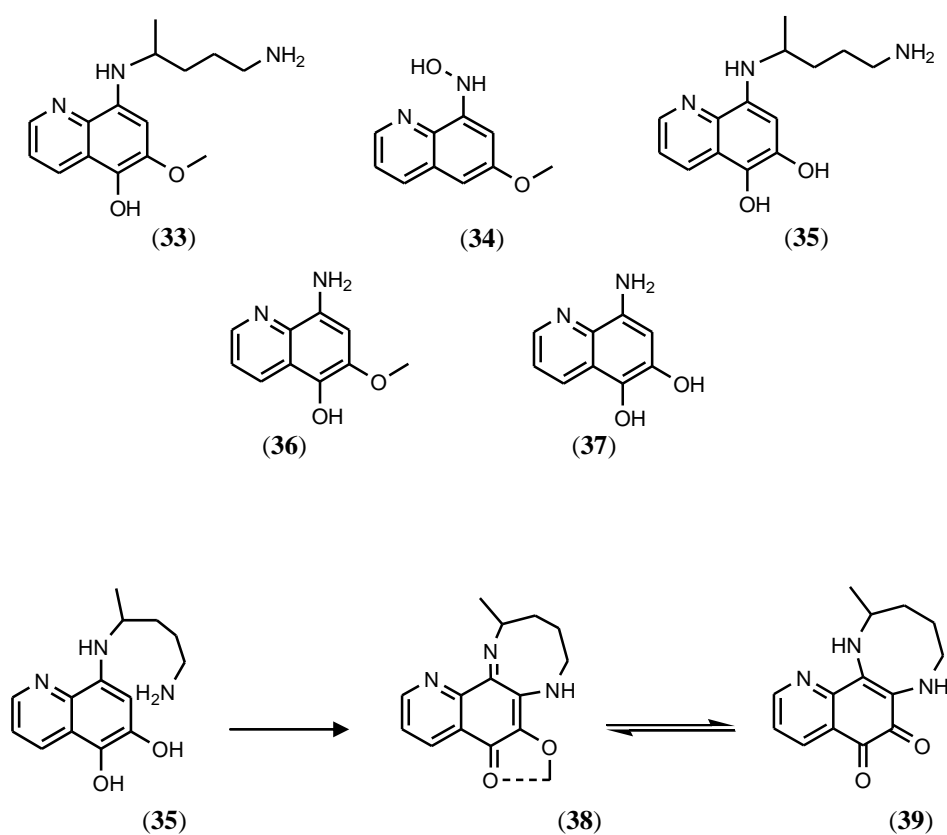
Esquema 1.3

Via metabólica proposta para a cadeia lateral da PQ. Adaptado de [41].

Contrariamente à CPQ, alguns metabolitos resultantes da hidroxilação da PQ foram identificados nos fluidos biológicos dos animais tratados, destacando-se a 5-hidroxiprimaquina (33, 5-HPQ) e 6-metoxi-8-hidroxi-aminoquinolina (34, MAQ-NOH). Ambos os metabolismos são potenciais responsáveis pela formação de meta-hemoglobina, hemólise dos eritrócitos e depleção da actividade da glutatona (GSH).^[44-45]

Adicionalmente, foram identificados outros metabolitos como, por exemplo, a 5,6-dihidroxiprimaquina (35, 5-H-6-DPQ), 6-metoxi-5-hidroxi-8-aminoquinolina (36) e 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina (37, AQD), alguns dos quais mostrando interacção *in vitro* com a hemoglobina humana, hemolisados caninos e eritrócitos humanos. A hidroxilação da PQ resultou em compostos mais tóxicos.^[40,46]

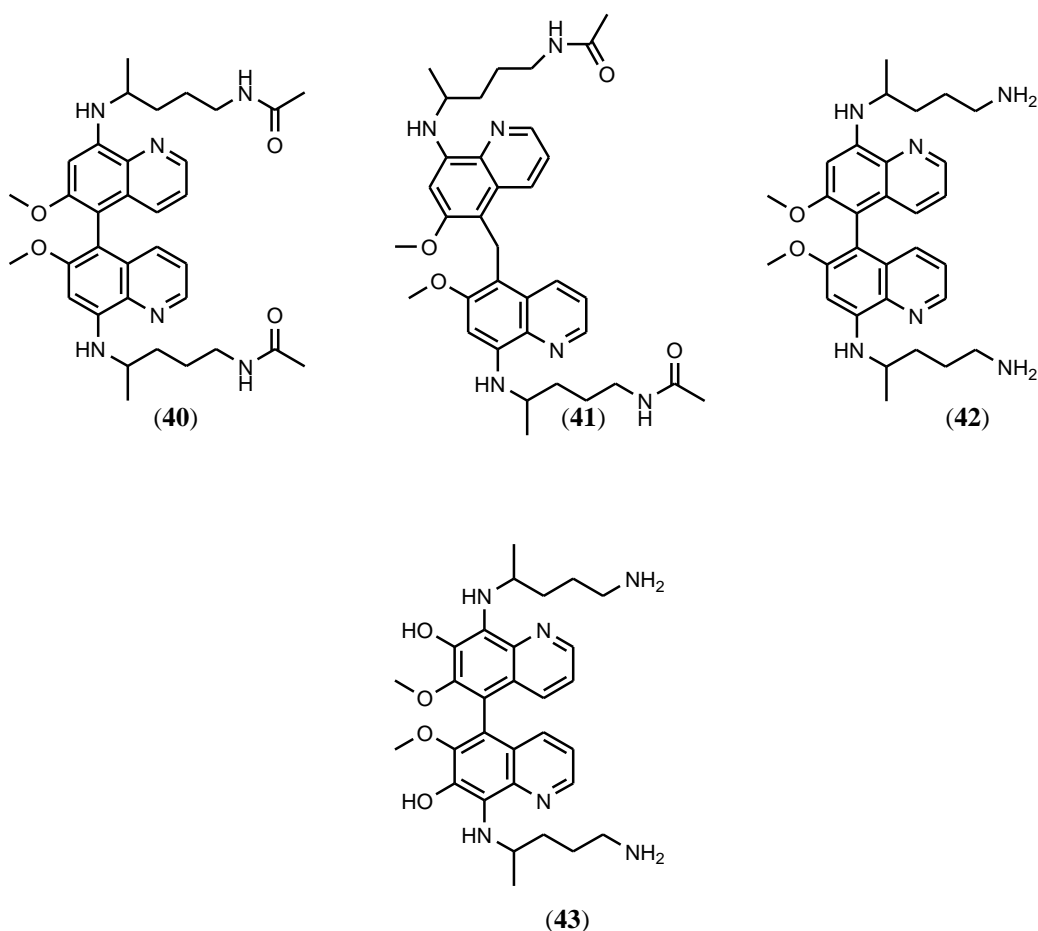
Um estudo realizado por Vásquez-Vivar e Augusto em 1992 mostrou que os metabolitos **33**, **35** e **37** são rapidamente oxidados em condições fisiológicas, com formação de H_2O_2 e derivados quinona-imina. No caso do composto **35** o derivado quinona-imina identificado é capaz de formar um composto tricíclico (**38**, Esquema 1.4) que existe em equilíbrio com a forma *orto*-quinóide (**39**, Esquema 1.4).^[40,44a,46]



Esquema 1.4

Equilíbrio químico entre os derivados **38** e **39**. Adaptado de [40].

Clark *et al.* identificaram em 1984 dois novos metabolitos diméricos da PQ, quando realizavam estudos acerca do metabolismo deste composto em microrganismos. Os compostos isolados **40** e **41** não demonstraram actividade antimalárica, contrariamente aos derivados **42** e **43** que se revelaram potentes esquizontocidas.^[40,47-48]



1.2.2.3 Toxicidade

Quando administrada a indivíduos infectados com malária, a PQ pode causar efeitos secundários severos. Um desses efeitos é a meta-hemoglobinemia, uma condição patológica caracterizada por uma acumulação anormal da meta-hemoglobina ao nível do sangue.

Em condições fisiológicas, o átomo de Fe presente no grupo heme da hemoglobina encontra-se em equilíbrio entre dois estados de oxidação: o estado de oxidação ferroso (Fe^{2+}), que se liga ao O_2 e realiza o seu transporte pelo corpo, ou o estado de oxidação férrico (Fe^{3+}), a partir do qual se forma a meta-hemoglobina que é espontaneamente neutralizada.^[40,41,49] Em situações adversas, como por exemplo em casos de stress oxidativo, infecção, deficiência na enzima G6PD ou por simples influência de xenobióticos, a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} encontra-se favorecida, o que causa um aumento da concentração da meta-hemoglobina no organismo. Dado que esta forma de hemoglobina não tem capacidade de ligação ao O_2 , não efectua o seu transporte pelos tecidos do corpo o que, conseqüentemente, implica sérios riscos para a saúde humana.^[40,41]

Este efeito hemotóxico quando causado pela administração de PQ aos indivíduos infectados, em especial aos que apresentam deficiência na enzima G6PD, supõe-se ser mediado pelos metabolitos que este fármaco origina após metabolismo. Contudo, e apesar de estudos descritos na literatura apontarem o composto MAQ-NOH (**34**) como um dos possíveis responsáveis, tanto os metabolitos tóxicos como o mecanismo por detrás desta hemotoxicidade continuam por identificar.^[44b]

Adicionalmente, a PQ é responsável pela anemia hemolítica verificada nos indivíduos tratados. Tanto nas células do hospedeiro humano como nas do parasita existem sistemas antioxidantes importantes e essenciais que mantêm as ROS num nível adequado à sua sobrevivência. A grande maioria destes sistemas necessita de NADPH para efectuar a detoxificação dos radicais livres, sendo a produção desta coenzima catalisada pela G6PD. Nos indivíduos deficientes na G6PD a produção de NADPH é inferior o que promove uma maior susceptibilidade a danos celulares por agentes oxidantes. Embora expressa em todos os tecidos, a deficiência na G6PD manifesta-se essencialmente ao nível dos glóbulos vermelhos, razão pela qual em casos de infecção ou exposição a determinados compostos químicos se desencadeia uma anemia hemolítica. A PQ é um dos compostos químicos que exerce este efeito tóxico nos indivíduos comprometidos.^[40]

A actividade hemolítica da PQ deve-se ao stress oxidativo gerado no interior dos eritrócitos, pelos compostos formados após metabolismo, que promove a fagocitose destas células. Alguns dos metabolitos fenólicos identificados são potenciais responsáveis pela hemólise directa dos eritrócitos, nomeadamente: 5-HPQ (**33**) e MAQ-NOH (**34**).^[44-45] Alguns dos estudos realizados neste sentido permitiram demonstrar que os efeitos hemolíticos do metabolito **34** resultam de danos provocados nas membranas dos eritrócitos, por peroxidação lipídica. Contrariamente, verificou-se que o derivado **33** induz danos oxidativos ao citoesqueleto dos eritrócitos. Estes danos surgem pela formação de pontes dissulfureto entre a hemoglobina e as proteínas do citoesqueleto, formando-se aductos que determinam a fagocitose das células. Assim, ocorre uma diminuição do número de eritrócitos em circulação, o que leva à anemia hemolítica.^[40,44a-50]

1.2. Compostos híbridos

Actualmente a OMS recomenda o uso de uma terapia de combinação, devido ao desenvolvimento de estirpes resistentes do parasita da malária à maioria dos fármacos usados em monoterapia.^[51]

A terapia de combinação tem-se revelado mais eficaz e menos vulnerável a resistências adaptativas, uma vez que é mais difícil para o sistema biológico em questão compensar a acção simultânea de dois ou mais fármacos. Esta abordagem multifactorial foi primeiramente desenvolvida na quimioterapia contra a tuberculose e tem sido aplicada em diferentes áreas terapêuticas como o cancro, a diabetes e inúmeras doenças infecciosas. Recentemente foi também aprovada para o tratamento da SIDA e infecções causadas por HIV-1.^[52,53,54,55]

Considerando que o mesmo princípio pode ser aplicado no tratamento da malária, a OMS recomenda que uma terapia combinatória baseada na ART (ACT) seja usada como primeira linha de tratamento nos casos de infecção. Combinações de ART ou um dos seus derivados, que têm rápida acção sobre o parasita mas são rapidamente excretados, com compostos antimaláricos com tempos de semi-vida superiores são favorecidas de modo a atingir a erradicação completa das formas parasitárias e prevenir o reaparecimento da doença, situação frequentemente detectada nos indivíduos infectados sujeitos à monoterapia de ART. De facto, a combinações entre a ART ou derivados e fármacos como a mefloquina ou lumefantrina têm-se revelado altamente eficazes, mesmo no tratamento de estirpes de *Plasmodium* multi-resistentes.^[5,51,52,55,56]

A combinação de fármacos pode ser feita, pelo menos, de três maneiras distintas, sendo a mais usual a utilização de dois medicamentos em separado. Adicionalmente, podem-se desenvolver formulações estáveis contendo ambas as substâncias activas, ou conjugar ambos os farmacóforos num único composto químico. Com base neste último conceito, Meunier *et al* introduziram os compostos híbridos (também designados por compostos quiméricos) na terapia antimalárica. Este tipo de compostos contendo dois farmacóforos – grupo quinolina e peróxido – foi sintetizado com o objectivo de ultrapassar os casos de resistência do parasita a fármacos derivados da CQ tirando-se, simultaneamente, partido das propriedades farmacocinéticas dos trioxanos, ozonidos e tetraoxanos. Os compostos desenvolvidos mostraram maior actividade antimalárica do que os fármacos de partida, revelando-se assim a importância desta metodologia.^[27,28]

Com base nesta abordagem, nos últimos anos têm sido sintetizados vários compostos híbridos baseados no farmacóforo dos peróxidos. Em 2009, Capela *et al*^[56b] reportaram a

síntese de compostos híbridos contendo ambas as unidades antimaláricas ART e vinilsulfona, acopladas entre si por ligações peptídicas. Os compostos desenvolvidos demonstraram potente actividade antiplasmodial contra estirpes multi-ressistentes de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina, com valores de IC_{50} na ordem dos 2 a 5 nM.^[56]

Por definição, uma molécula híbrida consiste numa entidade química contendo dois (ou mais) domínios estruturais (farmacóforos), com diferentes funções biológicas e actividade. As partes constituintes de um composto híbrido podem ou não ter o mesmo alvo biológico, razão pela qual se distinguem três categorias distintas (Figura 1.6): i) compostos híbridos em que ambos os farmacóforos actuam no mesmo alvo terapêutico, ii) compostos com dois alvos de acção distintos, e iii) moléculas híbridas com dois alvos de acção diferentes mas relacionados entre si, de modo a que ambos os farmacóforos actuam ao mesmo tempo no respectivo alvo terapêutico.^[51]

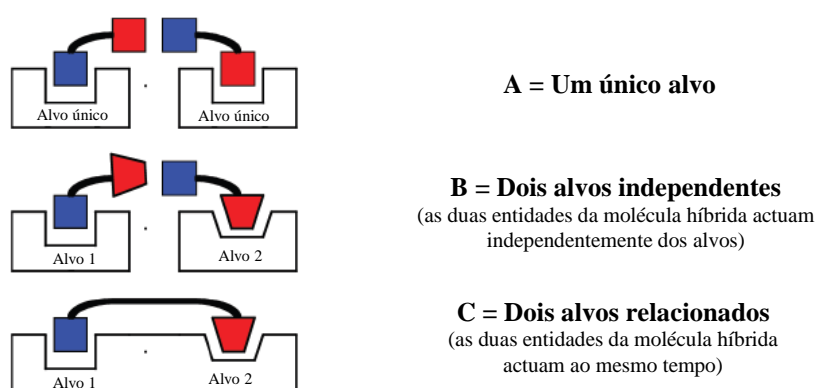


Figura 1.6

Representação dos três modos de acção possíveis para as moléculas híbridas. Adaptado de [51]

Adicionalmente, e consoante o tipo de *linker* que estabelece a ligação entre os diferentes farmacóforos, os compostos podem ser classificados como: i) conjugados cliváveis, em que o *linker* pode ser metabolizado libertando os farmacóforos que interagem de forma independente com o respectivo alvo de acção, ii) conjugados, em que cada farmacóforo actua num alvo distinto e o *linker*, metabolicamente estável, que os une não faz parte da estrutura química de nenhum dos compostos individuais, iii) moléculas parcialmente fundidas, que apresentam um *linker* de reduzidas dimensões fazendo com que ambos os farmacóforos se

encontrem parcialmente fundidos entre si e iv) híbridos fundidos, nos quais ambos os farmacóforos se encontram fundidos, tirando partido da estrutura comum de ambos os compostos de partida e desenvolvendo-se assim moléculas mais simples e de menores dimensões (Figura 1.7).^[54,56]

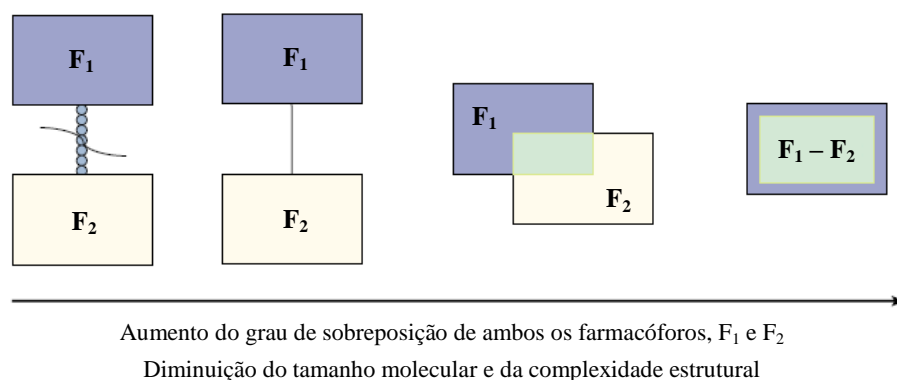


Figura 1.7

Representação dos diferentes tipos de moléculas híbridas consoante o *linker* que as constitui. Adaptado de [54]

A utilização de compostos híbridos em relação à terapia de combinação pode apresentar várias vantagens, tais como:

- i) maior *compliance* por parte dos doentes que passam a tomar um menor número de medicamentos,
- ii) menores custos associados (apenas é preciso produzir um medicamento, com dois ou mais farmacóforos, em vez de vários medicamentos cada um com o seu farmacóforo),
- iii) menor risco de interações adversas entre ambos os fármacos (numa formulação combinada as solubilidades podem ser diferentes modificando-se consequentemente o nível de ambos os fármacos em circulação, que deve ser o mesmo),
- iv) maior previsão das propriedades farmacocinéticas do composto final.

Por outro lado, um inconveniente das moléculas híbridas é o facto de a razão entre os farmacóforos ser sempre fixa, o que faz com que seja mais difícil ajustar ambas as actividades em alvos terapêuticos distintos. De acordo com esta desvantagem, e em casos extremos, pode acontecer que para determinadas concentrações do composto apenas um farmacóforo consiga exercer a sua função biológica.^[51,56]

1.3. Âmbito da tese

A erradicação da malária requer novas abordagens terapêuticas e profiláticas que actuem simultaneamente em diferentes fases do ciclo de vida do parasita. Para além da actividade sobre as formas parasitárias responsáveis pela infecção dos eritrócitos, os novos candidatos devem actuar de igual modo sobre as formas infectantes dos hepatócitos, especificamente sobre os hipnozoítos. Adicionalmente, o bloqueio da transmissão da doença aos mosquitos vectores, através da actividade gametocitocida, é outra das características desejáveis. Dado que os fármacos existentes são apenas activos contra apenas uma ou, no máximo, duas fases do ciclo de vida de *Plasmodium*, devem ser desenvolvidas combinações de agentes antimaláricos, tal como recomendado pela OMS.^[57,58]

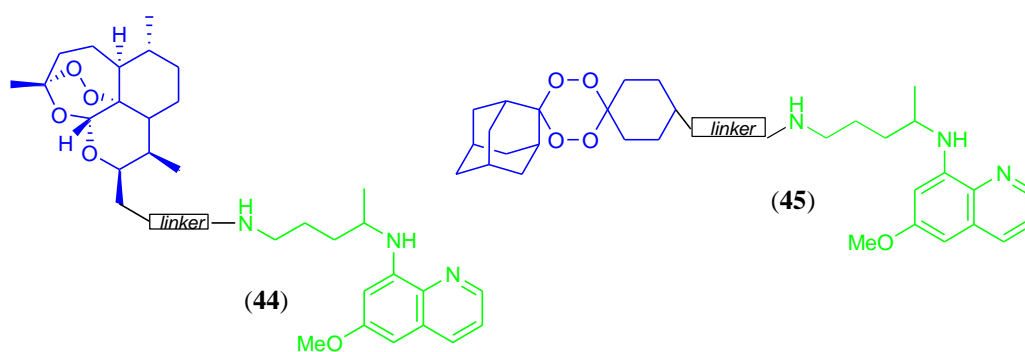
Os compostos híbridos, como referido anteriormente, oferecem a possibilidade de uma única entidade química interagir com diferentes alvos ou diferentes locais num mesmo alvo de acção. Algumas das moléculas híbridas já desenvolvidas na terapia antimalárica, em que dois antimaláricos foram combinados através de um *linker*, revelaram resultados promissores e eficazes contra os respectivos alvos de acção no parasita.^[51]

A artemisinina (**1**) e respectivos análogos (di-hidroartemisinina, **3**, artesunato, **4**, arteméter, **5** e arteeter, **6** - Figura 2.2) representaram um grande avanço na quimioterapia da malária, dada a rápida resposta terapêutica que produzem particularmente em estirpes de *P. falciparum* multi-resistentes. Embora estes compostos sejam bastante eficazes contra as formas parasitárias assexuadas e evitem o desenvolvimento precoce dos gametócitos, bloqueando a transmissão da doença, não são activos na fase hepática da malária. O mesmo tipo de actividade estende-se aos inúmeros compostos peróxidos obtidos por via sintética.^[21,26,32]

A PQ (**28**) é, por sua vez, o único agente antimalárico, disponível clinicamente, activo contra as formas parasitárias da fase hepática (incluindo hipnozoítos da espécie *P. vivax*) do ciclo de vida e gametócitos de todas as estirpes. Contudo este agente antimalárico é pouco activo na fase sanguínea do ciclo infeccioso.^[40]

Posto isto, o objectivo deste trabalho focou-se no desenvolvimento de novas moléculas híbridas (**44** e **45**), baseadas nos farmacóforos peróxido (azul) e 8-AQ (verde), que pudessem ser activas não só contra as fases hepática e sanguínea, mas também bloqueadoras da transmissão do parasita da malária ao mosquito vector.

Após sintetizados, e tendo em vista a avaliação destes compostos como moléculas híbridas, estudou-se a sua estabilidade química e enzimática em condições fisiológicas de pH e temperatura (tampão fosfato pH 7,4 a 37°C, em plasma humano e em homogenato de fígado de rato). Adicionalmente foi efectuado um *screening* biológico de modo a determinar a actividade dos compostos antimaláricos desenvolvidos.



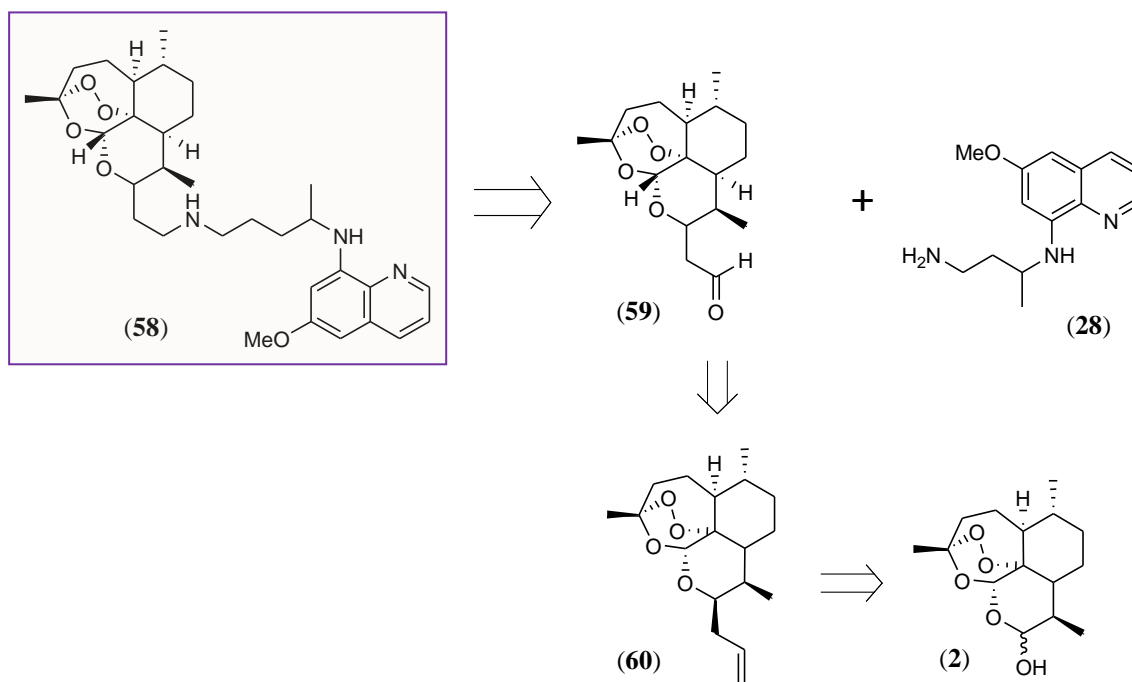
Capítulo 2

Síntese e caracterização de novos compostos híbridos antimaláricos

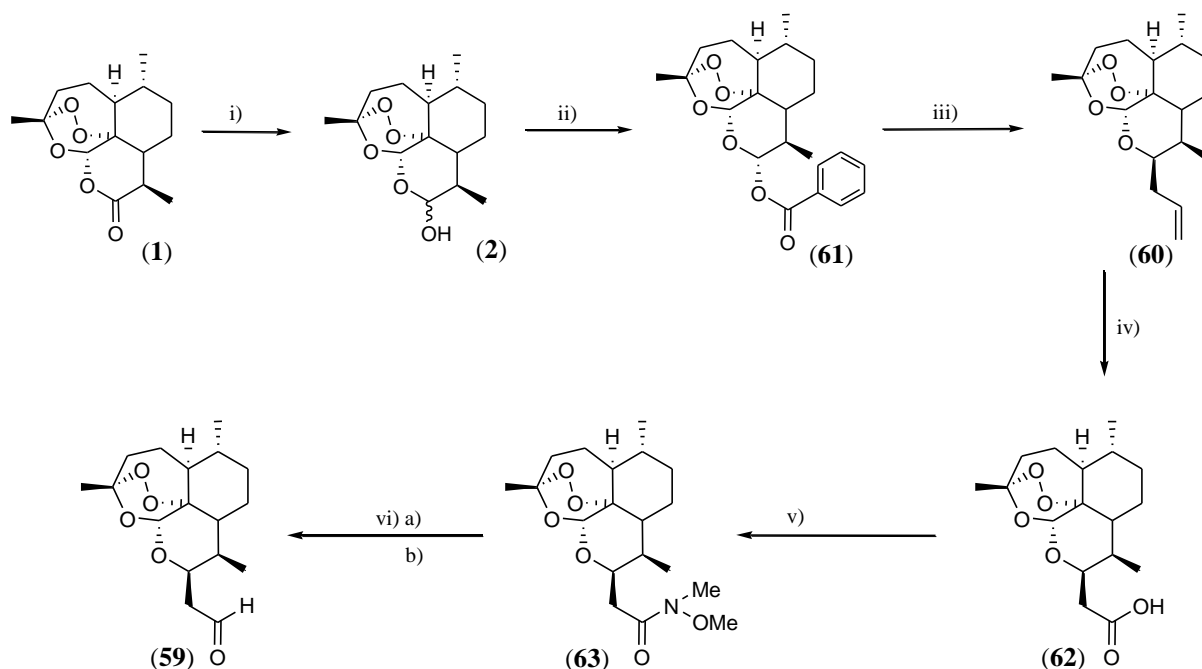
2.1 Síntese do Híbrido Artemisinina – Primaquina

Tal como referido anteriormente, a ART e análogos semi-sintéticos apresentam baixa biodisponibilidade e *clearance* rápida. Adicionalmente, o principal metabolito após metabolização é a DHA (**2**), um composto associado aos efeitos tóxicos observados e com reduzido $t_{1/2}$ (Esquema 2). Com o objectivo de colmatar estas desvantagens vários derivados têm sido desenvolvidos de modo a obter compostos mais estáveis, com tempos de semi-vida superiores e potencialmente menos tóxicos. Consequentemente, surgiram inúmeras abordagens sintéticas e semi-sintéticas dos análogos 10-carba, compostos nos quais o átomo de oxigénio na posição C-10 foi substituído por um átomo de carbono. Com base nos resultados relatados por inúmeros grupos nos últimos anos, ficou confirmado que a ligação carbono-carbono em C₁₀ aumenta a estabilidade metabólica dos derivados desenvolvidos, razão pela qual esta abordagem foi aplicada nos novos compostos híbridos antimaláricos desenvolvidos.^[59]

De acordo com o descrito no capítulo 1 (secção 1.4), o objectivo deste trabalho experimental foi o desenvolvimento de compostos híbridos contendo ambos os farmacóforos peróxido e 8-AQ. Assim, pelas razões previamente apresentadas, decidiu-se sintetizar e estudar a actividade de um composto híbrido contendo a unidade da ART covalentemente ligada à da PQ. Esta ligação foi efectuada através de um *linker* contendo a função amina, obtendo-se assim a molécula híbrida **58**. A sua retrossíntese é apresentada na Figura 2.1 e evidencia a necessidade de introduzir um grupo funcional aldeído na unidade da ART, para posteriormente reagir com o grupo amina terminal da PQ. A síntese deste derivado aldeído foi efectuada a partir de um estudo reportado na literatura por Stocks *et al.*^[60], o qual desenvolveu compostos conjugados 10-carba da ART. Por redução do derivado ácido carboxílico sintetizado por este grupo obtém-se o composto aldeído (**59**) de interesse. O esquema reaccional e respectivos intermediários envolvidos neste processo sintético estão apresentados no Esquema 2.1. As vias sintéticas adoptadas e a identificação estrutural dos compostos sintetizados serão apresentadas neste capítulo.

**Figura 2.1**

Análise retróssintética do composto híbrido **58**.

**Esquema 2.1**

Reacções químicas efectuadas de modo a obter o derivado aldeído (**59**). **Reagentes e condições:** **i)** NaBH₄, MeOH, 0°C; **ii)** BzCl, Piridina, DCM, 0°C; **iii)** aliltrimetilsilano, ZnCl₂, DCE, crivos moleculares, 0°C; **iv)** NaIO₄, KMnO₄, Acetona/H₂O; **v)** TBTU, TEA, DCM, N,O-dimetilhidroxilamina.HCl, t.a.; **vi)** a) LiAlH₄, THF, 0°C, b) KHSO₄ (solução aquosa).

2.1.1 Artemisinina (1)

Uma análise preliminar da Artemisinina comercial, por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e técnicas bidimensionais de COSY e HMQC, foi fundamental de modo a possibilitar análises e comparações futuras. O tratamento dos dados obtidos nos espectros ^1H -RMN (Figura 2.2), ^{13}C -RMN e COSY baseou-se no relatado por Blaskó, G. e Cordell, G.A.^[61] O ponto de fusão determinado, que variou entre os 151 - 154°C, permitiu inferir acerca da pureza do composto e encontra-se de acordo com o descrito.

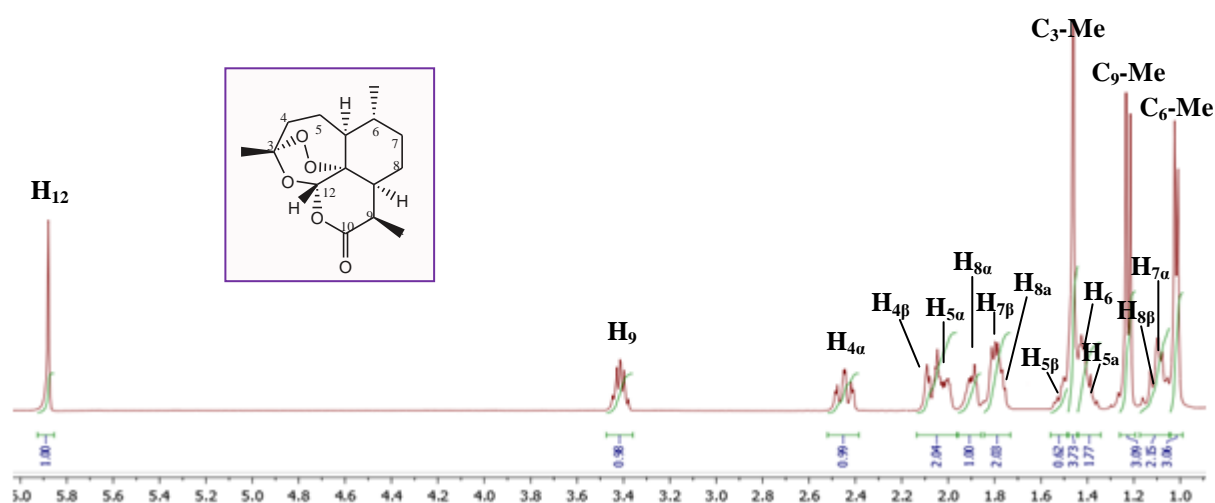


Figura 2.2

Representação do espectro de ^1H -RMN da Artemisinina (1).

Na estrutura da ART existem sete centros quirais que influenciam o comportamento magnético dos prótons nos carbonos adjacentes. Este facto faz com que os prótons dos grupos $-\text{CH}_2$ não sejam magneticamente equivalentes, o que se traduz no aparecimento de sinais distintos.

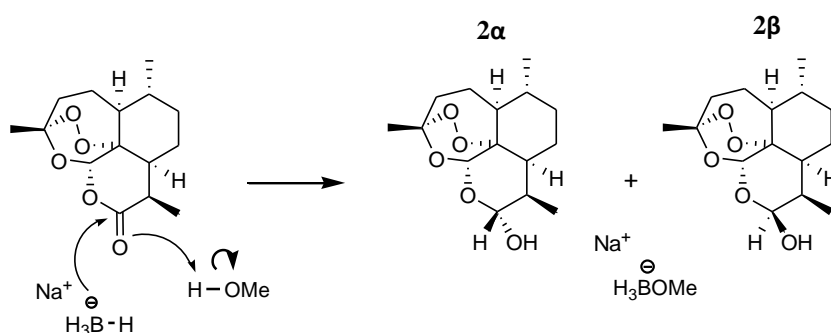
No espectro de ^1H -RMN é importante salientar alguns sinais característicos, como os correspondentes aos prótons em C_9 e C_{12} (Figura 2.2).

No espectro de ^{13}C -RMN o pico mais característico é o que aparece a um desvio químico (δ) de 172,1 ppm que corresponde ao grupo carbonilo. Este grupo foi também identificado por espectroscopia de IV, pela banda característica a 1738 cm^{-1} . A ponte peroxídica, fundamental para a actividade antimalárica deste composto, foi identificada pela banda a 989 cm^{-1} . Todos estes valores foram comparados com os tabelados na literatura.^[62]

2.1.2 Di-hidroartemisinina (2)

A primeira síntese realizada consistiu na redução do grupo carbonilo da artemisinina no grupo hidroxilo da di-hidroartemisinina. Esta reacção foi efectuada de acordo com o procedimento descrito por Brossi *et al.*^[63], usando-se como agente reductor o NaBH₄. O procedimento experimental efectuado encontra-se descrito no capítulo IV.

Dada a possibilidade de o ataque nucleofílico, por parte do hidreto, poder ocorrer por ambos os lados do grupo carbonilo, no final da reacção obteve-se uma mistura de dois diastereoisómeros do composto **2** (na proporção de 1:1) - **2α** e **2β** (Esquema 2.2).^[63,64]



Esquema 2.2

Mecanismo da reacção de redução com NaBH₄, em meio prótico.

A di-hidroartemisinina foi analisada por espectroscopia de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e técnicas bidimensionais de COSY e HMQC. Por comparação com os dados obtidos pelas mesmas técnicas de espectroscopia para a artemisinina, previamente referidos, confirmou-se não só a presença do derivado **2**, como foi possível identificar ambos os diastereoisómeros.

A obtenção de uma mistura racémica de ambos os isómeros **2α** e **2β** fez com que todos os prótons presentes na estrutura da di-hidroartemisinina tivessem associados dois sinais distintos no espectro de ¹H-RMN. Muitos destes sinais foram fundamentais para comprovar a ocorrência de redução, especificamente os sinais com $\delta = 5,30$ ppm e $\delta = 4,75$ ppm que correspondem ao próton em C₁₀ nos isómeros **2β** e **2α**, respectivamente (Figura 2.3). A atribuição de cada isómero baseou-se nas constantes de acoplamento (J) obtidas para cada um dos sinais, as quais resultam do desdobramento que o próton em C₁₀ sofre pelo efeito do próton em C₉.

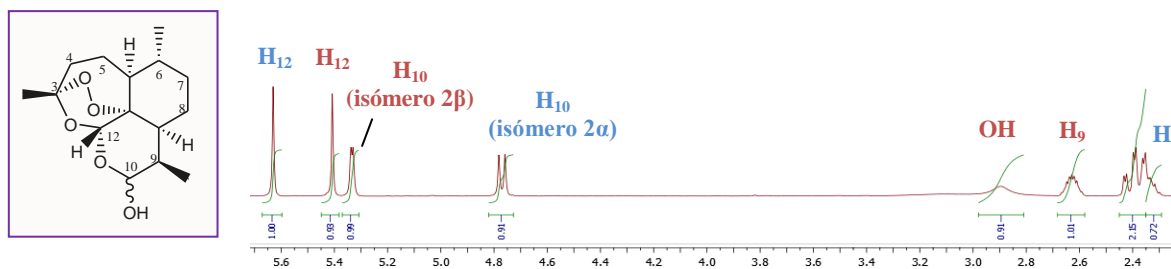
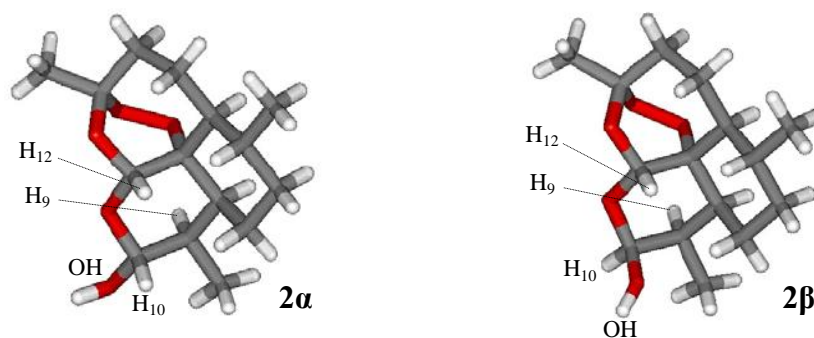


Figura 2.3

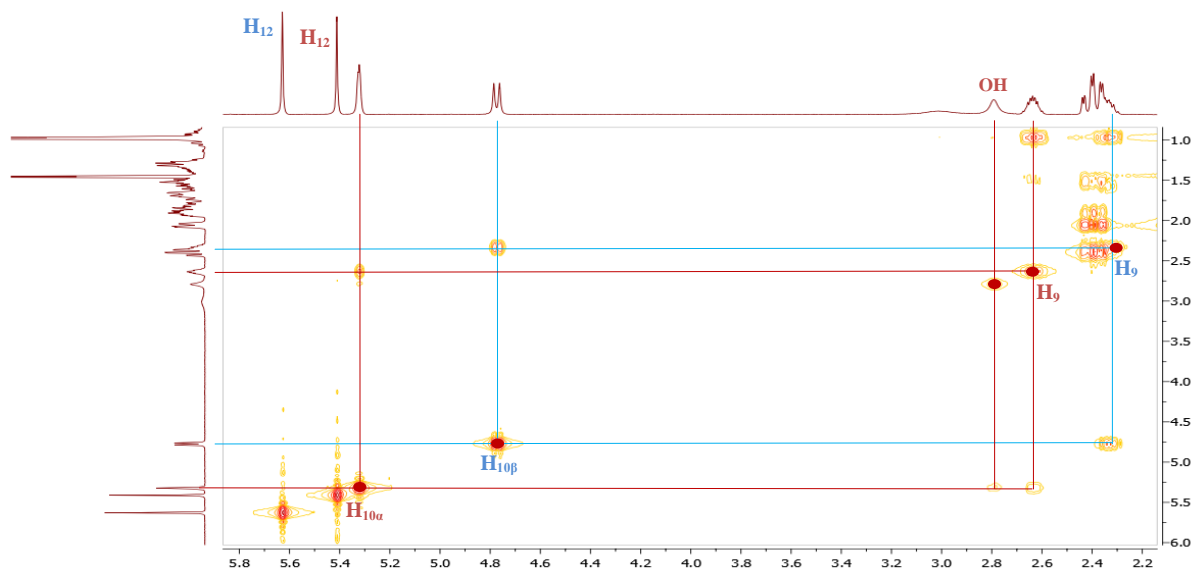
Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do derivado di-hidroartemisinina (**2**). Os prótons de cada isômero apresentam uma cor característica, nomeadamente: **isômero 2 α** e **isômero 2 β** .

De acordo com a literatura, prótons vicinais em que ambos se encontram na posição axial originam entre si um ângulo diedro de 180° e têm $J_{\text{ax,ax}}$ que varia entre os 6 e 14 Hz. Quando apenas um deles se encontra na posição axial o ângulo diedro formado entre ambos diminui de amplitude, tendo um valor tabelado de aproximadamente 60° , e o valor de $J_{\text{ax,eq}}$ varia entre os 0 e 5 Hz.^[62] Se tivermos em conta a estrutura de ambos os diastereoisômeros da DHART (Figura 2.4) verifica-se que no isômero α ambos os prótons em C_9 e C_{10} se encontram na posição axial, contrariamente ao que acontece no isômero β em que o próton em C_9 se mantém na posição axial mas o próton em C_{10} passa a estar na posição equatorial. Posto isto, foi possível concluir que o sinal com $\delta = 5,30$ ppm e $J = 3,2$ Hz corresponde ao isômero 2β , enquanto o sinal com $\delta = 4,75$ ppm e $J = 9,2$ Hz corresponde ao isômero 2α . Esta atribuição encontra-se de acordo com a proposta por outros autores.^[62,64,65,66]

O novo ambiente químico junto ao próton em C_9 , que passou a estar adjacente a um carbono contendo um grupo hidroxilo em vez de carbonilo, determina a absorção de energia num campo magnético diferente obtendo-se consequentemente um desvio químico distinto. O próton em C_9 encontra-se menos blindado na estrutura da artemisinina o que determina o aparecimento de um sinal a campo mais baixo ($\delta = 3,42$ ppm; Figura 2.3), enquanto que na estrutura da DHART este próton em C_9 tem um pico característico a campo mais alto, nomeadamente $\delta = 2,61$ ppm e $\delta = 2,29$ ppm para os isômeros 2β e 2α , respectivamente.^[65,66] Esta atribuição foi baseada no espectro bidimensional de COSY (Figura 2.5).

**Figura 2.4**

Modelo 3D dos diastereoisômeros da DHART: 2α e 2β , respectivamente. Adaptado de [3].

**Figura 2.5**

Representação parcial do espectro bidimensional COSY da di-hidroartemisinina (**2**), evidenciando a interação entre os prótons em C_9 e C_{10} . Os prótons de cada isômero apresentam uma cor característica, nomeadamente: **isômero 2α** e **isômero 2β** .

De modo a evidenciar a presença de ambos os isômeros, é ainda importante salientar o desvio químico do próton em C_{12} que aparece como um *singuleto* a dois valores diferentes. Por comparação com o espectro de ^1H -RMN da ART, este próton apresentou apenas um sinal com $\delta = 5,88$ ppm. De acordo com a literatura o sinal a campo mais baixo ($\delta = 5,60$ ppm) corresponde ao isômero 2β e o sinal a campo mais alto ($\delta = 5,39$ ppm) ao isômero 2α .^[65,66] Para confirmar experimentalmente esta atribuição ter-se-ia que realizar um espectro de

NOESY, onde se poderia identificar o acoplamento bidimensional entre os prótons em C₁₀ e C₁₂ quando espacialmente orientados na mesma configuração (isômero 2 β , Figura 2.4).

No espectro de ¹H-RMN foi ainda visível o sinal correspondente ao grupo hidroxilo do isômero 2 β da DHART. A atribuição deste sinal ao respectivo isômero foi feita com base no espectro bidimensional de COSY (Figura 2.5).

Relativamente ao espectro de ¹³C-RMN da DHART, verificou-se o desaparecimento do sinal correspondente ao grupo carbonilo ($\delta = 172,1$ ppm) e o aparecimento de dois novos sinais com $\delta = 96,6$ ppm e $\delta = 94,8$ ppm. Ambos correspondem ao C₁₀, respectivamente aos isômeros β e α do derivado **2**. Esta correspondência foi atribuída com base no espectro bidimensional de HMQC (Figura 2.6) e tais resultados evidenciam, mais uma vez, a possibilidade de identificação de ambos os diastereoisômeros.

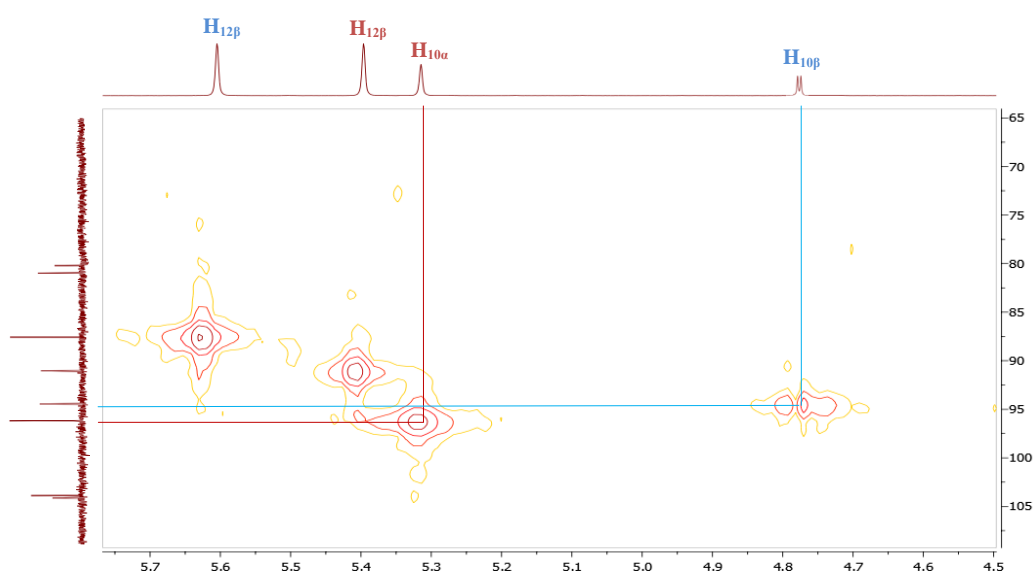


Figura 2.6

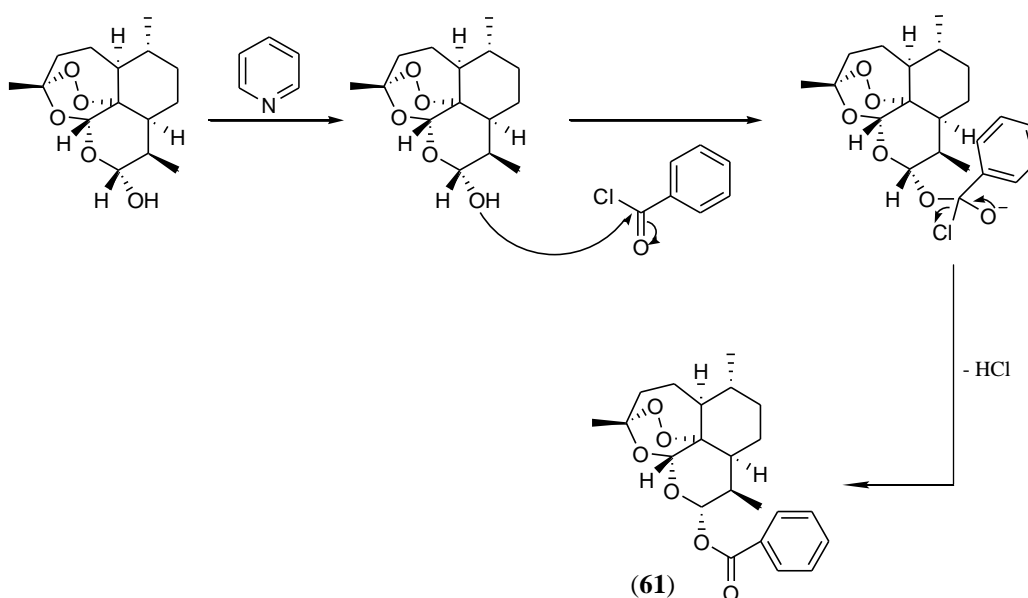
Representação parcial do espectro bidimensional HMQC da di-hidroartemisinina (**2**), evidenciando a interação dos prótons em C₁₀ ao respectivo átomo de C. Os prótons de cada isômero apresentam uma cor característica, nomeadamente: **isômero 2 α** e **isômero 2 β** .

Os sinais correspondentes ao C₁₂ em ambos os isômeros 2 α e 2 β foram identificados a $\delta = 91,4$ ppm e $\delta = 87,9$ ppm, respectivamente. Por último, é ainda relevante referir o sinal do C₉ que tem $\delta = 35,0$ ppm no isômero 2 α e $\delta = 30,9$ ppm no isômero 2 β . Por espectroscopia de IV foi possível verificar as bandas características deste derivado, nomeadamente as correspondentes ao grupo hidroxilo (1375 cm^{-1}) e à ponte peroxídica (986 cm^{-1}).^[62]

2.1.3 Derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60)

A síntese do principal intermediário (**60**), a partir do qual se desenvolvem os compostos análogos 10-carba da ART, encontra-se extensivamente descrita na literatura.^[67,68] A formação do produto secundário anidro-artemisinina (**64**, AHA), com elevado rendimento, no decorrer da reacção levou inúmeros grupos a procurar vias sintéticas alternativas. De entre as referidas, a síntese do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina a partir do intermediário DHART 10 α -Benzoato (**61**) revelou resultados bastante promissores. De acordo com Paul O'Neill *et al.* e Hindley *et al.*, a reacção de **61** com o composto alitrimetilsilano, usando ZnCl₂ como ácido de Lewis de reactividade moderada, favorece a formação do derivado **60** com rendimentos superiores aos obtidos aquando da síntese do mesmo composto usando ácidos de Lewis mais forte (como por exemplo BF₃.Et₂O).^[67,68]

Assim, após a síntese da DHART seguiu-se a síntese do intermediário **61**, de acordo com o procedimento descrito por Hindley *et al.*^[67] (ver capítulo IV). O mecanismo proposto para esta reacção encontra-se descrito no Esquema 2.3.



Esquema 2.3

Mecanismo de síntese do intermediário DHART 10 α -Benzoato (**61**).

O papel da piridina (base fraca) neste mecanismo de síntese ainda não se encontra completamente esclarecido. De acordo com o descrito na literatura, o derivado **61** é obtido por um mecanismo de adição/eliminação, com formação de um composto intermediário tetraédrico (Esquema 2.3). A posterior saída do cloreto (bom grupo abandonante), leva à obtenção do composto final. É importante referir que esta reacção ocorre apenas com o isómero β da DHART, obtendo-se como produto o derivado com configuração α em C₁₀ - DHART 10 α -Benzoato.

A pureza do composto sólido cristalino branco obtido após reacção foi avaliada pela determinação do ponto de fusão. O valor determinado coincidiu com o descrito na literatura (111 – 112°C).^[62] A posterior caracterização do derivado **60** fez-se por espectroscopia de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e técnica bidimensional de COSY.

Pelo espectro de ¹H-RMN foi possível identificar os prótons aromáticos da estrutura do benzoato (Figura 2.7) e confirmar a estereoquímica do derivado sintetizado, que apresenta configuração α na ligação C₁₀-O. A presença deste diastereoisómero confirma-se pelo acoplamento identificado entre os prótons em C₉ e C₁₀. De acordo com a literatura, o facto de o próton em C₁₀ apresentar um sinal ($\delta = 6,01$ Hz) com multiplicidade de *duplete* e $J = 10$ Hz indica que faz um ângulo diedro com o próton em C₉ de cerca de 180°C, sendo esta amplitude característica em prótons vicinais em posição axial-axial. Assim, e dado que o próton em C₉ mantém a configuração em α , o próton em C₁₀ apresenta configuração β e o grupo benzoato configuração α . Tais resultados encontram-se de acordo com o relatado na literatura, comprovando o mecanismo de reacção proposto.^[62,68,67]

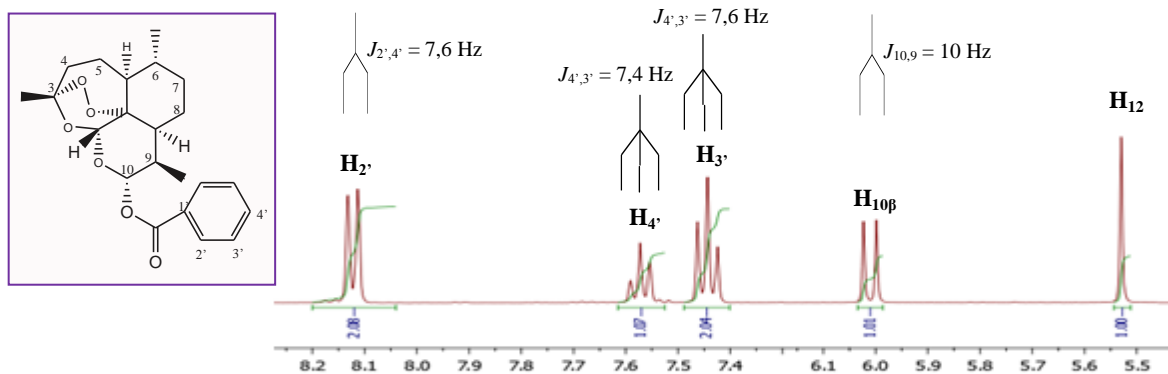
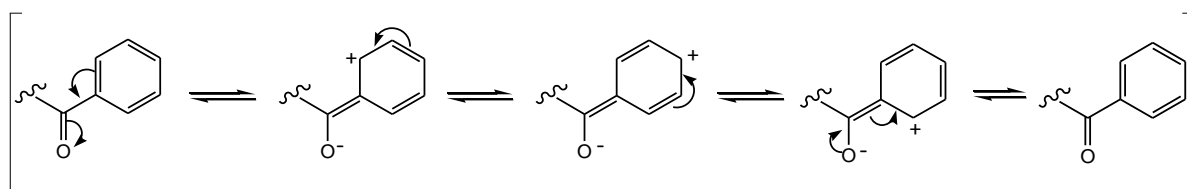


Figura 2.7

Representação parcial do espectro de ¹H-RMN do derivado DHART 10 α -Benzoato (**60**).

Com base no espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 2.7) verificou-se que os prótons do anel aromático apresentam um deslocamento químico de acordo com o descrito na literatura para sistemas aromáticos, nomeadamente: $\delta\text{H}_2 = 8,12$ ppm, $\delta\text{H}_3 = 7,44$ ppm e $\delta\text{H}_4 = 7,57$ ppm. A atribuição de cada sinal ao respectivo próton fez-se com base nas estruturas de ressonância do anel aromático (Esquema 2.4) que evidenciam as posições mais susceptíveis de desblindagem.^[69] Adicionalmente, é ainda relevante referir que as $J_{\text{H,H}}$ observadas se encontram em concordância com os valores relatados na literatura para prótons aromáticos nas posições *orto* ($J = 6-10$ Hz). Pela multiplicidade que estes sinais apresentam não foram evidentes os acoplamentos entre prótons nas posições *meta* ($J = 1-3$ Hz) e *para* ($J = 0-1$ Hz).^[62]



Esquema 2.4

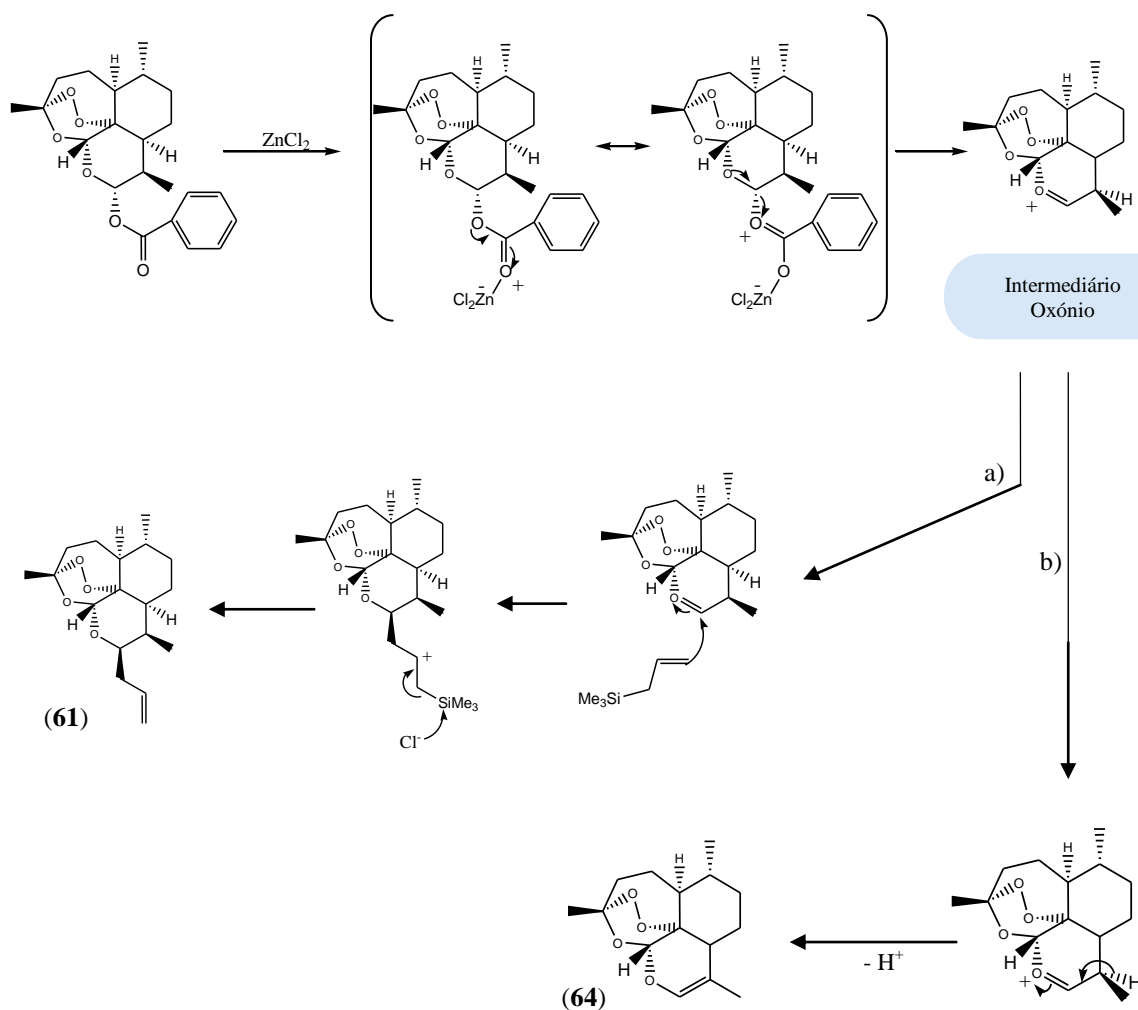
Representação esquemática das possíveis estruturas de ressonância do anel aromático presente no derivado DHART 10 α -Benzoato (**61**).

O próton em C_{12} , característico da artemisinina e seus derivados, foi identificado como um *singuleto* a $\delta = 5,53$ ppm, o que se encontra de acordo com o esperado. Relativamente ao próton em C_9 , identificado como um *multiplete* devido ao acoplamento com os prótons do grupo $-\text{CH}_3$ ligado a C_9 e os prótons em C_{10} e C_{8a} , apresenta um sinal com $\delta = 2,75$ ppm. Comparativamente com o espectro de $^1\text{H-RMN}$ obtido para a DHART verifica-se que neste derivado este próton se encontra ligeiramente mais desblindado.

Pela análise do espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (ver Anexos) foi possível identificar os sinais correspondentes ao grupo carbonilo ($\delta = 165,5$ ppm) e ao sistema aromático (por volta dos 130 ppm). Neste último, a atribuição de cada sinal ao respectivo carbono fez-se com base no espectro bidimensional HMQC tendo-se verificado: $\delta\text{C}_4 = 133,5$ ppm, $\delta\text{C}_2 = 130,3$ ppm, $\delta\text{C}_1 = 129,8$ ppm e $\delta\text{C}_3 = 128,4$ ppm. Adicionalmente, por espectroscopia de IV foi evidenciada a banda característica do grupo carbonilo (1730 cm^{-1}).^[62]

Na síntese do composto **60** utilizou-se ZnCl_2 como ácido de Lewis na presença de crivos moleculares 4Å e 1,2-dicloroetano (1,2-DCE) seco como solvente. O mecanismo reaccional proposto entre o intermediário **61** e o composto aliltrimetilsilano encontra-se descrito no Esquema 2.5. Com base neste mecanismo, e de acordo com alguns autores, a reacção catalisada pelo ácido de Lewis ZnCl_2 inicia-se com a saída do ácido benzóico, como grupo abandonante, e conseqüente formação do intermediário oxónio. Este é atacado, de modo axial, pelo carbono nucleofílico do composto aliltrimetilsilano, ocorrendo a formação de um carbocatião estabilizado pelo átomo de silício. O passo final da reacção ocorre por intervenção do ião cloreto que ao reagir com o átomo de Si determina a formação do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (**60**).^[67,68]

Embora as condições utilizadas tenham sido as optimizadas por Paul O'Neill *et al.*^[68] e segundo as quais se obteria 90% do derivado, no final da reacção apenas se obteve 38% de **60** tendo-se formado também o composto AHA (40%). Este produto secundário, formado por desidratação do intermediário oxónio (Esquema 2.5), apresenta um valor de R_f bastante próximo de **60**, facto que dificultou a separação e purificação por cromatografia de coluna de ambos os produtos de reacção. A caracterização espectroscópica de ambos os derivados, C-10 β alildeoxoartemisinina (**60**) e AHA (**64**), encontra-se descrita a seguir.

**Esquema 2.5**

Possível mecanismo de síntese de: a) intermediário C-10 β alildeoxoartemisinina (**60**), b) produto secundário AHA (**64**). Ambas as reacções são catalisadas pelo ácido de Lewis $ZnCl_2$. Adaptado de [5].

• C-10 β alildeoxoartemisinina (60)

O composto **60** foi facilmente identificado por espectroscopia de 1H -RMN devido à introdução de uma dupla ligação que, tal como o sistema aromático, apresenta características específicas. Adicionalmente, a ausência dos sinais típicos do grupo carbonilo e do grupo benzoato comprovaram a ocorrência da reacção com síntese do derivado alílico.

Pela análise do espectro de 1H -RMN (Figura 2.8) verificou-se que os prótons da ramificação alílica introduzida aparecem a campo mais alto ($\delta = 5-6$ Hz) que os prótons do anel aromático ($\delta = 6-8$ Hz), o que se encontra de acordo com o esperado.^[62]

Ambos os prótons em C₁₅ foram identificados com $\delta = 5,12$ e $5,06$ ppm. A atribuição de cada próton fez-se de acordo com os valores de J calculados, e por comparação com os valores descritos na literatura: $J_{a,b} = 6-12$ Hz, $J_{a,c} = 12-18$ Hz e $J_{b,c} = 0-3$ Hz. [62]

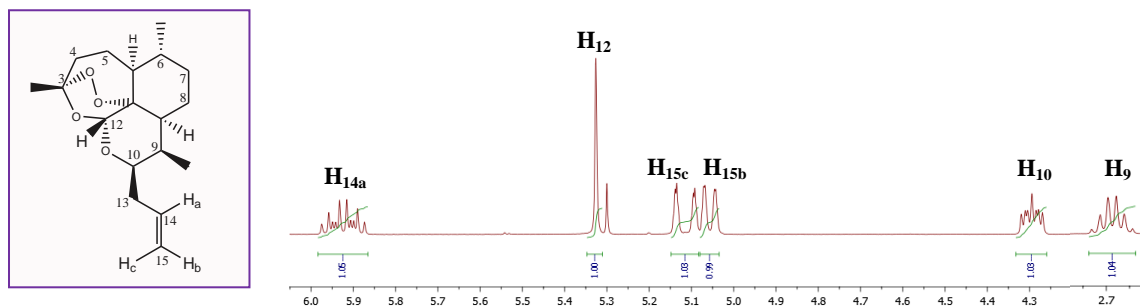


Figura 2.8

Representação parcial do espectro de ¹H-RMN do derivado C-10β alildeoxoartemisinina (**60**).

As constantes de acoplamento calculadas para o sinal a $\delta = 5,12$ ppm, que aparece como um *dupleto de dupletos*, foram $J = 17,2$ Hz e $J = 1,6$ Hz, enquanto o sinal a $\delta = 5,06$ ppm apresentou $J = 10$ Hz e $J = 1,2$ Hz (Figura 2.9). Assim, concluiu-se que o sinal a campo mais baixo corresponde ao H_c em C₁₅ dado que apresenta uma constante de acoplamento com H_a em C₁₄ superior, comparativamente com à constante de acoplamento do H_b em C₁₅ com o mesmo próton em C₁₄.

O próton em C₁₄ teve um sinal a $\delta = 5,93$ ppm, encontrando-se mais desblindado.

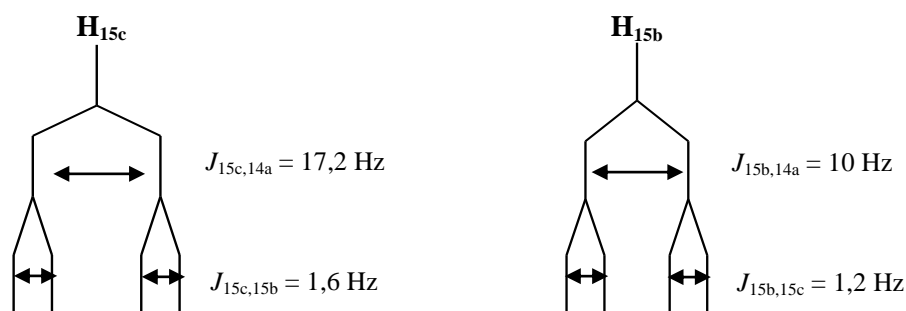


Figura 2.9

Diagrama representativo do acoplamento entre os prótons H_a em C₁₄ e H_b e H_c em C₁₅ da dupla ligação do derivado C-10β alildeoxoartemisinina (**60**).

Os prótons em C₁₃ só puderam ser identificados através do espectro bidimensional COSY, onde se analisou a sua interação com os prótons em C₁₀ e C₁₄ (Figura 2.10).

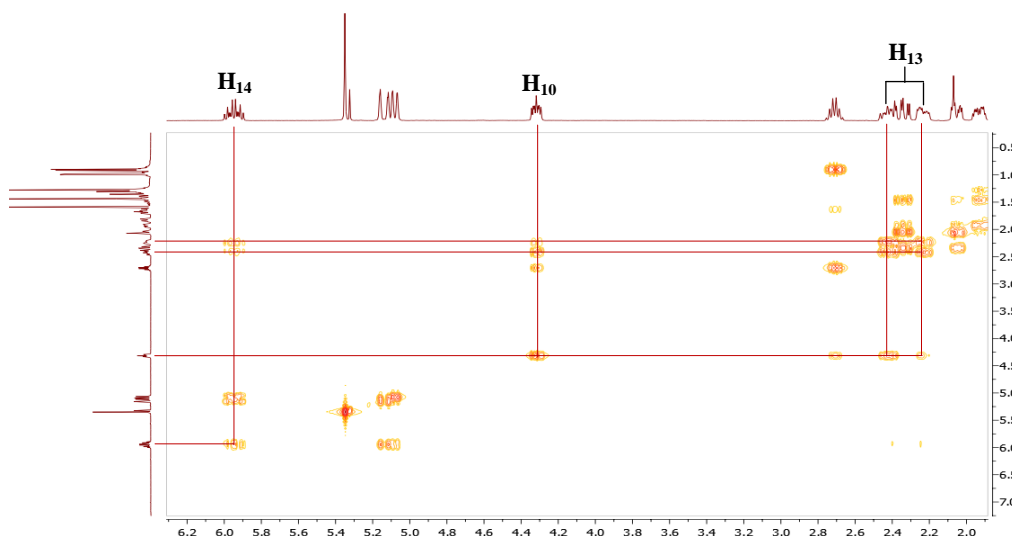


Figura 2.10

Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado C-10β alildeoxoartemisinina (**60**), evidenciando a interação entre os prótons em C₁₀, C₁₃ e C₁₄.

Como nos demais derivados previamente caracterizados, o próton em C₁₂ foi identificado a $\delta = 5,33$ ppm. De modo a confirmar o diastereoisômero obtido analisou-se ainda o acoplamento entre os prótons em C₉ e C₁₀. De acordo com a multiplicidade do sinal para o próton em C₁₀, que corresponde a um *septeto*, o acoplamento com o próton em C₉ apresenta um ângulo diedro de cerca de 60° que resulta das posições axial (H₉) – equatorial (H₁₀) em que se encontram. Assim, o derivado apresenta configuração β em C₁₀ e *J* varia entre 0 e 5 Hz.^[62]

Por espectroscopia de ¹³C-RMN e HMQC foi possível identificar os carbonos do alceno: $\delta C_{14} = 136,6$ ppm e $\delta C_{15} = 116,2$ ppm. Estes sinais apresentaram valores de desvio químico de acordo com o tabelado na literatura: $\delta C_{14} = 136,2$ ppm e $\delta C_{15} = 115,9$ ppm.^[62] O C₁₃ foi também identificado a $\delta = 34,6$ ppm, o que corrobora a síntese deste derivado. Adicionalmente, por espectroscopia de IV comprovou-se a presença da dupla ligação sendo evidente uma banda a 1627 cm⁻¹.

A pureza do composto final foi demonstrada pelo ponto de fusão obtido (72-75°C), o qual se encontra de acordo com o descrito por Paul O'Neill *et al.*^[68]

- **Anidro-artemisinina (64, AHA)**

Com o objectivo de comprovar se realmente o produto secundário sintetizado era o composto AHA (**64**) formado por desidratação, procedeu-se à sua completa caracterização por espectroscopia de IV e RMN.

Pelo espectro de ^1H -RMN (Figura 2.11) foi possível identificar o protão em C_{10} com $\delta = 6,19$ ppm, característico de um sistema alílico. Dadas as características da dupla ligação é possível o acoplamento entre o protão em C_{10} e os protões do grupo metilo ligados ao C_9 , com constantes de acoplamento baixas que variam entre 0-3 Hz.^[62] Tal facto justifica a multiplicidade observada para o sinal correspondente aos protões do grupo metilo em C_9 , que aparece como um *duplete* a $\delta = 1,59$ ppm. Adicionalmente, é de salientar o desaparecimento do sinal correspondente ao protão em C_9 , o que reforça a presença da dupla ligação. O protão em C_{12} manteve o valor de $\delta = 5,54$ ppm, bem como os restantes.

Pelo espectro de ^{13}C -RMN observou-se o desvio químico do C_9 e C_{10} a 108,3 e 135,1 ppm, respectivamente, o que se encontra de acordo com os valores descritos na literatura.^[62,68]

Por espectroscopia de IV foram identificadas as bandas características do sistema alílico (1639 cm^{-1}) e da ponte peroxídica (991 cm^{-1}), o que corrobora a identificação do composto secundário obtido como sendo o AHA (**64**). A pureza do mesmo foi avaliada pelo ponto de fusão: $87\text{-}91^\circ\text{C}$.

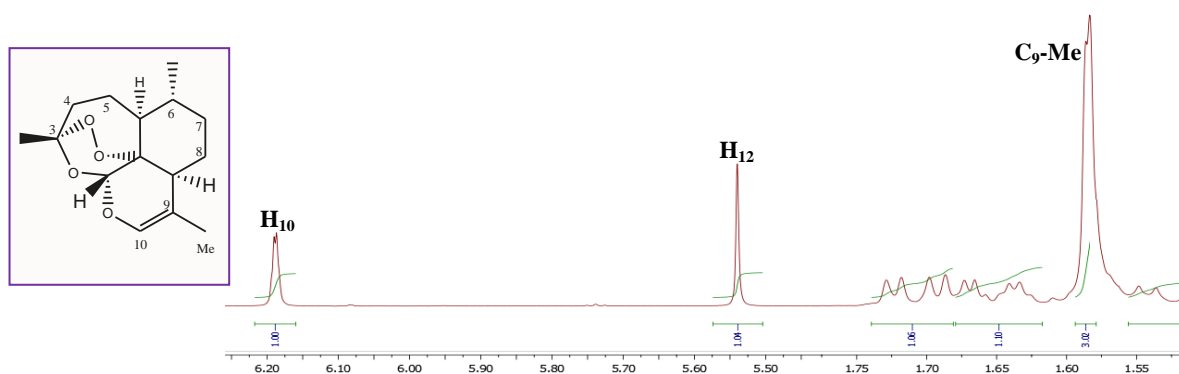


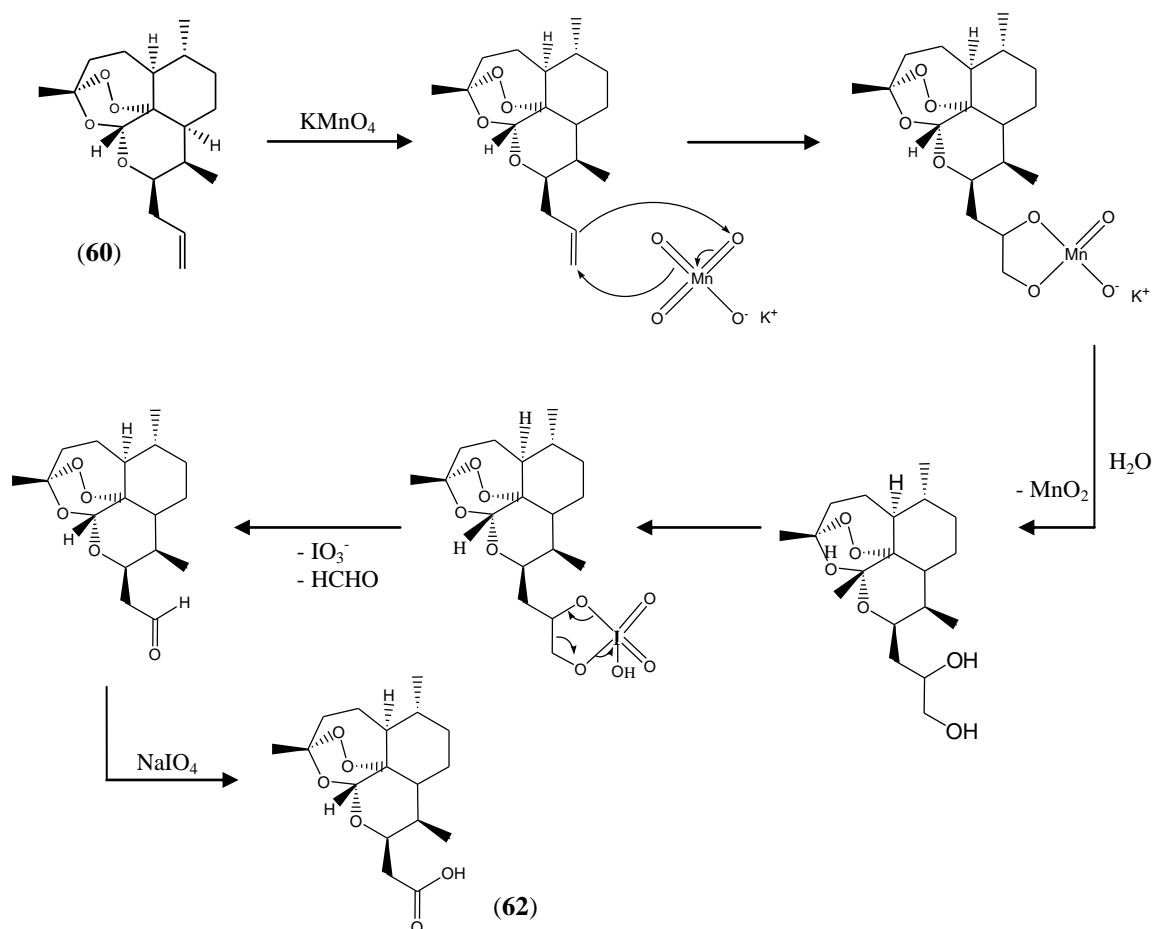
Figura 2.11

Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do produto secundário AHA (**64**).

2.1.4 Derivado ácido carboxílico (62)

O derivado **62** foi obtido por oxidação do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (**60**). O procedimento, descrito por Lemieux e Ruudloff, baseou-se no uso de uma mistura de permanganato de potássio (KMnO₄) e metaperiodato de sódio (NaIO₄). A presença deste último em solução é fundamental dado ser o responsável pela regeneração cíclica do MnO₄⁻, do estado reduzido ao estado oxidado. Esta regeneração ocorre preferencialmente a pH entre 7 e 10.^[70,71]

O mecanismo proposto para a síntese do derivado **62** encontra-se descrito no Esquema 2.6. Resumidamente, o processo sintético divide-se em dois passos principais: i) oxidação da dupla ligação presente no derivado **60**, catalisada pelo ião permanganato (MnO₄⁻) e ii) clivagem do grupo diol formado, por acção do ião periodato (IO₄⁻). O aldeído, é rapidamente oxidado ao correspondente ácido carboxílico, obtendo-se o produto com elevado rendimento (89%).^[70,71,72] O derivado foi caracterizado espectroscopicamente por IV e RMN.



Esquema 2.6

Possível mecanismo de síntese do derivado 10-Carba da ART contendo o grupo funcional carboxilo terminal (**62**), através da oxidação do derivado **60** com KMnO₄ e NaIO₄. Adaptado de [7,8].

De modo a confirmar a ocorrência de oxidação analisou-se no espectro de ^{13}C -RMN a presença de um sinal característico do grupo carbonilo que apareceu a $\delta = 174,4$ ppm, de acordo com o esperado para um carbono carbonílico de um ácido carboxílico (δ 160-195 ppm).^[62,69] Adicionalmente, no espectro de ^1H -RMN verificou-se a ausência dos sinais característicos da dupla ligação. Neste espectro foram ainda evidentes os prótons em C_{10} e C_{12} com $\delta = 4,86$ e $5,37$ ppm, respectivamente.

A multiplicidade do próton em C_{10} (*septeto*) foi analisada detalhadamente de modo a garantir que a configuração β se mantinha neste carbono. Tal ficou comprovado, de acordo com o referido anteriormente para o derivado **61**.

Com o objectivo de identificar os prótons em C_{13} procedeu-se à análise do espectro bidimensional COSY, através do acoplamento destes com o próton em C_{10} (Figura 2.12).

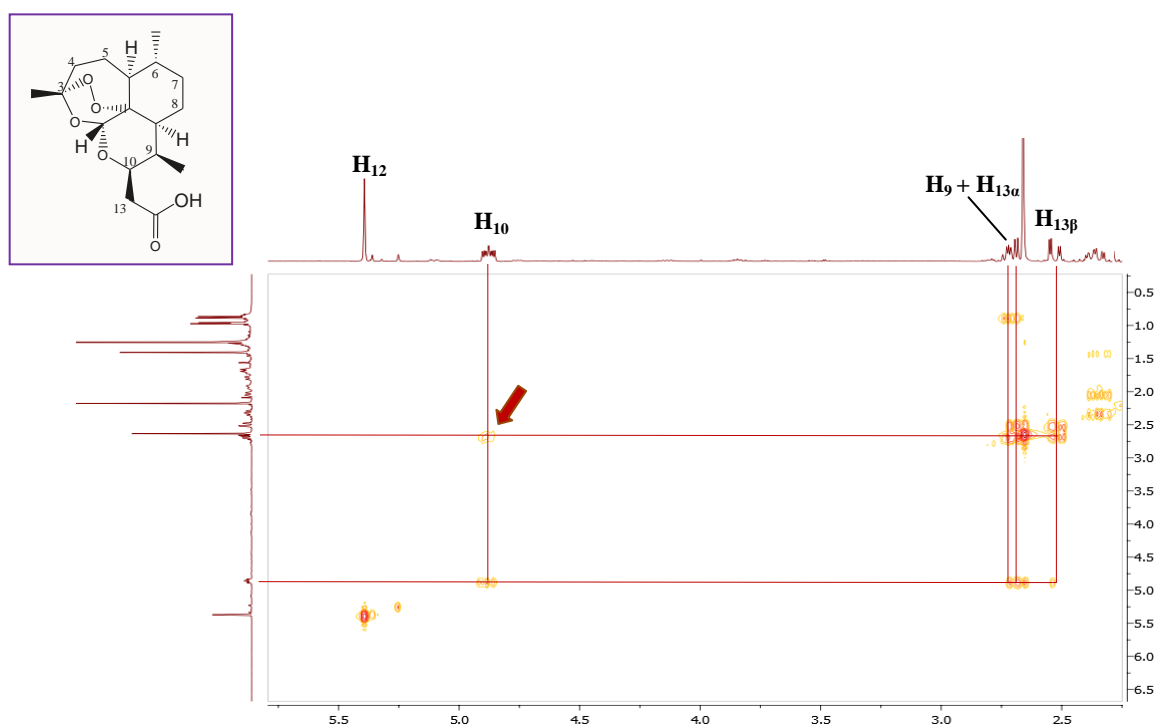


Figura 2.12

Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado ácido carboxílico (**62**), evidenciando a interacção entre os prótons em C_9 , C_{10} e C_{13} .

Com base neste espectro verificou-se o acoplamento de ambos os prótons $\text{H}_{13\alpha}$ e H_9 com o próton em C_{10} , aparecendo o sinal como um *multipeto* com $\delta = 2,77$ - $2,65$ ppm (assinalado na

Figura 2.12). Adicionalmente, o próton em C_{13} com configuração β foi identificado a $\delta = 2,50$ ppm apresentando-se como um *dupleto de dupletos*. Esta multiplicidade deve-se ao facto de estes prótons metilénicos $-CH_2$, adjacentes a um centro quiral (C_{10}), não serem magneticamente equivalentes. Assim, e especificamente no caso do sinal a 2,50 ppm, foram calculadas duas constantes de acoplamento distintas que deram origem à referida multiplicidade: $J = 16$ Hz e $J = 3,6$ Hz (Figura 2.13).

Pelo espectro de IV foram identificadas as duas bandas características deste derivado, que comprovam o resultado da oxidação: 3436 e 1634 cm^{-1} correspondentes, respectivamente, ao grupo hidroxilo e grupo carbonilo da função ácido carboxílico^[62]

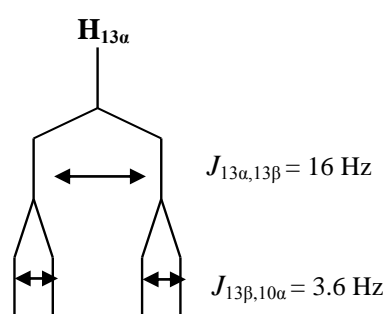


Figura 2.13

Diagrama representativo do acoplamento entre o próton $H_{13\alpha}$ e os prótons H_{β} em C_{13} e H_{α} em C_{10} , do derivado ácido carboxílico (62).

2.1.5 Derivado aldeído (59)

A elevada instabilidade dos compostos com função aldeído dificulta a síntese deste tipo de derivados. Inúmeros procedimentos têm sido testados, nos quais é fundamental garantir a ausência de purificações posteriores, por cromatografia de coluna, o que seria prejudicial.^[73]

Um dos estudos mais relevantes, relatados na literatura, surgiu em 1981 quando Nahm e Weinreb propuseram o uso de *N*-metoxi-*N*-metilamidas (mais conhecidas por amidas de Weinreb) na síntese de compostos com o grupo funcional cetona/aldeído. Desde então, inúmeros procedimentos sintéticos têm sido desenvolvidos de modo a converter derivados com o grupo carboxilo nas correspondentes amidas de Weinreb que, posteriormente por redução, originam o composto aldeído. Com base nesta abordagem, e de acordo com o procedimento experimental utilizado por Fehrentz e Bertrand na síntese de α -aminoaldeídos a

partir de α -aminoácidos, procedeu-se à conversão da função carboxilo do derivado **62** na correspondente amida de Weinreb (**63**).^[73,74]

A formação da amida a partir do ácido carboxílico **62** requer uma activação prévia. Este primeiro passo de activação pode ser efectuado de duas maneiras: i) por conversão do grupo carboxílico num grupo funcional mais reactivo, como haletos de ácido ou anidridos, ou ii) recorrendo ao uso de reagentes de acoplamento. A segunda abordagem apresenta resultados mais promissores, encontrando-se disponíveis comercialmente inúmeros reagentes usados para este fim. Recentemente, novos compostos de acoplamento têm sido relatados na literatura, de entre os quais se destacou o tetrafluoroborato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio (TBTU, **65**, Esquema 2.7).^[74,75,76,77]

O TBTU é um sal de urónio que actua, com elevado grau de eficiência, como agente de acoplamento na síntese de inúmeros péptidos. Comparativamente com outros compostos com a mesma função, o TBTU é solúvel na maioria dos solventes orgânicos usados, sendo bastante estável em solução. Após reacção gera como produto secundário o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt), solúvel em água e com baixa toxicidade associada. Adicionalmente, encontra-se disponível comercialmente, é fácil de manusear e não necessita de procedimentos complexos aquando do *work-up* da mistura reaccional.^[76,77]

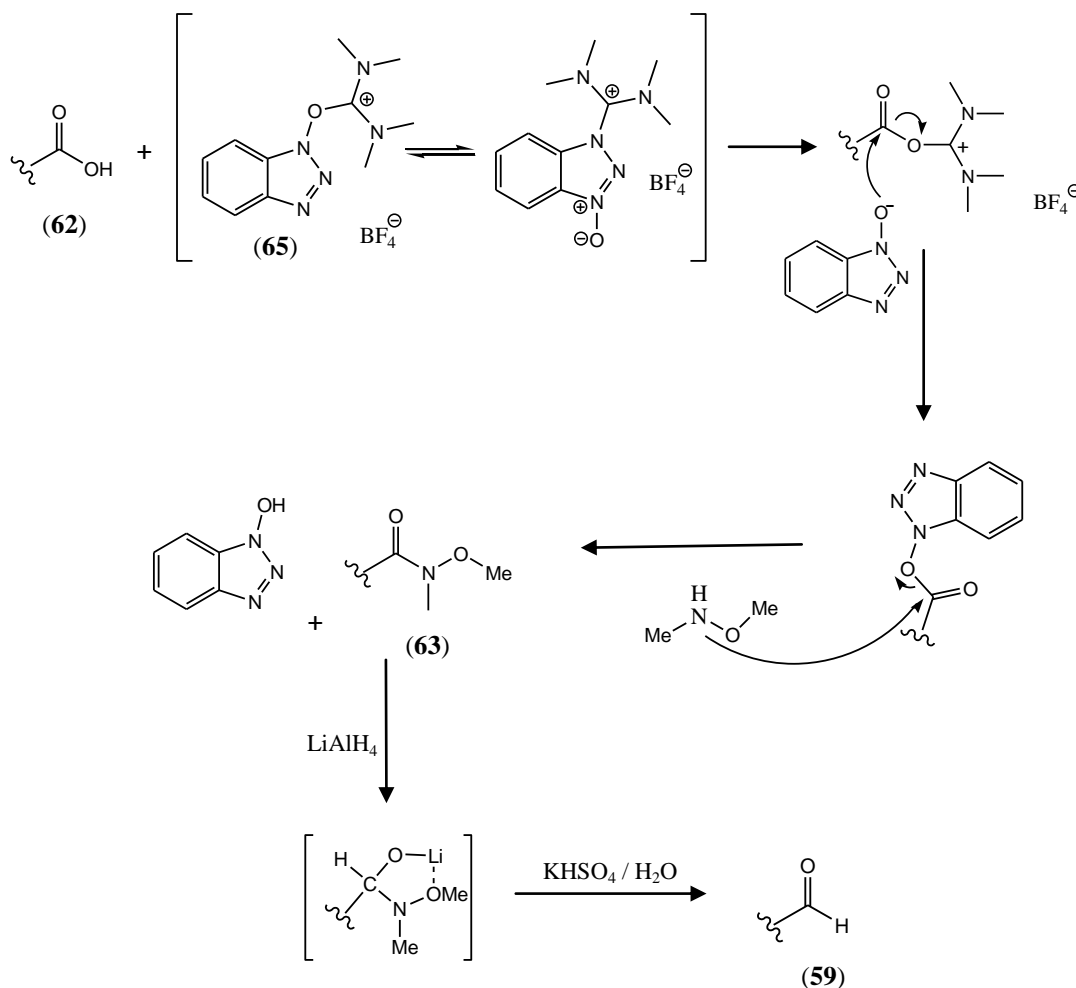
O mecanismo proposto para o processo de activação do derivado **62**, seguido de reacção nucleofílica com o cloridrato da *O,N*-dimetil-hidroxilamina, e síntese do intermediário hidroxamato **63** (amida de Weinreb) encontra-se descrito no Esquema 2.7.

A síntese da amida de Weinreb, correspondente ao derivado ácido carboxílico anterior, foi confirmada por espectroscopia de IV, ¹H-RMN e técnica bidimensional de COSY.

Com base no espectro de ¹H-RMN (Figura 2.14) foram facilmente identificados os grupos -Me e -OMe ligados ao átomo de N, com $\delta = 3,20$ e $3,71$ ppm, respectivamente. Ambos os grupos aparecem como *singuletos*. Tipicamente, o protão em C₁₂ foi identificado também como um *singuleto* a $\delta = 5,35$ ppm.

Tal como obtido para o derivado ácido carboxílico, o protão em C₁₀ foi identificado como um *multipletto* a $\delta = 4,84$ ppm. Ambos os protões em C₁₃ apresentaram semelhante desvio químico comparativamente ao composto intermediário anterior, verificando-se novamente que o sinal para o H_{13 α} aparece a campo ligeiramente mais baixo ($\delta = 2,90$ ppm) que o H_{13 β} ($\delta = 2,46$ ppm). Este último diastereoisómero voltou a surgir com multiplicidade distinta, *dupletto de dupletos*, sendo o valor das constantes calculadas sensivelmente diferentes - $J = 15,2$ Hz e $J = 4,4$ Hz – mas de acordo com o intervalo de valores tabelado na literatura.^[62]

Por espectroscopia de IV forma identificadas as bandas correspondentes aos grupos N-Me e N-OMe a 1279 e 1188 cm^{-1} , respectivamente.



Esquema 2.7

Mecanismo proposto para a formação da amida de Weinreb **63** (intermediário hidroxamato) e síntese, por redução com LiAlH_4 , do derivado aldeído **59**. Adaptado de [12,13].

Posteriormente, por simples redução de **63** com LiAlH_4 obteve-se o derivado aldeído (**59**) pretendido (Esquema 2.7) que foi identificado por espectroscopia de IV, $^1\text{H-RMN}$ e COSY.

A identificação de um próton com $\delta = 9,90$ ppm permitiu confirmar a síntese do derivado aldeído. Adicionalmente, foi evidente o desaparecimento dos sinais correspondentes aos grupos N-Me e N-OMe, o que confirma a ocorrência de redução do derivado **63**.^[62]

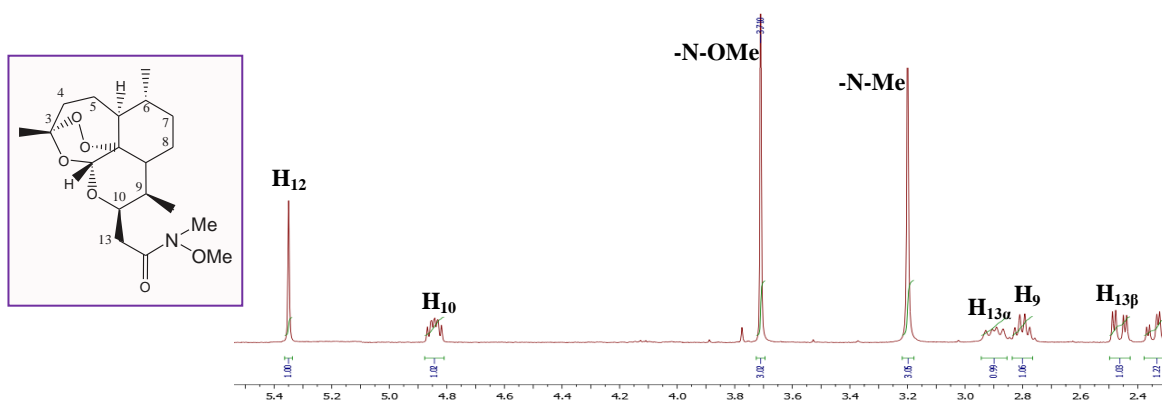


Figura 2.14

Representação parcial do espectro de ^1H -RMN do derivado hidroxamato (**63**, amida de Weinreb).

Os prótons característicos em C_{12} e C_{10} encontram-se presentes, com desvios químicos semelhantes aos do derivado anterior ($\delta = 5,28$ e $3,98$ ppm). Os prótons em C_{13} foram identificados com base no espectro bidimensional de COSY, por acoplamento com o próton em C_{10} (Figura 2.15). Não foi possível identificar a multiplicidade de sinal destes prótons, sendo ambos caracterizados como um *multipletto*, devido à sobreposição com outros prótons da estrutura do derivado.

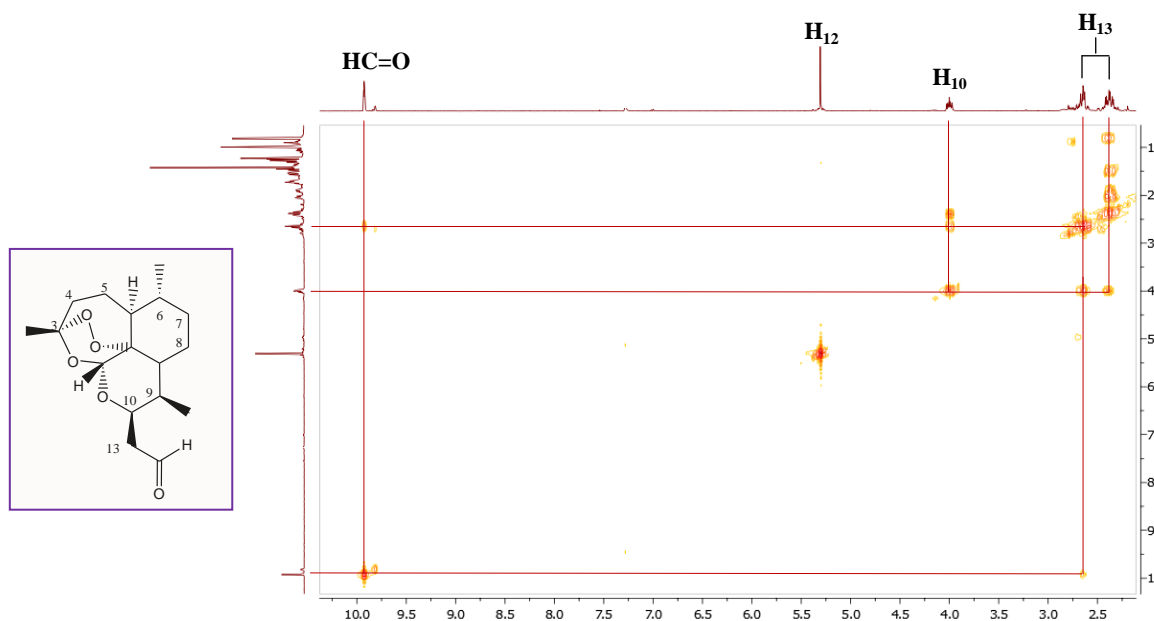


Figura 2.15

Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do derivado aldeído (**59**), evidenciando a interação entre o próton em C_{10} e os prótons em C_{13} .

Através da análise deste espectro identificou-se ainda o acoplamento entre um dos prótons em C_{13} e o próton do grupo aldeído, aparecendo o sinal deste último como um *multiplete*.

2.1.6 Aaminação Redutiva: Composto híbrido ART-PQ (58)

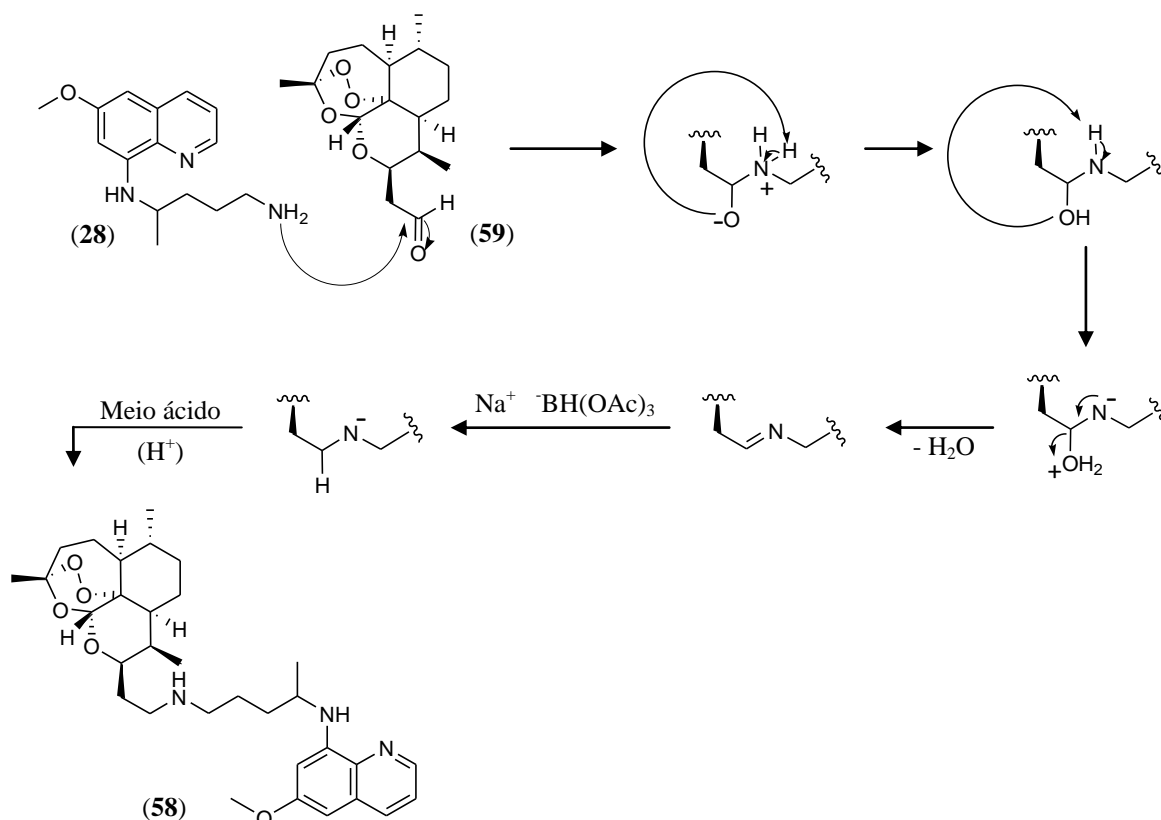
Existem inúmeros procedimentos para a preparação de amins descritos na literatura. Um dos métodos mais utilizado inclui a redução de grupos funcionais contendo o átomo de N, tais como grupo nitro ($-NO_2$), ciano ($-C\equiv N$), azida ($-N_3$) e derivados carboxamidas ($-CO-NH_2$). Alternativamente é comum proceder-se à alquilação da amónia, amins primárias ou secundárias, no qual se pode usar como agentes de alquilação sulfonatos e haletos de alquilo. Contudo este método não é o principal no que respeita à síntese de amins secundárias e terciárias. Para síntese deste tipo de composto a aaminação redutiva, procedimento que consiste na reacção entre aldeídos/cetonas e a amónia na presença de um agente redutor (Esquema 2.7), é o método mais utilizado.^[78,79,80]

De um modo geral, a reacção por aaminação redutiva envolve a formação inicial de um intermediário carbinolamina o qual, por desidratação, origina uma imina (base de Schiff). A imina nas condições da reacção (pH ligeiramente ácido) é protonada formando o ião imínio. Por redução deste obtem-se o produto final amina. A escolha do agente redutor é um passo crítico no sucesso da reacção, dado que este composto deve reduzir selectivamente as iminas (ou iões imínio), sem reagir com os compostos aldeído/cetona presentes na mistura reaccional. Tradicionalmente, a reacção de aaminação redutiva pode ocorrer por hidrogenação catalítica ou por acção de hidretos, sendo este último mais utilizado.^[78,80]

Em 1963, Schellenberg reportou o uso de $NaBH_4$ como agente redutor. Contudo, a falta de selectividade deste composto levou à sua substituição por $NaBH_3CN$, em 1971. Este agente tinha a vantagem de apresentar diferente selectividade consoante o pH da mistura reaccional, catalisando a redução de aldeídos/cetonas a pH 3-4 ou de iminas a pH 6-8. Por outro lado, o facto de ser extremamente tóxico, produzir HCN e NaCN também tóxicos e originar alguns produtos secundários revelou algumas desvantagens no seu uso. Assim, inúmeras outras alternativas foram consideradas, de entre as quais se refere: complexos de borano-piridina, $Ti(OiPr)_4/NaBH_3CN$, $Zn/AcOH$, $NaBH_4/Mg(ClO_4)_2$ e $Zn(BH_4)_2/ZnCl_2$. Em 1989 o uso de $NaBH(OAc)_3$ como agente redutor ultrapassou muitas dessas desvantagens. O facto de

apresentar propriedades redutoras moderadas e uma notável selectividade, fez deste composto o agente redutor de eleição, e por isso foi o escolhido para este trabalho experimental.^[78,79,80]

O mecanismo de síntese do composto híbrido **58**, por aminação redutiva entre o derivado aldeído (**59**) e a PQ (**28**), na presença de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ como agente redutor, encontra-se descrito no Esquema 2.8.



Esquema 2.8

Mecanismo de síntese do composto híbrido final **58** por aminação redutiva entre o derivado aldeído (**59**) e PQ neutra (**28**), na presença de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ como agente redutor. Adaptado de [15,16].

O protocolo experimental utilizado para a síntese do composto híbrido final **58** encontra-se descrito no capítulo IV. Foi necessária a prévia neutralização da PQ que se encontra na forma de difosfato e, de modo a otimizar o procedimento aplicadas várias condições experimentais foram testadas. Numa primeira fase fez-se variar o número de equivalente do agente redutor relativamente ao reagente limitante (aldeído **58**), tendo-se posteriormente variado o número de equivalente de ácido acético e PQ. Verificou-se que se obtinham melhores resultados quando se faziam recargas do hidreto e ácido acético. O composto híbrido final (**59**), obtido

com um rendimento de 63% após purificação por cromatografia em coluna, foi caracterizado por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e técnicas bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC.

2.1.6.1 Primaquina Neutra (28)

Por espectroscopia de ^1H -RMN (Figura 2.16) e COSY foi possível identificar os dois aspectos mais característicos da estrutura da PQ, nomeadamente, os prótons do sistema quinolínico e os prótons diastereotópicos adjacentes ao carbono quiral. De acordo com Clark *et al.*^[81] e Seaton *et al.*^[82] o próton quinolínico em C_2 é o mais desblindado devido à proximidade com o átomo de N, apresentando um sinal com $\delta = 8,52$ ppm. Devido ao acoplamento com os prótons em C_3 na posição *orto* e em C_4 na posição *meta* este sinal aparece como um *dupleto de dupletos* com as respectivas constantes de acoplamento: $J = 4,0$ Hz e $J = 1,6$ Hz. O mesmo se verificou para os prótons em C_4 e C_3 que ressoam, respectivamente, a $\delta = 7,93$ ppm ($J = 8,4$ Hz e $J = 1,6$ Hz) e $\delta = 7,30$ ppm ($J = 8,0$ Hz e $J = 4,0$ Hz). Devido ao ambiente químico no qual estes prótons estão inseridos, comparativamente à proximidade dos prótons em C_5 e C_7 ao grupo -OMe, encontram-se mais desblindados aparecendo o seu sinal a campo mais baixo (ver estruturas de ressonância no Esquema 2.9). Por sua vez, os prótons em C_5 e C_7 encontram-se a campo ligeiramente mais alto, com sinal característico a $\delta = 6,32$ ppm e $\delta = 6,28$ ppm, respectivamente. Ambos apareceram como um *dupleto* com $J = 2,4$ Hz dado que apenas acoplam entre si. Com excepção do valor da constante de acoplamento entre os prótons aromáticos em C_2 e C_3 , os restantes valores calculados encontram-se de acordo com o referido na literatura^[62] A razão pela qual este valor de J é ligeiramente inferior ao intervalo tabelado ($J_{\text{H,H,orto}} = 6-10$ Hz) advém do facto de o próton em C_2 estar adjacente ao átomo de N, bastante electronegativo, o que altera o seu comportamento magnético.

Relativamente aos prótons diastereotópicos adjacentes ao centro quiral em C_1 , estes foram identificados a campo alto com sinal sobreposto ao dos prótons metilénicos em C_3 . Assim, $\delta_{\text{H}_2} = \delta_{\text{H}_3}$, que varia entre os 1,76 – 1,54 ppm. O próton em C_1 foi identificado a $\delta = 3,61$ ppm, aparecendo o sinal como um *multipeto* devido ao acoplamento com os prótons diastereotópicos em C_2 . Já os prótons em C_4 apareceram como um *tripeto* ($J = 6,8$ Hz) a 2,73 ppm.

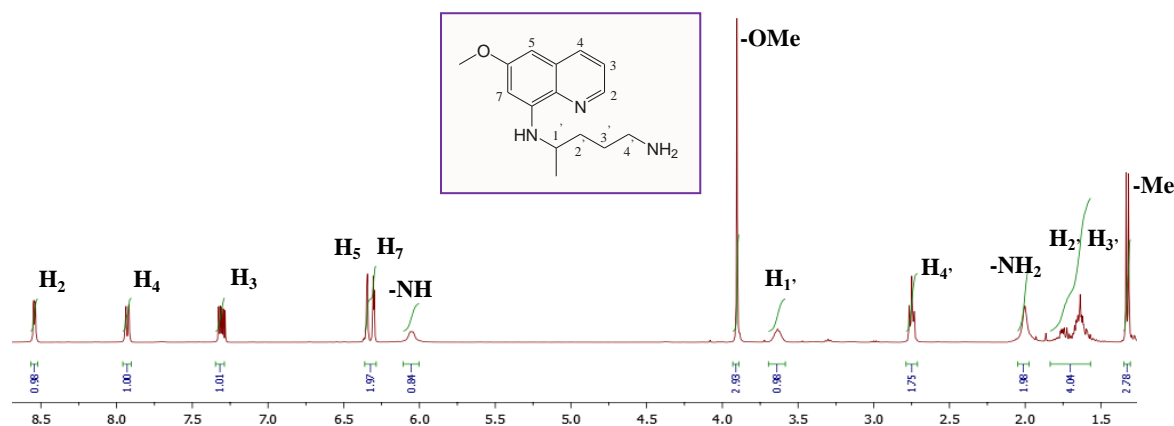
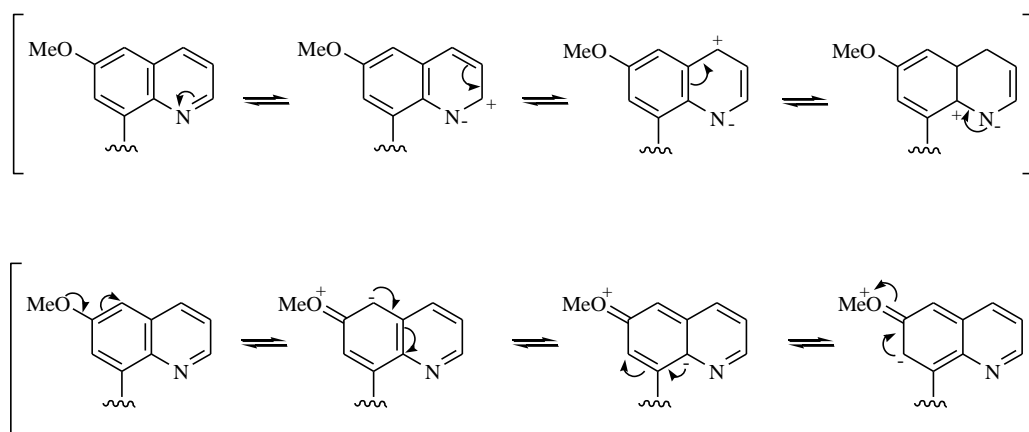


Figura 2.16

Representação do espectro de ¹H-RMN da Primaquina na forma neutra (28).



Esquema 2.9

Representação esquemática das possíveis estruturas de ressonância do anel quinolínico da PQ (28).

Por espectroscopia de ¹³C-RMN e técnicas bidimensional HMQC, os carbonos do sistema quinolínico foram identificados a campo baixo, tal como esperado para carbonos aromáticos e de acordo com a literatura.^[62] O C₆ (δ = 159,9 ppm) foi identificado como o mais desblindado, pela ligação ao grupo -OMe, encontrando-se o C₂ a campo ligeiramente mais alto (δ 144,7 ppm). Ambos os desvios químicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura: δC_{Ar}-OMe = 159,9 ppm e δC_{Ar}-NH = 150,2 ppm.^[62]

Por espectroscopia de IV foram ainda evidentes as quatro bandas características do sistema quinolínico (1616, 1593, 1578 e 1520 cm⁻¹) de intensidade forte/média entre os 1625 e 1500 cm⁻¹.

2.1.6.2 Composto híbrido ART-PQ (58)

Após sintetizado o composto híbrido final, foi convertido da forma neutra para a forma de sal de modo a tornar-se mais estável e menos susceptível de sofrer degradação. O procedimento aplicado aquando da realização desta reacção, com uso de ácido succínico, encontra-se descrito no capítulo IV. A caracterização completa do composto híbrido final **58** na forma de sal fez-se, posteriormente, por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e técnicas bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC. Adicionalmente, comprovou-se por espectrometria de massa de alta e baixa resolução e análise elementar.

Com base no espectro de ^1H -RMN (Figura 2.17) foram identificados a campo baixo os sinais característicos do sistema quinolínico da PQ, não sendo evidentes alterações no desvio químico destes protões. O protão do carbono quiral em $\text{C}_{1'}$ foi também identificado, aparecendo como um *multipeto* com $\delta = 3,60$ ppm. Relativamente à estrutura da ART, os protões mais característicos foram igualmente identificados. Ambos os protões em C_{12} e C_{10} foram identificados, aparecendo como um *singuleto* e *multipeto* a $\delta = 5,28$ ppm e 4,38 ppm, respectivamente. O protão em C_9 apareceu como um *multipeto* com desvio químico entre os 2,47-2,42 ppm.

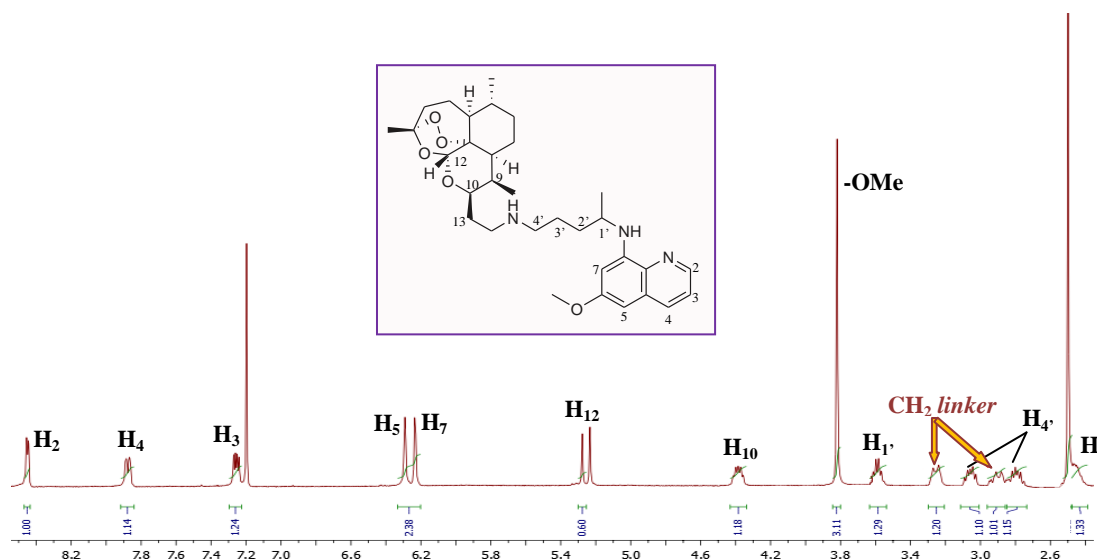


Figura 2.17

Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido ART-PQ (**58**).

A síntese do híbrido pretendido foi confirmada pela presença de dois sinais adicionais, com desvio químico a 3,26 e 2,89 ppm, correspondentes aos 2H do grupo CH_2 do *linker* entre ambos os farmacóforos. Ambos os sinais aparecem como um *multipeto* devido ao

acoplamento com os prótons diastereotópicos em C₁₃ (Figura 2.18), que ressoam a campo mais alto, com desvio químico a cerca de 2,08 e 1,65 ppm. Os prótons em C₄, da estrutura da PQ foram identificados a campo mais baixo, com $\delta = 3,06$ e 2,80 ppm, pela ligação com o átomo de azoto terminal. A atribuição e acoplamento de todos estes prótons foram confirmados pelas técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC.

Por espectroscopia de ¹³C-RMN e técnica bidimensional HMQC, verificou-se que o carbono do grupo metilénico CH₂ do *linker* apresenta um sinal com $\delta = 48,02$ ppm. Este valor encontra-se em concordância com os valores tabelados na literatura, sendo este C mais desblindado devido à proximidade com o átomo de N.^[62,69]

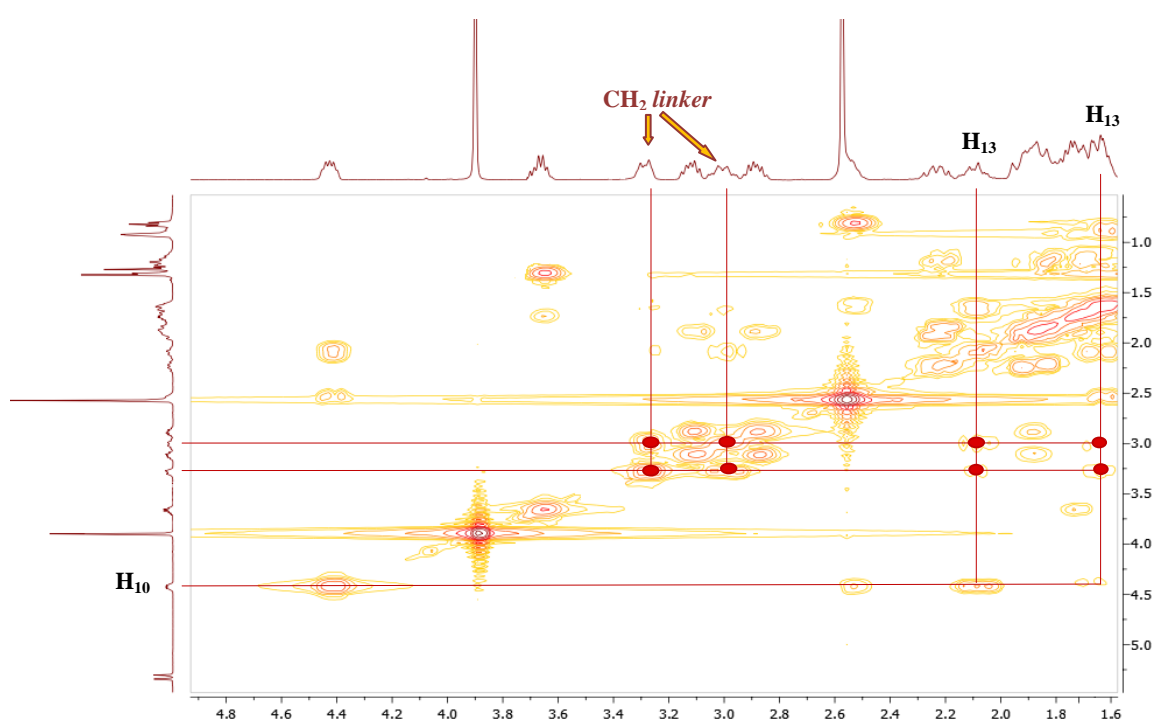


Figura 2.18

Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do composto híbrido ART-PQ (**58**). Encontram-se evidenciados os acoplamento dos prótons metilénicos do grupo -CH₂ do *linker* com os prótons em C₁₃ na ART.

A fórmula molecular do composto híbrido ART-PQ (**58**), na forma de sal, foi determinada por Análise Elementar obtendo-se C₃₆H₅₃N₃O₉. Este resultado encontra-se de acordo com o esperado confirmando o composto final sintetizado. Por Massa de Alta Resolução obteve-se o ião molecular para o composto na forma neutra: [M + H]⁺ a m/z 554,3549 (calculado para C₃₂H₄₇N₃O₅: 553,3516 g.mol⁻¹).

2.2. Síntese dos Híbridos 1,2,4,5-Tetraoxano - Primaquina

Conforme referido no Capítulo I, após síntese do composto híbrido ART-PQ sintetizaram-se dois novos compostos híbridos: **66** e **70**. Ambas as retrosínteses estão apresentadas no Figura 2.19 e as vias sintéticas adoptadas para síntese dos intermediários de interesse no Esquema 2.10.

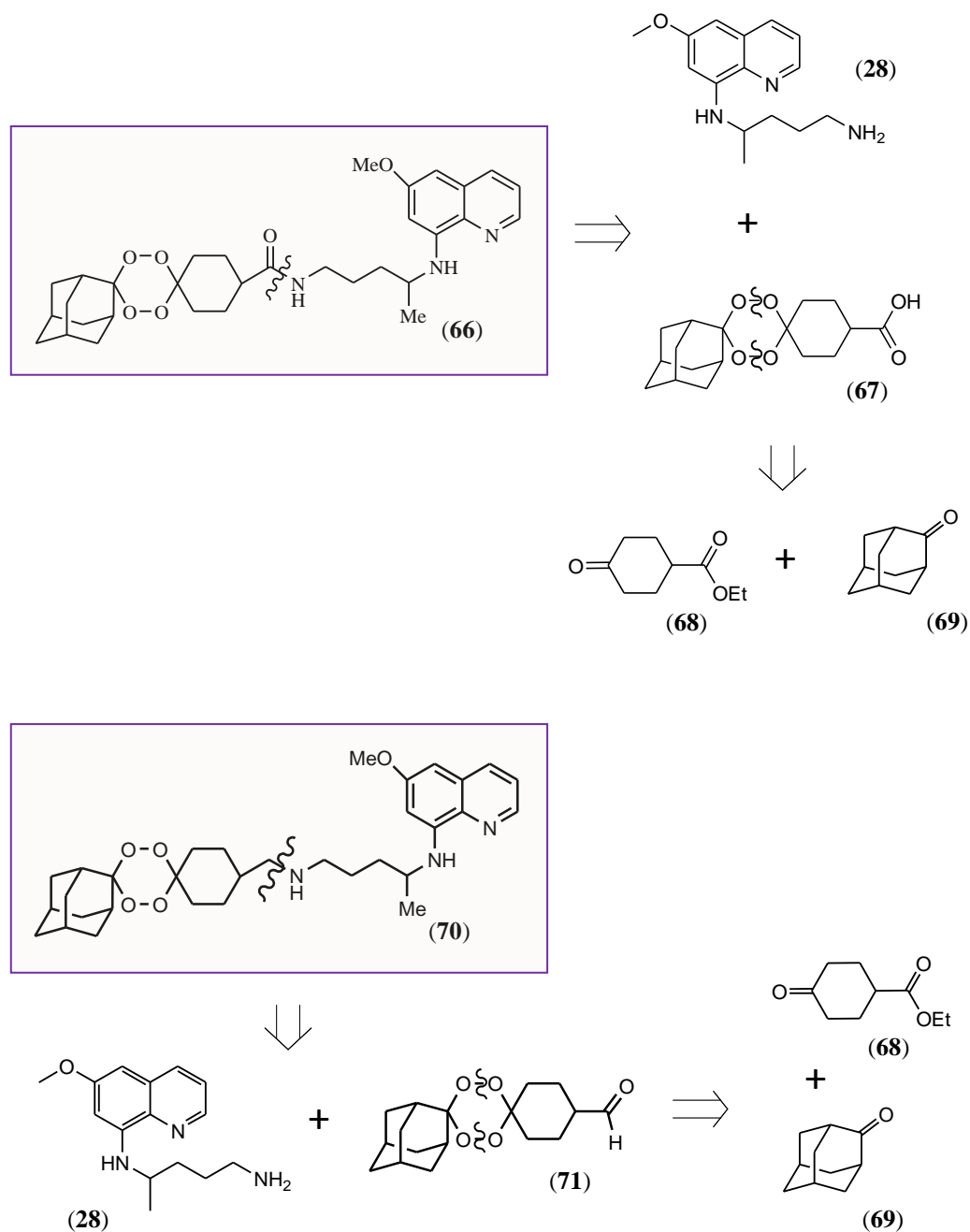
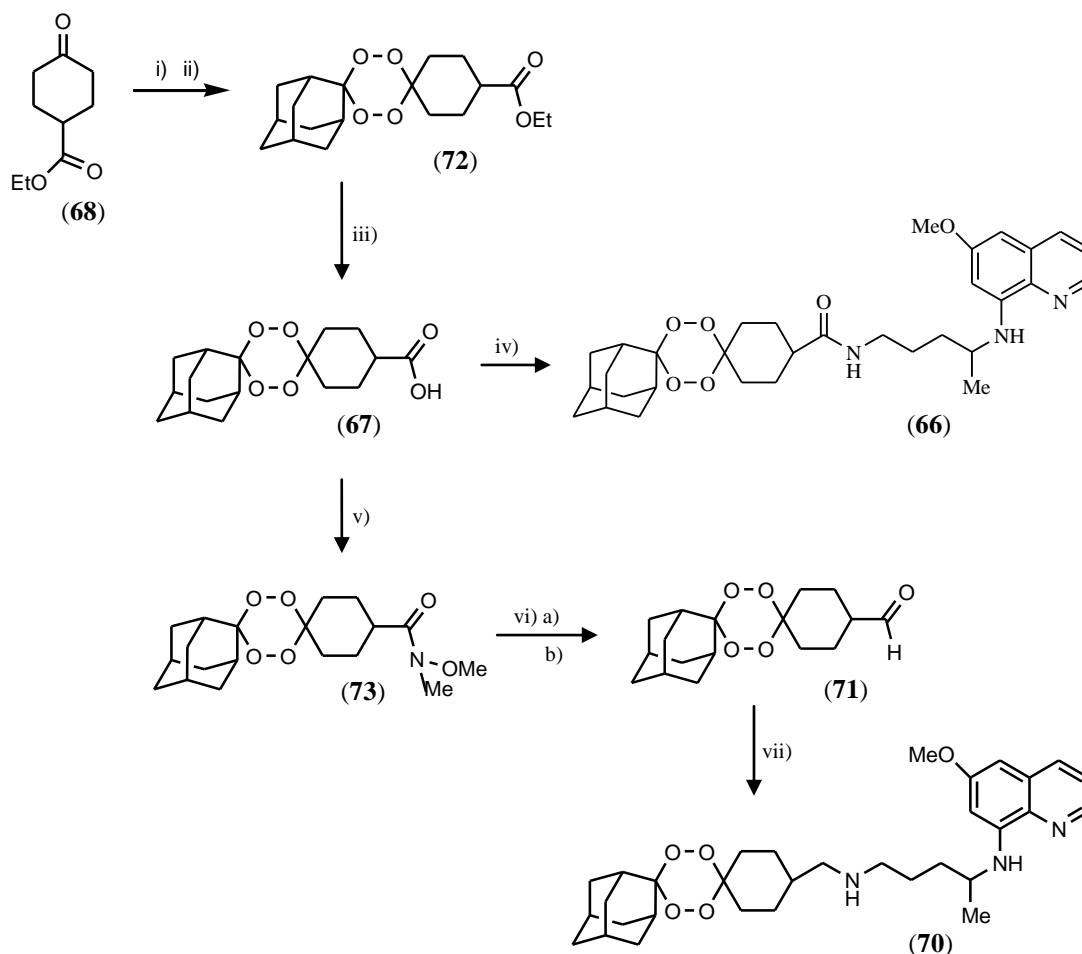


Figura 2.19

Análise retrosintética dos compostos híbridos **66** e **70**.



Esquema 2.10

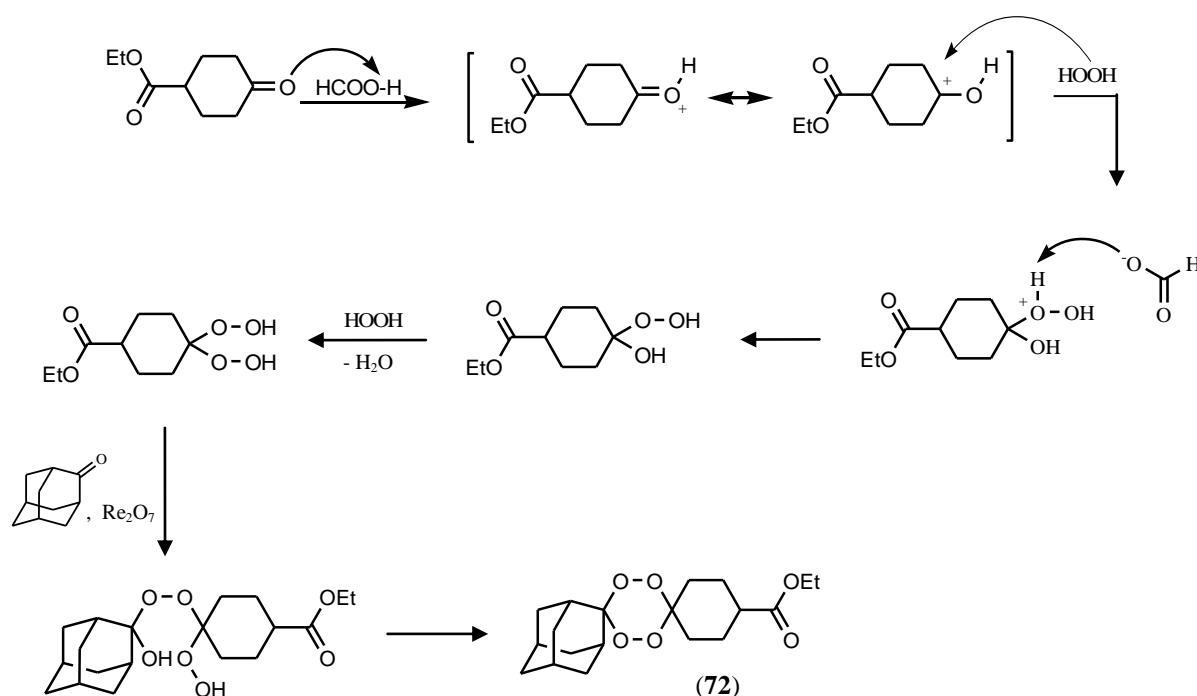
Reacções químicas efectuadas na síntese dos compostos híbridos **66** e **70**. **Reagentes e condições:** **i)** HCO₂H, ACN, H₂O₂, 50%, t.a.; **ii)** Re₂O₇, DCM, 2-adamantanona, t.a.; **iii)** NaOH 10M, MeOH, 80°C; **iv)** Primaquina difosfato, TBTU, TEA, DCM, 0°C; **v)** TBTU, TEA, DCM, N,O-dimetilhidroxilamina.HCl, t.a.; **vi)** a) LiAlH₄, THF, 0°C, b) KHSO₄ (solução aquosa); **vii)** Primaquina neutra, NaBH(CH₃COO)₃, CH₃CO₂H, DCM, t.a.

2.2.1 Derivado éster (72)

Do conjunto de procedimentos experimentais descritos na literatura para a síntese de tetraoxanos, é possível concluir que o passo fundamental consiste na oxidação do composto de partida e posterior conversão, do hidroperóxido intermediário obtido, num peróxido cíclico (Esquema 2.11). Dada a instabilidade química que esta classe de compostos apresenta, especialmente o hidroperóxido intermediário, a escolha dos reagentes e condições de reacção compatíveis com os mesmos é por norma limitada. Dos inúmeros procedimentos referidos por diferentes grupos, o método aplicado neste trabalho experimental baseou-se no reportado por O'Neill *et al.*⁸³, segundo o qual se efectuou: i) a oxidação de um composto carbonílico por

acção de H_2O_2 , envolvendo catálise ácida, e ii) posterior ciclização a partir de um dihidroperóxido intermediário (Esquema 2.11). Este procedimento é o mais referido e utilizado, ocorrendo geralmente na presença de ácido.^[83,84]

O composto **72** foi obtido com um rendimento de 47%, após purificação por cromatografia em coluna. A caracterização do composto foi efectuada por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e técnica bidimensional de COSY.



Esquema 2.11

Mecanismo proposto para síntese do derivado éster tetraoxano (**72**).

Verificou-se que no espectro de ^1H -RMN (Figura 2.20), os prótons metilénicos da função éster apareciam a campo mais baixo que o normal para estes prótons, devido à desblindagem causada pelo átomo de oxigénio adjacente. Ambos os desvios químicos a 4,13 ppm e 1,24 ppm, este último atribuído ao grupo metilo adjacente, encontram-se de acordo com os valores referidos na literatura. Adicionalmente, identificou-se um pico largo com desvio químico entre os 2,45 – 2,35 ppm, atribuído ao próton em C_7 .

Pelo espectro de ^{13}C -RMN confirmou-se a presença da função éster no derivado sintetizado aparecendo o sinal do carbono carbonílico a 174,8 ppm. Este valor encontra-se em concordância com o característico para este grupo funcional.^[62,69]

O espectro de IV permitiu comprovar o grupo carbonilo, pela banda a 1732 cm^{-1} , bem como a ponte peróxídica pela presença de uma banda característica a 923 cm^{-1} . A pureza do composto após purificação por coluna foi confirmada pelo ponto de fusão: $75\text{-}78^\circ\text{C}$.

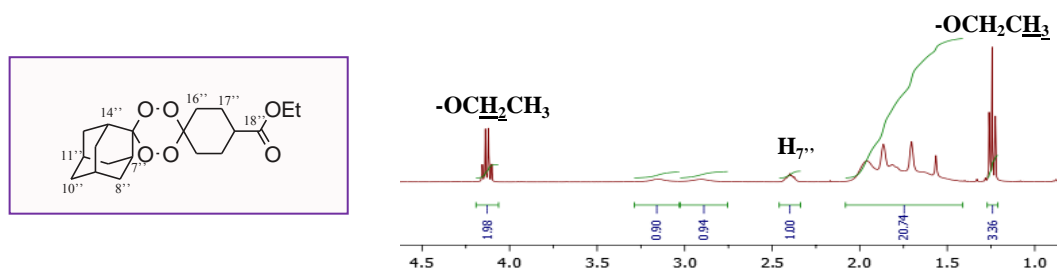


Figura 2.20

Representação do espectro de ^1H -RMN do derivado éster tetraoxano (**72**).

2.2.2 Derivado ácido (67)

Para se proceder ao acoplamento da primaquina à estrutura do tetraoxano, de modo a obter os compostos híbridos finais, é necessário hidrolisar a função éster do composto **72** a ácido carboxílico. Segundo estudos reportados por Opsenica *et al.*⁸⁵, os tetraoxanos são compostos consideravelmente estáveis tanto em condições básicas como ácidas, bem como na presença de agentes redutores, como por exemplo, NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, NaBH_4 , LiAlH_4 , entre outros. Deste modo torna-se viável a aplicação de um procedimento de hidrólise a altas temperaturas, usando uma base forte como NaOH .

O produto foi caracterizado por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e técnica bidimensional de COSY, tendo-se verificado a ausência dos picos correspondentes ao grupo etilo ligado ao átomo de oxigênio da função éster. Adicionalmente, a identificação do carbono carbonílico com $\delta = 180,3\text{ ppm}$ no espectro de ^{13}C -RMN confirmou o composto.

2.2.3 Híbrido com função amida (66)

Para a síntese de amidas recorre-se frequentemente ao uso de agentes de acoplamento, tal como referido previamente aquando da síntese da amida de Weinreb **63**. Apenas posteriormente se procede à adição do composto com função amina, possibilitando o acoplamento entre ambos.^[76]

O composto híbrido tetraoxano-PQ (**66**) com um *linker* com função amida foi assim sintetizado por acoplamento entre o derivado ácido carboxílico (**67**) e o grupo amina terminal da PQ (**28**). O reagente de acoplamento utilizado foi o TBTU, encontrando-se o mecanismo de síntese proposto previamente descrito no Esquema 2.7.

O composto híbrido final **66**, após purificação por cromatografia em coluna, foi caracterizado por espectroscopia de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e técnicas bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC. Adicionalmente, confirmou-se por espectrometria de massa de alta e baixa resolução e análise elementar.

O espectro de ¹H-RMN, representado na Figura 2.21, permitiu a identificação dos protões característicos da estrutura da PQ, tanto os do sistema quinolínico como o protão ligado ao carbono quiral (C₁). Adicionalmente, foram ainda identificados ambos os protões ligados aos átomos de azoto. O protão do grupo –NH da função amida apareceu a $\delta = 5,54$ ppm como um *triplete* ($J = 5,2$ Hz), pelo acoplamento com os protões em C₄, enquanto o protão do grupo –NH ligado ao sistema aromático apareceu como um *duplete* ($J = 8,4$ Hz) com $\delta = 5,99$ ppm. A correcta identificação de cada um fez-se com base no espectro bidimensional COSY (Figura 2.22).

A caracterização do composto **66** foi concluída com base no desvio químico obtido para os protões em C₄. Devido à presença da função amida adjacente, este protão encontra-se mais desblindado aparecendo o seu sinal a campo mais baixo ($\delta = 3,3$ ppm), comparativamente ao seu valor na estrutura da PQ, onde aparece um sinal a $\delta = 2,7$ ppm.

A caracterização do composto foi confirmada por Análise Elementar (C₃₂H₄₃N₃O₆) e por espectrometria de Massa de Alta Resolução (ião molecular [M + H]⁺ a m/z 566,3229, calculado para C₃₂H₄₃N₃O₆: 565,3152 g.mol⁻¹).

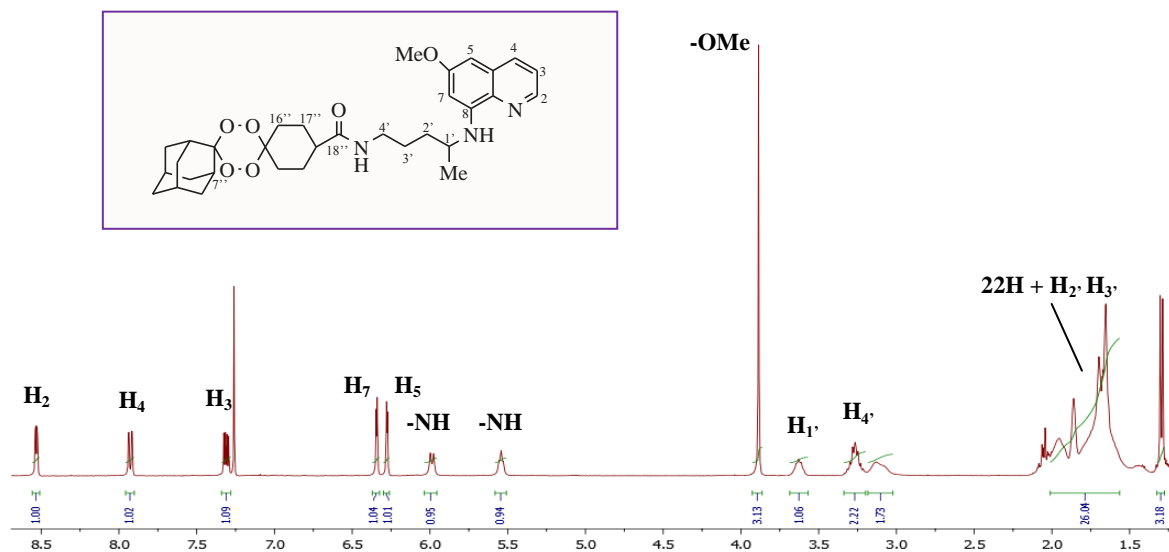


Figura 2.21

Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido tetraoxano-PQ (**66**)

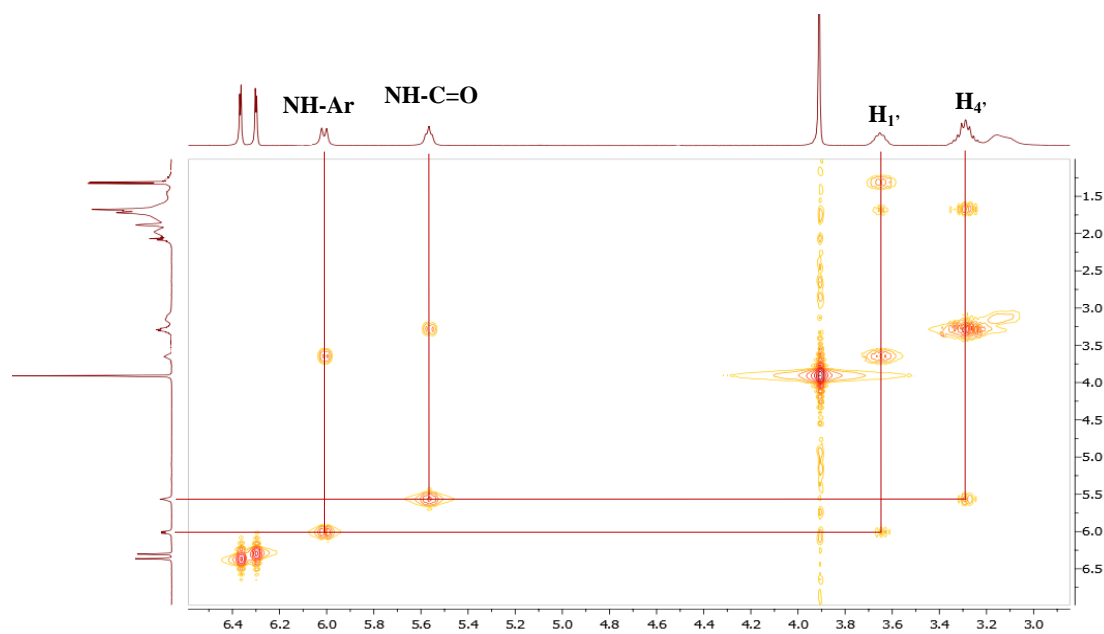


Figura 2.22

Representação parcial do espectro bidimensional de COSY do composto híbrido tetraoxano-PQ (**66**), evidenciando as interações dos prótons ligados aos átomos de N na estrutura da PQ.

2.2.4 Híbrido com função amina

2.2.4.1 Derivado hidroxamato (73)

Seguindo a abordagem previamente referida e aplicada na síntese do composto híbrido ART-PQ (ver ponto 2.1.5), a partir do derivado ácido carboxílico sintetizou-se a amida de Weinreb correspondente (derivado hidroxamato). Após purificação, por cromatografia em coluna, o composto sólido obtido foi caracterizado pelas técnicas espectroscópicas de IV, ^1H -RMN e pela técnica bidimensional COSY.

Com base no espectro de ^1H -RMN (Figura 2.23) comprovou-se a síntese do derivado pretendido identificando-se os grupos característicos $-\text{OMe}$ e $-\text{Me}$ ligados ao átomo de azoto com $\delta = 3,70$ e $3,18$ ppm, respectivamente. O próton em $\text{C}_{7''}$ característico da estrutura da 2-adamantanona apareceu como um *multipeto* a $2,74$ ppm.

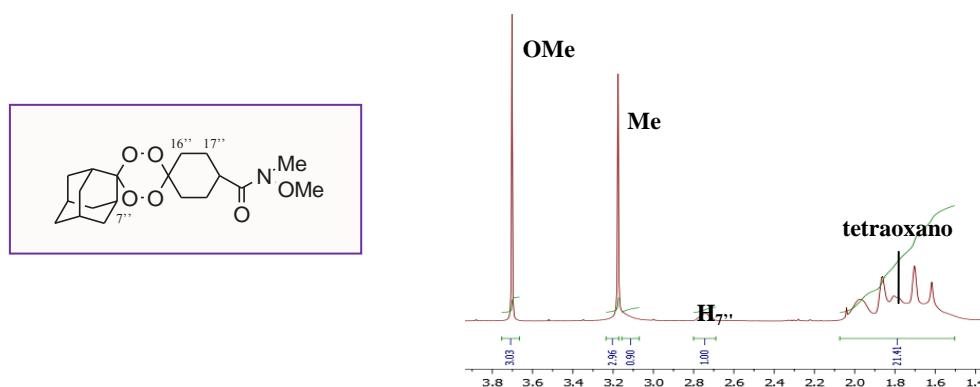


Figura 2.23

Representação do espectro de ^1H -RMN do derivado hidroxamato (73)

2.2.4.2 Derivado aldeído (71)

O derivado com função aldeído foi obtido a partir do derivado **73**, por redução com LiAlH_4 . O procedimento aplicado baseou-se no anteriormente descrito (ver ponto 2.1.5). Após caracterização espectroscópica do produto final obtido, confirmou-se a síntese do aldeído **71** pela presença no espectro de ^1H -RMN do pico correspondente ao próton ligado ao grupo carbonilo ($\delta = 9,65$ ppm). De acordo com a literatura, o desvio químico no qual este próton ressoa é característico de prótons carbonílicos de funções aldeído. Adicionalmente, foi ainda visível no espectro de IV a banda característica do grupo carbonilo desta função (1732 cm^{-1}).^[62,69] Todos os prótons da estrutura do anel adamantano foram igualmente identificados, especificamente o próton em $\text{C}_{7''}$.

2.2.4.3 Composto híbrido 70

Pela reacção de aminação redutiva entre o derivado **71** e a PQ neutra, usando como agente redutor o $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, sintetizou-se o híbrido contendo um *linker* com função amina. As características deste tipo de reacção encontram-se previamente descritas aquando da síntese do híbrido ART-PQ (ver ponto 2.1.6), pelo que não serão aqui consideradas. De igual modo, o composto final obtido foi caracterizado por espectroscopia de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e pelas técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC. Adicionalmente, comprovou-se por espectrometria de massa de alta e baixa resolução e análise elementar.

Com base no espectro de ^1H -RMN (Figura 2.24) foram identificados os sinais do sistema quinolínico da PQ, a campo mais baixo, e o protão do carbono quiral em $\text{C}_{1'}$ ($\delta = 3,62$ ppm). Relativamente à estrutura do tetraoxano encontram-se presentes os 22 protões característicos a campo alto ($\delta = 2,09 - 1,90$ ppm), próximos dos grupos CH_2 em $\text{C}_{2'}$ e $\text{C}_{3'}$ da PQ.

A síntese do híbrido pretendido foi confirmada pela presença de um sinal adicional, com desvio químico a 2,47 ppm, correspondente aos 2H do grupo CH_2 do *linker* entre ambos os compostos. O facto de se encontrarem adjacentes ao C_{20} do ciclo-hexano faz com que o seu sinal apareça como um *duplete*, com $J = 6,4$ Hz. Esta atribuição foi confirmada com base no espectro de ^{13}C -RMN e técnicas bidimensionais HMQC e HMBC.

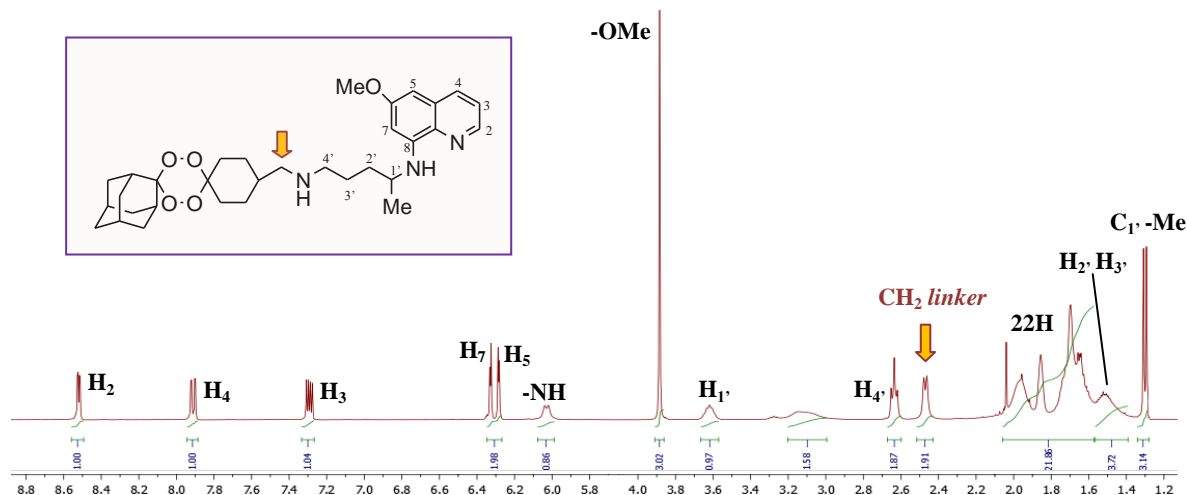


Figura 2.24

Representação do espectro de ^1H -RMN do composto híbrido final tetraoxano-PQ (**70**)

O carbono do grupo metilénico $-\text{CH}_2$ do *linker* apresentou um pico a 55,3 ppm. Este valor encontra-se em concordância com os valores tabelados na literatura, estando este carbono

mais desblindado devido à proximidade com o átomo de N.^[62,69] Para além disto, a correlação verificada, pelo espectro HMBC (Figura 2.25), entre estes protões e o C_{4'} da PQ corroborou os sinais atribuídos. O protão em C_{4'} apresentou um sinal com desvio químico a campo mais alto, quando comparado com o desvio químico observado no híbrido **66**. Neste ultimo composto, a presença do grupo carbonilo da função amida provoca um maior efeito de desblindagem sobre este protão, facto que justifica ambos os desvios químicos obtidos.

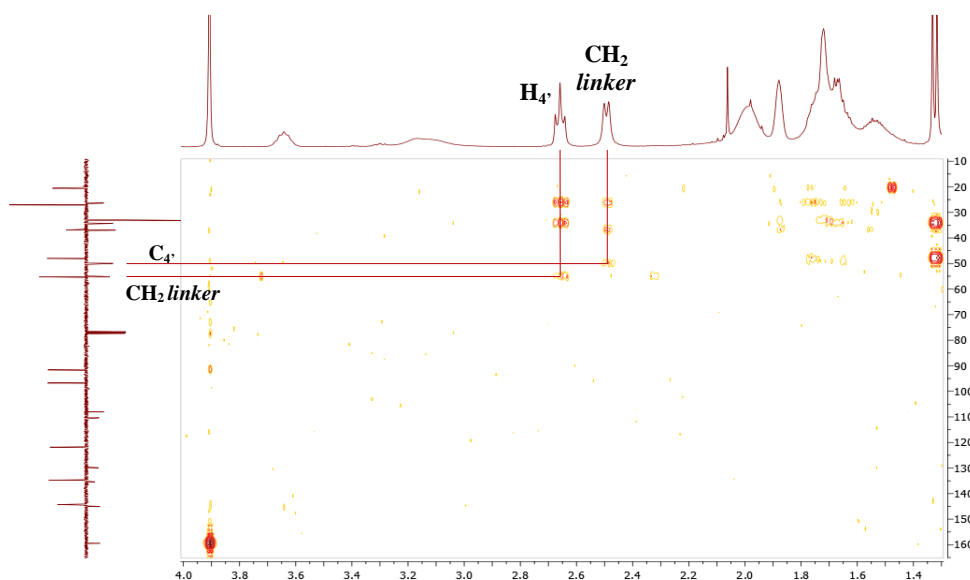


Figura 2.25

Representação parcial do espectro bidimensional HMBC do composto híbrido tetraoxano-PQ (**70**), evidenciando a interação entre os protões metilénicos do grupo CH₂ linker com os protões em C_{4'} na estrutura da PQ.

A caracterização do híbrido foi confirmada por Análise Elemental (C₃₂H₄₅N₃O₅) e Massa de Alta Resolução (ião molecular [M + H]⁺ a *m/z* 552,3425, calculado para C₃₂H₄₅N₃O₅: 551,3359 gmol⁻¹).

Capítulo 3

Estabilidade e actividade dos compostos híbridos sintetizados

3.1. Ensaios de estabilidade

No processo de desenvolvimento de um candidato a fármaco é sempre necessário avaliar a sua estabilidade química e metabólica. Assim, procedeu-se ao estudo de estabilidade dos compostos híbridos **58**, **66** e **70** em tampão fosfato isotónico pH 7,4, plasma humano e homogenato de fígado de rato, a 37°C. Como a concentração de tampões foi bastante superior à concentração do substrato, este estudo foi efectuado em condições de pseudo-primeira ordem tendo-se determinado as constantes de velocidade da reacção (Equação 3.1) e $t_{1/2}$ (Equação 3.2) dos compostos em análise pela aplicação das seguintes equações:^[86]

$$v = k_{obs}[A], \quad \text{onde} \quad k_{obs} = kB [B] \quad \text{Equação 3.1}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{obs} \quad \text{Equação 3.2}$$

3.1.1. Análise cromatográfica por HPLC

A estabilidade dos compostos **58**, **66** e **70** foi monitorizada por HPLC, seguindo-se o desaparecimento do pico correspondente ao substrato. Para a correcta identificação de cada um dos compostos foram utilizadas soluções padrão previamente preparadas.

Dado que o sistema de HPLC se encontra acoplado a um detector com lâmpada UV-Vis, apenas os compostos com grupos aromáticos serão detectados.

Com base na literatura, a primaquina pode ser detectada por HPLC utilizando diferentes eluentes, com proporções variáveis entre os solventes constituintes. Deste modo, foi avaliado qual o melhor eluente a utilizar para cada um dos derivados, modificando-se a proporção entre a fase aquosa e a fase orgânica de acordo com o tempo de retenção obtido. Constatou-se que quanto maior a percentagem de fase aquosa maior o tempo de retenção dos compostos, facto que é devido às características da coluna de HPLC escolhida. As condições experimentais utilizadas nesta dissertação foram baseadas no estudo reportado por Portela *et al.*^[87] O sistema de HPLC utilizado era constituído por uma coluna de fase reversa RC18 em sistema isocrático e fluxo constante à velocidade de 1 ml/min. A constituição dos eluentes utilizados para análise

dos três compostos encontra-se descrita na Tabela 3.1, tendo-se utilizado para a eluição dos compostos híbridos **58** e **70** na fase aquosa uma solução tampão fosfato a pH = 3,11.

De modo a determinar qual o comprimento de onda mais adequado para análise dos compostos híbridos realizou-se um espectro de UV-Visível. O comprimento de onda de 270 nm foi o utilizado neste trabalho experimental.

Tabela 3.1

Eluente escolhido e respectivos tempos de retenção obtidos para os compostos híbridos estudados. Condições: coluna RC18, 250 x 4mm, 5 µm, λ = 270 nm, fluxo isocrático de 1 ml/min.

Híbrido	Eluente			t _r (min)
	% Fase aquosa H ₂ O	% Fase aquosa Tampão fosfato (pH 3,11)	% Fase orgânica ACN	
58	-	50	50	4,71
66	20	-	80	5,76
70	-	50	50	6,81

3.1.2 Estabilidade química e metabólica dos compostos híbridos 58, 66 e 70

3.1.2.1 Estudo de estabilidade em tampão fosfato

Os ensaios de estabilidade em tampão fosfato isotónico (PBS) pH = 7,4 a 37°C, são fundamentais pois permitirem avaliar a estabilidade química dos derivados em condições fisiológicas. O procedimento aplicado encontra-se descrito no capítulo IV desta dissertação.

Através da análise cromatográfica por HPLC, e uma vez que não se observou o desaparecimento dos picos dos compostos híbridos durante o período do ensaio, mantendo-se o valor das áreas associadas constante, concluiu-se que os híbridos analisados são bastante estáveis nestas condições.

3.1.2.2 Estudo de estabilidade em plasma humano

O estudo da estabilidade em plasma humano serviu para avaliar a estabilidade dos derivados sintetizados na presença das enzimas plasmáticas. O procedimento experimental aplicado encontra-se descrito no capítulo IV desta dissertação, tendo-se utilizado plasma humano diluído 80% (v/v) com PBS, a 37°C. Tal como para o ensaio anterior verificou-se que os compostos híbridos são bastante estáveis o que indica que não sofrem metabolização pelas proteínas plasmáticas durante as 72 horas de incubação.

3.1.2.3 Estudo de estabilidade em homogenato de fígado de rato

Por último estudou-se a estabilidade dos derivados em homogenato de fígado de rato. Com base nos resultados obtidos neste ensaio é-nos possível prever a degradação dos compostos híbridos no principal local de metabolização – o fígado. A actividade do homogenato foi confirmada pela realização de um teste específico, de acordo com as indicações do fornecedor, onde se monitorizou a capacidade da enzima CYP2E1 pela conversão do *p*-nitrofenol em *p*-nitrocatecol.^[88,89]

No decorrer deste estudo foi possível seguir-se o desaparecimento quase completo do pico correspondente ao substrato, sendo visível o aumento gradual de um pico a um tempo de retenção (t_r) menor, aproximadamente 2,50 minutos (Figura 3.1). Os valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram determinados a partir do gráfico $\ln(\text{área})$ em função do tempo, correspondendo esta grandeza ao declive da recta (Figura 3.2). Em seguida, e por aplicação da equação 3.2, determinou-se o $t_{1/2}$ de cada derivado.

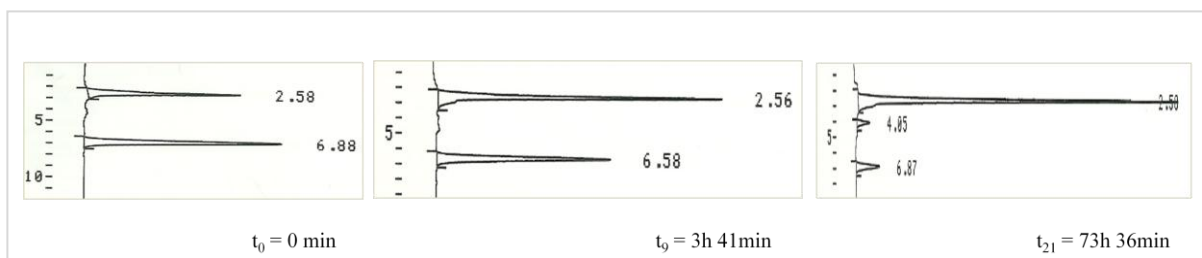
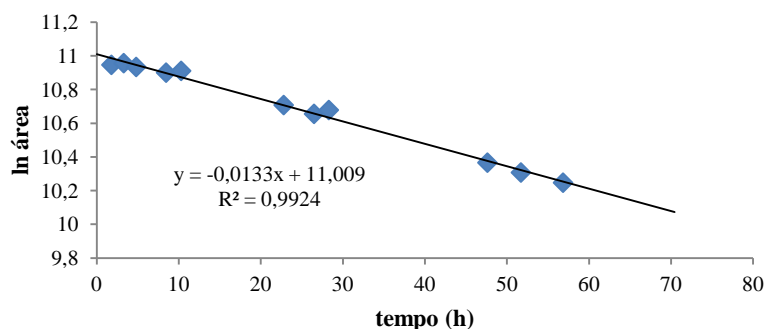


Figura 3.1

Cromatogramas obtidos durante a realização do estudo de estabilidade do composto híbrido **66** em homogenato de fígado de rato.

**Figura 3.2**

Correlação entre o ln área em função do tempo para a metabolização do composto **66** em homogenato de fígado de rato, a 37°C.

3.1.2.4 Análise dos resultados obtidos

Os resultados obtidos nos três ensaios efectuados encontram-se na Tabela 3.3. É evidente que este tipo de compostos híbridos não sofre degradação química nem enzimática, por parte das proteínas presentes no plasma. Contudo, sofrem considerável metabolização ao nível do fígado.

Tabela 3.2

Valores das constantes de velocidade (k_{obs}) e tempos de semi-vida ($t_{1/2}$) calculados para os compostos 58, 66 e 70, com base nos resultados obtidos por HPLC em homogenato de fígado de rato, a 37°C.

Composto Híbrido	Tampão fosfato pH = 7,4	Plasma humano	Homogenato de fígado de rato	
			k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
58	Estável	Estável	$1,64 \times 10^{-2}$	42
66	Estável	Estável	$1,26 \times 10^{-2}$	55
70	nd ^a	Estável	$1,01 \times 10^{-1}$	7

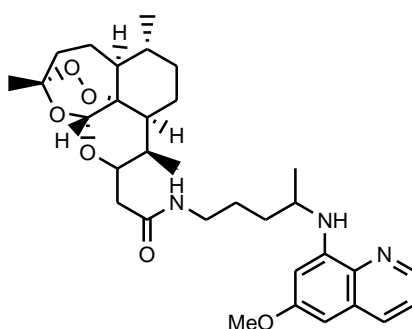
^a nd – não determinado

Devido ao seu carácter lipofílico, estes híbridos atravessam facilmente as membranas plasmáticas, nomeadamente as presentes ao nível do fígado. Neste órgão sofrem extensa metabolização por parte do sistema microsomal responsável pelas fases I e II de metabolismo. Na fase I de metabolismo os compostos podem sofrer hidrólises ou reduções

sendo a reacção de oxidação, catalisada pelo citocromo p450, a mais comum. Esta oxidação em compostos contendo heteroátomos ocorre preferencialmente nos carbonos adjacentes, geralmente com formação de um intermediário instável que acaba por se decompor e causar uma desalquilação no composto de partida. Por outro lado, quando não existem átomos de hidrogénio disponíveis em C α , pode ocorrer a oxigenação directa do heteroátomo, com formação de N-hidroxilaminas nas aminas primárias e secundárias ou N-óxidos nas aminas terciárias.^[90]

Considerando a estrutura dos compostos sintetizados, nomeadamente comparando ambos os híbridos contendo os farmacóforos 1,2,4,5-tetraoxano e 8-AQ (**66** e **70**), conclui-se pelos resultados obtidos que a metabolização do híbrido com *linker* amina é mais rápida que o mesmo contendo um *linker* amida. Tal facto deve-se à presença de dois carbonos adjacentes ao átomo de azoto, com elevada susceptibilidade para serem oxidados. Contrariamente, o *linker* com função amida apresenta apenas um C em posição alfa ao heteroátomo possível de ser oxidado, tendo assim um menor potencial de oxidação.^[90]

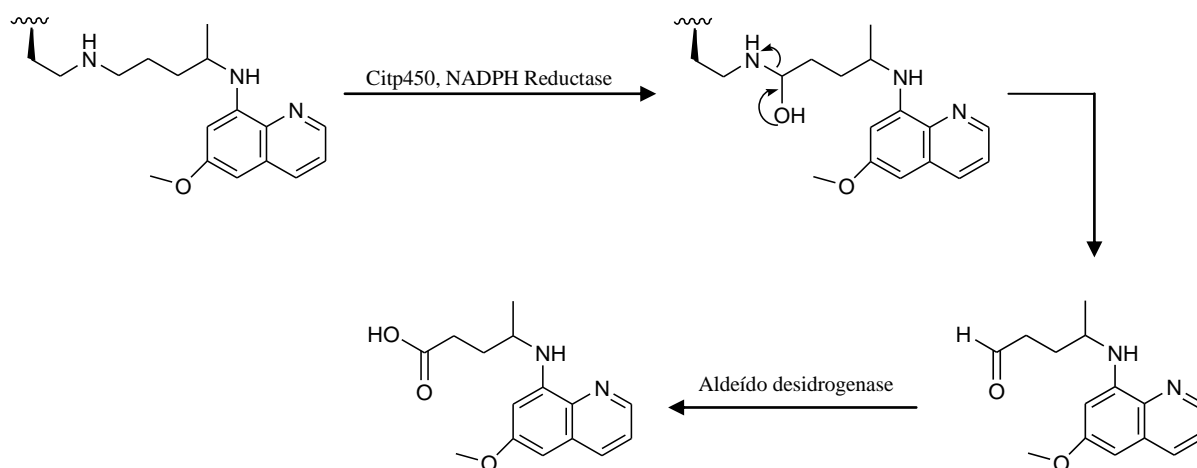
O $t_{1/2}$ do híbrido **58** foi comparado com o composto **74**, sintetizado por Capela *et al.*^[91], contendo um *linker* amida entre os farmacóforos ART-PQ. As condições cromatográficas usadas no estudo de **74** apenas diferiram no eluente usado: 30% de H₂O com 70% de acetonitrilo. O tempo de retenção obtido foi de 8 minutos, e pelo declive da recta determinou-se o valor de k_{obs} e o $t_{1/2}$: $1,3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ e 53 horas, respectivamente. Assim, também estes resultados se encontram de acordo com o esperado, segundo o qual a metabolização das aminas é mais rápida que a das respectivas amidas.



(74)

3.1.3 Análise dos metabolitos obtidos por espectroscopia de massa

É importante referir que o aumento gradual do pico com $t_r = 2,50$ minutos previamente referido é, provavelmente, causado pela metabolização do composto híbrido e consequente formação de um ou mais produtos contendo o sistema insaturado da PQ. De modo a determinar os metabolitos formados foi efectuada uma análise por espectroscopia de massa, com o objectivo de identificar os respectivos pesos moleculares. Os resultados obtidos permitiram identificar nos três compostos híbridos (**58**, **66** e **70**) um fragmento comum de peso molecular igual a $274,30 \text{ g.mol}^{-1}$. Considerando a estrutura da carboxiPQ (**31**) verificou-se que este peso molecular é coincidente, sendo assim este um possível metabolito formado aquando da metabolização dos híbridos (Esquema 3.1).



Esquema 3.1

Possível via de metabolização dos compostos híbridos **58**, **66** e **70** pelo citocromo p450, ao nível do fígado, com formação do metabolito carboxiprimaquina.

3.2 Actividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* dos compostos híbridos

A actividade antimalárica dos três compostos híbridos foi inicialmente testada por testes *in vitro*. Os ensaios biológicos que permitiram avaliar a actividade destes compostos contra a fase sanguínea de estirpes de *Plasmodium falciparum* W2 resistentes à cloroquina foram efectuados na Universidade da Califórnia, em São Francisco, de acordo com o procedimento descrito por Coterón *et al.*^[92] Os resultados obtidos foram expressos em valores de IC_{50} (concentração de fármaco que inibe 50% do desenvolvimento do parasita) e representam a média de pelo menos três ensaios experimentais (Tabela 3.3).

Tabela 3.3

Actividade esquizontocida sanguínea, determinada *in vitro*, peso molecular e ClogP da artemisinina e dos compostos híbridos **58**, **66** e **70**.

Composto Híbrido	IC ₅₀ (nM) ^a ± SD ^b	Peso molecular	ClogP ^c
58	12,9 ± 0,95	554	5,34
66	21,1 ± 0,49	566	5,20
70	45,2 ± 2,24	552	5,52
ART	5,2 ± 2,24	282	2,90

^a determinada contra estirpes de *Plasmodium falciparum* W2 resistentes à cloroquina.

^b SD – desvio padrão

^c ClogP é um valor calculado do logaritmo do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água, calculado através do software ALOGPS (<http://www.vclab.org/lab/alogps/>). Os valores de logP medem a lipofilia dos compostos híbridos em estudos (valores mais altos atribuídos aos compostos mais lipofílicos).

Com base nos valores de IC₅₀ obtidos, verifica-se que os três compostos híbridos apresentam potente actividade inibitória, na ordem dos nanomolar. Contudo nenhum deles apresenta maior actividade como esquizontocida sanguíneo comparativamente à ART, o que pode ser devido ao aumento considerável no peso molecular ou lipofilia.

De modo a avaliar a capacidade dos compostos híbridos **58**, **66** e **70** como esquizontocidas tecidulares, testou-se a sua actividade num sistema de infecção *in vitro* contendo uma linhagem de células de hepatoma humana (Huh7) e esporozoítos do parasita *P. berghei*. Estes ensaios foram realizados no Instituto de Medicina Molecular, em Lisboa, de acordo com o procedimento descrito por Capela *et al.*^[91] Os níveis totais de infecção foram quantificados passadas 46h do início do ensaio (isto é, adição às células Huh7 da enzima luciferase transgénica que expressava os esporozoítos do parasita). Os efeitos ao nível da proliferação celular e sobrevivência das células Huh7 foram igualmente quantificados por técnicas de fluorescência (Figura 3.3).

Com base nos resultados obtidos verificou-se que, para o composto **58** apenas a concentração mais alta testada (10µM) tem um efeito significativo sobre as células Huh7, mantendo-se a confluência nas restantes concentrações. Para a concentração de 5µM a percentagem de células infectadas é praticamente nula não se verificando danos celulares. Assim, e por comparação com os resultados obtidos para a PQ, concluiu-se que este híbrido

apresenta potente actividade ao nível hepático, prevenindo a replicação intracelular dos esporozoítos. Também o composto híbrido **70** mostrou elevada actividade como esquizontocida tecidular, actuando sobre as células parasitárias características da fase hepática da infecção. Contudo, os valores de confluência obtidos para as várias concentrações testadas não revelaram resultados tão promissores, verificando-se efeitos consideráveis sobre a capacidade de proliferação e sobrevivência das células Huh7 nas duas concentrações mais altas testadas (5 μ M e 10 μ M).

Relativamente ao composto híbrido **66**, os resultados obtidos não foram conclusivos. Contudo, este composto mostrou potente actividade nas duas concentrações mais altas testadas, não se verificando células infectadas, e ausência de efeitos tóxicos significativos nas células Huh7 em estudo. Este ensaio será posteriormente repetido.

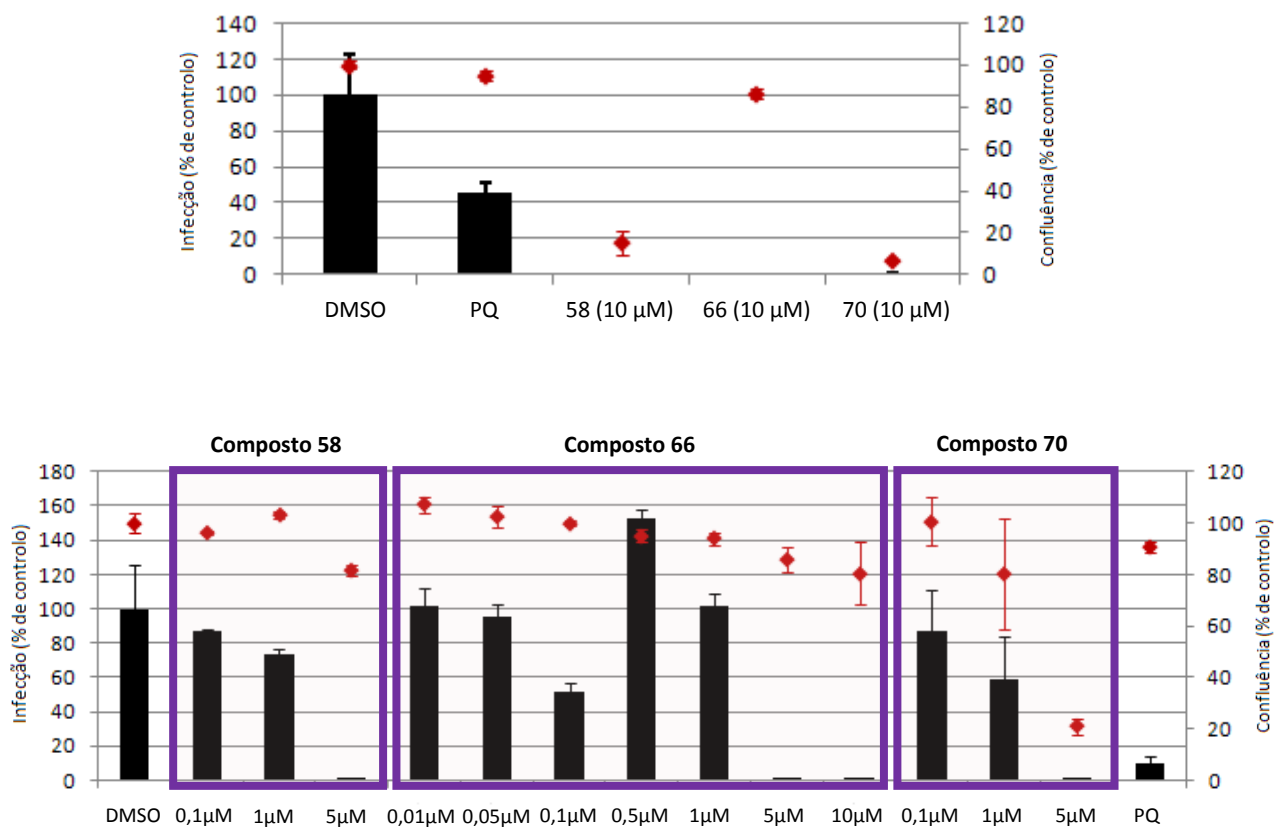


Figura 3.3

Actividade determinada por estudos *in vitro* dos compostos **58**, **66** e **70** como esquizontocidas tecidulares sobre o parasita *P. berghei*. Os compostos híbridos foram adicionados às células de hepatoma humano Huh7 cerca de 1h antes da infecção com a enzima luciferase expressando as formas parasitárias de esporozoítos. Uma quantidade de DMSO equivalente à concentração mais alta de composto testada foi usada como ensaio controlo. Passadas 46h a confluência celular (pontos a vermelho) foi determinada por fluorescência e o nível de infecção (barras) foi medido quantificando-se a actividade da enzima luciferase por luminescência. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Nas duas concentrações mais altas testadas (5 μM e 10 μM) todos os compostos mostraram maior actividade de inibição da infecção que a PQ, sendo inclusive a percentagem de células infectadas praticamente ou mesmo nula. Contudo, o nível de confluência celular para estas concentrações é significativamente menor para os compostos híbridos em estudo, o que revela alguma toxicidade por parte dos mesmos.

Através de ensaios *in vivo*, começou-se por testar a actividade do composto **70** como bloqueador da transmissão da doença de ratos infectados com o parasita da malária a mosquitos da espécie *A. gambiae*. Este estudo foi efectuado no Instituto de Higiene e Medicina Tropical/CMDTLA/UNL e o procedimento realizado encontra-se de acordo com o descrito por Vale *et al.*^[57] Com este tipo de ensaio pretendeu-se analisar se os compostos híbridos testados eram capazes de interferir no ciclo infeccioso do parasita, interrompendo assim a transmissão da infecção aos mosquitos *A. gambiae* hospedeiros. A actividade foi medida pela percentagem de mosquitos contendo oócitos do parasita e, adicionalmente, pelo número médio de oócitos por mosquito infectado. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.4.^[57]

Tabela 3.4

Actividade do composto híbrido **70** no desenvolvimento do *Plasmodium berghei* ANKA em *Anopheles gambiae*

Composto Híbrido	dose/ $\mu\text{mol.kg}^{-1}$	média do n° de oócitos por mosquito \pm SEM ^a	% de mosquitos infectados
58	nd ^b	nd ^b	nd ^b
66	nd ^b	nd ^b	nd ^b
70	10	8,0 \pm 3,6	42,9
	25	1,0 \pm nd ^a	5,9
PQ (28)	10	2,9 \pm 1,1	35,5
	25	1,0 \pm 0,0	2,2
controlo	0	32,1 \pm 3,0	73,5

^aSEM – Standard error of the mean, desvio padrão do valor médio determinado

^bnd – não determinado

O composto híbrido **70**, por comparação com os resultados de actividade da PQ, mostrou-se bastante activo na concentração mais alta testada, tanto na redução do número médio de

oócitos por mosquito como na percentagem de mosquitos infectados. Embora a sua actividade não tenha sido superior à da PQ, obtiveram-se valores de IC_{50} bastante próximos em ambos os parâmetros avaliados.

De um modo geral, os resultados obtidos nos três estudos anteriormente referidos indicam que os compostos híbridos sintetizados apresentam elevada actividade antiplasmodial, em ambas as fases sanguínea e hepática da infecção. Dos três destaca-se o composto híbrido **58** para o qual se obteve os melhores resultados em ambos os testes *in vitro* realizados contra a fase sanguínea (menor valor de $IC_{50} = 12,9$ nM) e hepática da infecção (ausência de níveis significativos de toxicidade, medidos pela elevada percentagem de confluência, quando os níveis de infecção das células Huh7 com esporozoítos de *P. berghei* eram praticamente nulos).

Capítulo 4

Conclusões

4.1. Conclusões Gerais

Tendo em conta os resultados descritos no capítulo 2, conclui-se que é possível efectuar a síntese, purificação e caracterização completa de compostos híbridos baseados em ambos os farmacóforos peróxido e 8-aminoquinolina.

A estrutura dos compostos desenvolvidos foi confirmada através de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, RMN Bidimensional, ESI-MS e Análise Elementar, o que permitiu identificar:

- os sinais característicos do grupo quinolínico da estrutura da primaquina;
- os prótons característicos da estrutura da artemisinina;

A síntese dos compostos híbridos contendo um *linker* com função amina necessitou da realização de um número adicional de passos sintéticos, o que torna o processo mais demorado por comparação com a síntese dos híbridos contendo o *linker* com função amida. Adicionalmente os rendimentos finais dos híbridos contendo um *linker* com função amina são mais reduzidos.

Dos estudos efectuados em meios aquosos e biológicos, descritos no capítulo 3, de modo a avaliar a estabilidade dos híbridos desenvolvidos, conclui-se que:

- todos os compostos híbridos são estáveis em tampão fosfato pH 7,4 e em plasma humano, não havendo portanto degradação química ou enzimática, catalisada pelas proteínas presentes no plasma;
- em homogenato de fígado de rato verifica-se degradação bastante rápida, com tempos de semi-vida que variam entre as 7 e 55 horas, com formação provável da carboxiprimaquina como um dos metabolitos resultantes das reacções de fase I de metabolismo.
- os híbridos com ligação amina entre ambos os farmacóforos apresentam uma reactividade substancialmente maior em homogenato de fígado de rato, o que presumivelmente se deve à sua maior susceptibilidade à oxidação.

Dos testes de actividade realizados, conclui-se que estes derivados são excelentes candidatos a compostos híbridos antimaláricos por apresentarem actividade contra as estirpes testadas tanto na fase sanguínea como na fase hepática de infecção. Com base nos ensaios realizados *in vitro* verifica-se que, dos compostos estudados, os que apresentam maior

actividade contra a fase sanguínea são os que tem menor valor de logP pelo que, e de acordo com os resultados obtidos, provavelmente o aumento da lipofilia neste tipo de compostos desfavorece a sua actividade como esquizontocida sanguíneo. Ao nível hepático todos os compostos híbridos apresentaram potente actividade, na ordem dos nanomolar, com ausência de níveis de toxicidade celular significativos. Dado que todos os compostos testados apresentaram actividade superior à da PQ, os resultados obtidos sugerem que as alterações introduzidas na estrutura deste fármaco por este tipo de moléculas híbridas potenciam a sua actividade.

Adicionalmente, o composto **70** testado *in vivo* como bloqueador da transmissão da doença em mosquitos *A. gambiae* infectados, mostrou ser tão activo quanto a primaquina na redução do número médio de oócitos e percentagem de mosquitos infectados, na maior concentração testada.

Capítulo 5

Procedimiento Experimental

5.1 Reagentes e solventes

5.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer da parte experimental foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alfa Aesar e Merck. A artemisinina utilizada nos processos de síntese proveio da China, Fraken Biochem Co., Ltd, com um grau de pureza de 99,8%.

A piridina (Merck) e trietilamina (Sigma-Aldrich) foram destiladas de hidróxido de potássio em lentilhas e armazenadas em frascos escuros, no frigorífico a cerca de 5°C.

O tampão fosfato (pH 7,4, 0,01 M) foi preparado dissolvendo-se uma pastilha de PBS (Sigma-Aldrich) em 200 ml de água desionizada.

O tampão fosfato (pH 3,11) usado nos ensaios de HPLC foi preparado a partir de 980 ml de uma solução de KH_2PO_4 1M e 20 ml de H_3PO_4 , num volume total de 1L de solução.

O homogenato de fígado de rato foi fornecido pela BD GentestTM.

O plasma humano foi recolhido de indivíduos saudáveis na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

5.1.2. Solventes

Na síntese de todos os compostos foram utilizados solventes de grau analítico (*p.a.*).

Todos os solventes foram destilados á pressão atmosférica. O tetrahydrofurano (THF) da Panreac e o éter etílico (Et_2O) foram previamente submetidos a refluxo, na presença de fio de sódio e benzofenona (Merck), usada como indicador de humidade. O diclorometano (CH_2Cl_2), o dicloroetano ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$), o metanol (MeOH) e o etanol (EtOH) foram destilados de cloreto de cálcio anidro.

Os solventes utilizados na purificação dos compostos eram puros da Merck.

Nos estudos de estabilidade por HPLC, utilizaram-se solventes Lichrosolv[®] da Merck e água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de $18 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Os solventes deuterados utilizados para RMN (CDCl_3 , MeOD e DMSO-d) e o tetrametilsilano eram da Merck, com um grau de pureza superior a 95%.

5.2. Cromatografia

Todas as colunas de cromatografia foram preparadas com sílica gel 60 M de granulometria 0,040-0,063 mm (Merck). As cromatografias em camada fina (TLC) foram realizadas em placas de sílica-gel Merck Kieselgel F₂₅₄, de espessura 0,25 mm, e reveladas usando uma câmara CAMAG de UV, com um comprimento de onda de 254 nm, uma câmara de iodo ou um dos seguintes reveladores: H₂SO₄/MeOH (1:1) e p-anisol.

5.2. Equipamento

Os pontos de fusão dos compostos sólidos foram determinados numa câmara Kofler Bock Monoscop M.

Os espectros de infravermelho (IV) foram executados num espectrofotómetro Nicolet Impact 400 FTIR sob a forma de filme em células de cloreto de sódio ou sob a forma de pastilhas com brometo de potássio como suporte.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (¹H-RMN) e de carbono (¹³C-RMN), foram traçados num espectrómetro Bruker 400 Ultra-Shield usando clorofórmio ou metanol deuterados como solventes. Os valores de desvio químico, δ H ou δ C, encontram-se de acordo com a seguinte norma: desvio químico (δ em ppm relativamente ao TMS), multiplicidade do sinal, apresentando-se como *s* (singuleto), *sl* (singuleto largo) *d* (duplete), *dl* (duplete largo), *dd* (duplo duplete), *ddl* (duplo duplete largo), *t* (triplete), *q* (quarteto) ou *m* (multiplete) e constante de acoplamento (J em Hz).

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, com um espectrofotómetro de massa Micromass Quattro Micro API, com fonte de ionização por electrospray. O programa de interpretação dos resultados da análise foi o MassLynx V4.1.

Os espectros de massa de alta resolução foram efectuados na Universidade de Santiago Compostela, Espanha, com um espectrofotómetro de massa quadrupolar da Hewlett-Packard, modelo HP5988A, por impacto electrónico.

As análises elementares foram efectuadas na Universidade de Santiago Compostela, Espanha, com um analisador automático CE Instruments EA 1110.

Para determinar qual o melhor c.d.o. a utilizar nos estudos por HPLC utilizou-se um espectrofotómetro de UV-Visível feixe duplo Shimadzu UV-2100PC, acoplado a um sistema de aquecimento termostático da Shimadzu CPS-260.

Os estudos de estabilidade foram realizados num sistema de HPLC, utilizando um detector espectrofotométrico UV-VIS Shimadzu SPD-6AV, de comprimento de onda variável, acoplado a uma bomba Lachrom Merck-Hitachi L-7100, com um injetor Rheodyne de 20 μ l, um registador Chromato-Integrator Merck-Hitachi D2500A e coluna Merck Lichrocart® RP-18, 250 \times 4 mm, com partículas de 5 μ m. Adicionalmente foi usado durante estes ensaios uma centrífuga SIGMA 112 (13000 rpm), um vortex Genie™, Modelo K-550-GE, Scientific Industries, Inc e um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado, para termostatar as soluções reaccionais.

Para a leitura do pH das soluções foi utilizado um potenciómetro micro pH 2002 Crison.

5.4. Procedimentos de síntese e caracterização dos compostos

5.4.1. Síntese do composto híbrido Artemisinina – Primaquina (58)

Partindo da estrutura da artemisinina vários derivados semi-sintéticos foram desenvolvidos de modo a sintetizar o composto híbrido **58** contendo ambos os farmacóforos da artemisinina e da primaquina. O método de síntese aplicado bem como as diferentes vias sintéticas consideradas serão descritos no seguimento deste capítulo.

5.4.1.1. Neutralização da Primaquina comercial

A neutralização da primaquina comercial, na forma de difosfato, foi efectuada após dissolução desta (4,5g; 10 mmol) em água destilada (250 ml), por adição gradual de gotas de NaOH 10M até pH \approx 8. A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante 20 minutos, protegida da luz. Foi visível a alteração de cor da solução que passou de amarelo translúcido a amarelo opaco, com formação de um precipitado na forma de goma acastanhada. Seguiram-se extracções sucessivas com AcOEt (3 x 200 ml) basificando-se com NaOH 10M a fase aquosa, sempre que necessário, entre cada extracção. As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporadas.

- Óleo amarelo (100%; 2,6 g)
- IV: ν_{\max} = 3385, 1616, 1593, 1578, 1520, 1456, 1387, 1217, 1161, 1051, 822 cm^{-1} .
- ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 8,52 (1H, *dd*: J = 4,0 Hz e J = 1,6 Hz, Ar-*H*₂); 7,93 (1H, *dd*: J = 8,0 Hz e J = 1,6 Hz, Ar-*H*₄); 7,30 (1H, *dd*: J = 8,0 Hz e J = 4,0 Hz, Ar-*H*₃); 6,32 (1H, *d*: J = 2,4 Hz, Ar-*H*₅); 6,28 (1H, *d*: J = 2,4 Hz, Ar-*H*₇); 6,09-6,01 (1H, *sl*, -NH); 3,88 (3H, *s*, -

OCH₃); 3,69-3,57 (1H, *m*, CHCH₃); 2,78-2,72 (2H, *m*, NCH₂); 2,03-1,97 (2H, *sl*, -NH₂); 1,76-1,54 (4H, *m*, CH₂CH₂CH); 1,30 (3H, *d*: *J* = 6,4 Hz, CHCH₃).

- ¹³C-RMN (100,61 MHz, CDCl₃): 159,9 (Cq); 145,5 (Cq); 144,7 (CH); 135,8 (Cq); 135,2 (CH); 130,3 (Cq); 122,3 (CH); 97,1 (CH); 92,0 (CH); 55,6 (-OCH₃); 48,4 (CH); 42,6 (CH₂); 34,5 (CH₂); 30,5 (CH₂); 20,9 (CH₃).

5.4.1.2. Artemisinina (1)

A artemisinina apresentava um aspecto cristalino e cor branca (de acordo com o descrito pelo fornecedor).

- *p.f.*: 151-154 °C.
- *IV*: ν_{\max} = 2962, 2918, 1738, 1464, 1386, 1195, 1114, 989 cm⁻¹.
- ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 5,88 (1H, *s*, H₁₂); 3,45-3,38 (1H, *m*, H₉); 2,49-2,41 (1H, *m*, H_{4 α}); 2,12-1,75 (5H, *m*, H_{4 β} + H_{5 α} + H_{8 α} + H_{7 β} + H_{8 α}); 1,47 (3H, *s*, C₃CH₃); 1,46-1,38 (3H, *m*, H_{5 β} + H₆ + H_{5 α}); 1,23 (3H, *d*: *J*=7,2 Hz, C₉CH₃); 1,18-1,05 (2H, *m*, H_{8 β} + H_{7 α}); 1,02 (3H, *d*: *J*=5,6 Hz, C₆CH₃).
- ¹³C-RMN (100,61 MHz, CDCl₃): 172,1 (C=O); 105,4 (Cq); 93,7 (CH); 79,5 (Cq); 50,1 (CH); 45,0 (CH); 37,5 (CH); 35,9 (CH₂); 33,6 (CH₂); 32,9 (CH); 25,2 (CH₃); 24,9 (CH₂); 23,4 (CH₂); 19,9 (CH₃); 12,6 (CH₃).

5.4.1.3. Di-Hidroartemisinina (2)

De acordo com Brossi *et al.*⁹³, o agente redutor NaBH₄ (4,99g, 1,32mmol) foi adicionado lentamente, durante aproximadamente 2h, a uma solução em agitação do composto **1** (5g, 17,7mmol) dissolvido em MeOH (250ml), mantida á temperatura de 0-5°C, sob atmosfera de azoto. Após 1,5h em agitação, a mistura reaccional mantida à mesma temperatura foi tratada com ácido acético (8ml) até pH \approx 5. O solvente da reacção foi parcialmente evaporado no rotavapor, concentrando-se assim a mistura reaccional que foi, em seguida, diluída com água gelada (150 ml). Após cerca de 15min à temperatura ambiente, filtrou-se a vácuo o precipitado branco obtido, o qual foi lavado com uma solução de H₂O/MeOH (2:1, 2 x 150 ml) á temperatura de 0-5°C. O precipitado recolhido foi dissolvido em DCM (150 ml), a solução foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado.

- Cristais brancos (76%; 3,8 g).
- p.f.: 150-153°C.
- I.V.: $\nu_{\max} = 3368, 2942, 1191, 1020, 986 \text{ cm}^{-1}$.
- $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 5,60 (1H, s, H_{12}); 5,39 (1H, s, H_{12}); 5,30 (1H, t: $J = 3,2 \text{ Hz}$, H_{10}); 4,75 (1H, t: $J = 8,8 \text{ Hz}$, H_{10}); 3,01 (1H, d: $J = 8,4 \text{ Hz}$, OH); 2,76-2,73 (1H, m, OH); 2,66-2,57 (1H, m, H_9); 2,42-2,33 (2H, m, H_4); 2,32-2,26 (1H, m, H_9); 2,07-1,99 (2H, m, H_4); 1,93-1,87 (2H, m, H_5); 1,87-1,82 (2H, m, H_8); 1,81-1,71 (2H, m, H_7); 1,70-1,64 (2H, m, H_{8a}); 1,60-1,52 (2H, m, H_5); 1,50-1,46 (2H, m, H_8); 1,43 (6H, d: $J = 3,6 \text{ Hz}$, C_6CH_3); 1,38-1,31 (2H, m, H_6); 1,30-1,25 (2H, m, H_{5a}); 1,05-0,87 (2H, m, H_7); 0,96 (6H, s, C_3CH_3); 0,94 (6H, d: $J = 2\text{Hz}$, C_9CH_3).
- $\delta \text{ }^{13}\text{C-RMN}$ (100,61 MHz, CDCl_3): 104,5 (Cq); 104,3 (Cq); 96,6 (CH); 94,8 (CH); 91,4 (CH); 87,9 (CH); 81,3 (Cq); 80,5 (Cq); 52,6 (Cq); 51,7 (Cq); 45,6 (Cq); 44,4 (Cq); 37,6 (CH); 37,5 (CH); 36,5 (CH_2); 36,4 (CH_2); 35,0 (CH); 34,9 (CH_2); 34,3 (CH_2); 30,9 (CH); 26,2 (CH_3); 26,1 (CH_3); 24,85 (CH_2); 24,8 (CH_2); 24,7 (CH_2); 22,3 (CH_2); 20,5 (CH_3); 20,4 (CH_3); 13,3 (CH_3); 12,9 (CH_3).

5.4.1.4. Di-Hidroartemisinina 10 α -Benzoato (61)

De acordo com Hindley *et al.*⁶⁷, adicionou-se cloreto de benzoílo (3,17 ml; 27,3 mmol) a uma solução de **2** (5g; 17,6 mmol) dissolvido em DCM (54 ml), previamente seco, e piridina anidra (9 ml), a 0°C e sob atmosfera de azoto. Após 18h em agitação à temperatura ambiente formou-se um precipitado branco que se dissolveu com a adição de AcOEt (100 ml). A fase orgânica obtida foi posteriormente submetida a lavagens consecutivas com HCl (0,01M), solução saturada de NaHCO_3 e água destilada. Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um óleo amarelo que foi recristalizado com uma mistura de éter etílico/hexano.

- Cristais brancos (83%; 5,67 g).
- p.f.: 111-112°C.
- I.V.: $\nu_{\max} = 2968, 2929, 2876, 1730, 1267, 1019 \text{ cm}^{-1}$
- $\delta \text{ }^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 8,12 (2H, d: $J = 7,6 \text{ Hz}$, Ar- H_2), 7,57 (1H, t: $J = 7,4 \text{ Hz}$, Ar- H_4), 7,44 (2H, t: $J = 7,6 \text{ Hz}$, Ar- H_3), 6,01 (1H, d: $J = 10 \text{ Hz}$, H_{10}), 5,53 (1H, s, H_{12}), 2,81-2,70 (1H, m, H_9), 2,39 (1H, dt: $J = 10, 4 \text{ Hz}$, H_4), 2,08-2,00 (1H, m, H_4), 1,95-1,87 (1H, m, H_5), 1,86-1,78 (1H, m, H_8), 1,78-1,72 (1H, m, H_7), 1,72-1,66 (1H, m, H_{8a}), 1,56-1,50 (1H, m,

- H_5), 1,50-1,45 (1H, *m*, H_8), 1,43 (3H, *s*, C_3CH_3), 1,42-1,36 (1H, *m*, H_6), 1,36-1,28 (1H, *m*, H_{5a}), 1,09-1,02 (1H, *m*, H_7), 0,98 (3H, *d*: $J = 6$ Hz, C_6CH_3), 0,93 (3H, *d*: $J = 7,2$ Hz, C_9CH_3).
- $\delta^{13}C$ -RMN (100,61 MHz, $CDCl_3$): 165,5 (C=O), 133,5 (CH), 130,3 (CH), 129,8 (Cq), 128,4 (CH), 104,6 (Cq), 92,7 (CH), 91,8 (CH), 80,4 (Cq), 51,8 (CH), 45,5 (CH), 37,4 (CH), 36,4 (CH_2), 34,3 (CH_2), 32,1 (CH), 26,1 (CH_3), 24,7 (CH_2), 22,2 (CH_2), 20,4 (CH_3), 12,4 (CH_3).

5.4.1.5. C-106 alildeoxoartemisinina (60)

Uma solução de **61** (7,02 g; 18,1 mmol) em DCE anidro (70 ml) foi adicionada a uma mistura de aliltrimetilsilano (13,80 ml; 86,8 mmol) e $ZnCl_2$ (2,96 g; 21,7 mmol) no mesmo solvente (70 ml).^[31] A mistura foi mantida em agitação durante cerca de 2h, na presença de tamizas moleculares de 4 Å activados, sob atmosfera de azoto e á temperatura de 0°C. Ao fim desse tempo deixou-se atingir a temperatura ambiente, e após 2h parou-se a reacção pela adição de AcOEt. Realizaram-se lavagens sucessivas com HCl 0,01M (2 x 100 ml), solução saturada de $NaHCO_3$ (2 x 100 ml) e solução de brine (2 x 100 ml). A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado. Fez-se purificação por cromatografia em coluna usando como eluente hexano com 1% AcOEt.

- Sólido branco (38%; 2,12 g)
- p.f.: 72-75°C.
- I.V: $\nu_{max} = 3437, 2957, 2852, 1640, 1377, 1105, 1058, 879$ cm^{-1}
- δ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 5,98-5,87 (1H, *m*, $CH_a=CH_2$), 5,33 (1H, *s*, H_{12}), 5,15-5,08 (1H, *m*, $CH=CH_c-H$), 5,08-5,03 (1H, *m*, $CH=CH-H_b$), 4,33-4,26 (1H, *m*, H_{10}), 2,73-2,64 (1H, *sext*: $J = 8$ Hz, H_9), 2,45-2,37 (1H, *m*, H_{13}), 2,37-2,27 (1H, *m*, H_4), 2,25-2,16 (1H, *m*, H_{13}), 2,06-1,99 (1H, *m*, H_4), 1,90-1,45 (5H, *m*), 1,42 (3H, *s*, C_3CH_3), 1,37-1,27 (3H, *m*), 0,93-0,86 (1H, *m*), 0,96 (3H, *d*: $J = 6$ Hz, C_6-CH_3), 0,88 (3H, *d*: $J = 7,6$ Hz, C_9-CH_3).
- $\delta^{13}C$ -RMN (100,61 MHz, $CDCl_3$): 136,3 (CH), 116,2 (CH_2), 103,3 (Cq), 89,2 (CH), 81,2 (Cq), 74,8 (CH), 52,5 (CH), 44,5 (CH), 37,6 (CH), 36,7 (CH_2), 34,6 (CH_2), 34,4 (CH_2), 30,4 (CH), 26,3 (CH_3), 25,0 (CH_2), 24,9 (CH_2), 20,4 (CH_3), 13,2 (CH_3).

Como produto secundário da reacção obteve-se o composto AHA (**64**):

- Sólido branco (40%; 2,20 g).
- p.f.: 87-91
- I.V.: $\nu_{\max} = 2922, 2849, 1639, 1373, 1198, 1113, 1078, 991 \text{ cm}^{-1}$
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 6,19 (1H, *d*: $J = 1,6 \text{ Hz}$, H_{10}), 5,54 (1H, *s*, H_{12}), 2,45-2,35 (1H, *m*), 2,10-2,00 (2H, *m*), 1,95-1,87 (1H, *m*), 1,73- 1,63 (2H, *m*), 1,59 (3H, *d*: $J = 1,2 \text{ Hz}$, C_9CH_3), 1,54-1,44 (2H, *m*), 1,43 (3H, *s*, C_3CH_3), 1,25 (1H, *s*), 1,18-1,04 (2H, *m*), 0,98 (3H, *d*: $J = 6 \text{ Hz}$, C_6CH_3).
- $\delta^{13}\text{C-RMN}$ (100,61 MHz, CDCl_3): 135,1 (CH), 108,3 (Cq), 104,7 (Cq), 89,8 (CH), 79,1 (Cq), 51,6 (CH), 44,6 (CH), 37,6 (CH), 36,4 (CH_2), 34,2 (CH_2), 30,1 (CH_2), 26,0 (CH_3), 24,5 (CH_2), 20,4 (CH_3), 16,3 (CH_3).

5.4.1.6. C-106 ácido carboxílico artemisinina (**62**)

A uma solução de **60** (0,2 g; 0,6 mmol) dissolvido em 40 ml de acetona e 40 ml de H_2O destilada, foi adicionado periodato de sódio (0,54 g; 2,5 mmol) e permanganato de potássio (0,06 g; 0,4 mmol).^[60] Após 2h de agitação à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi filtrada e posteriormente basificada com NaOH 10M até pH ≈ 10 . Fez-se extracção com éter etílico e a fase orgânica foi desprezada. A fase aquosa obtida foi acidificada com HCl a 37% até pH ≈ 1 . Fizeram-se 2 extracções com éter etílico e as fases orgânicas obtidas foram secas com Na_2SO_4 anidro, filtradas e o solvente evaporado.

- Óleo amarelo (89%; 0,19 g).
- IV: $\nu_{\max} = 3436, 2943, 1658, 1375, 1086, 1031 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 5,37 (1H, *s*, H_{12}), 4,89-4,82 (1H, *m*, H_{10}), 2,77-2,65 (2H, *m*, $H_9 + H_{13}$), 2,50 (1H, *dd*: $J = 12,4 \text{ Hz}$, $J = 3,6 \text{ Hz}$, H_{13}), 2,37-2,28 (1H, *m*, H_4), 2,06-1,90 (2H, *m*), 1,82-1,76 (1H, *m*), 1,73-1,65 (2H, *m*), 1,50-1,42 (1H, *m*), 1,40 (3H, *s*, C_3CH_3), 1,32-1,20 (4H, *m*), 0,96 (3H, *d*: $J = 6 \text{ Hz}$, C_6CH_3), 0,88 (3H, *d*: $J = 7,6 \text{ Hz}$, C_9CH_3).
- $\delta^{13}\text{C-RMN}$ (100,61 MHz, CDCl_3): 174,4 (C=O), 103,4 (Cq), 89,7 (CH), 80,9 (Cq), 70,8 (CH), 53,7 (CH_2), 43,8 (CH), 37,6 (CH), 36,5 (CH_2), 35,9 (CH_2), 34,4 (CH_2), 29,9 (CH), 25,9 (CH_3), 24,9 (CH_2), 24,8 (CH_2), 20,2 (CH_3), 12,7 (CH_3).

5.4.1.7. C-10B hidroxamato artemisinina (63)

A síntese foi efectuada usando como agente de acoplamento o TBTU.^[73] A uma solução em agitação do derivado **62** (1,3 g; 4 mmol) dissolvido em DCM seco (14 ml) foi adicionado TEA (0,405 g; 1 eq.) e TBTU (1,28 g; 1 eq.), verificando-se a formação de uma suspensão. A mistura reaccional permaneceu sob agitação em atmosfera de azoto à temperatura ambiente até todo o agente de acoplamento ser dissolvido e a mistura reaccional ter um aspecto límpido. Após cerca de 30 min adicionou-se uma solução de cloridrato de *O*, *N*-dimetil-hidroxilamina (0,430 g; 4,4 mmol) dissolvido em DCM seco (2 ml) e TEA (0,445 g; 4,4 mmol). A reacção foi monitorizada por TLC e o pH do meio reaccional medido. Quando necessário (pH < 7) procedeu-se à adição de algumas gotas de TEA, neutralizando-se assim a mistura reaccional. Quando completa parou-se a reacção diluindo-se com DCM (80 ml) e lavando-se sucessivamente com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml) e brine (3 x 20 ml).

Ao contrário do descrito na literatura não se procedeu à realização de lavagens com 3N HCl. O objectivo de se efectuar este procedimento é neutralizar a TEA adicionada em excesso. Contudo, e como verificado na primeira vez que a reacção foi efectuada, o uso de ácidos fortes destrói a estrutura da artemisinina sendo baixo o rendimento final da reacção. Assim, procedeu-se só a lavagens com solução saturada de NaHCO₃, que embora seja um acido fraco é suficiente para esta neutralização.

A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada na totalidade, obtendo-se uma mistura de produtos que foi purificada por cromatografia em coluna (eluente: AcOEt/Hex (1:1)).

- Óleo amarelo (53%; 0,78 g).
- IV: $\nu_{\max} = 2874, 2360, 2343, 1708, 1377, 1012, 912 \text{ cm}^{-1}$.
- δ ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 5,35 (1H, *s*, H₁₂), 4,88-4,80 (1H, *m*, H₁₀), 3,71 (3H, *s*, OCH₃), 3,20 (3H, *s*, N-CH₃), 2,90 (1H, *dd*: *J* = 9,2 Hz, *J* = 5,6 Hz, H₁₃), 2,85-2,74 (1H, *m*, H₉), 2,50-2,42 (1H, *dd*: *J* = 10,8 Hz, *J* = 4,4 Hz, H₁₃), 2,38-2,28 (1H, *m*), 2,05-1,77 (3H, *m*), 1,70-1,65 (2H, *m*), 1,49-1,22 (5H, *m*), 1,41 (3H, *s*, C₃CH₃), 0,96 (3H, *d*: *J* = 6 Hz, C₆CH₃), 0,88 (3H, *d*: *J* = 7,6 Hz, C₉CH₃).

5.4.1.8. C-10B aldeído artemisinina (59)

Para obter o derivado com a função aldeído procedeu-se á redução do composto hidroxamato previamente sintetizado. Seguindo novamente o protocolo experimental aplicado aos α -aminoácidos^[73], a uma solução em agitação de **63** (0,78 g; 2,1 mmol) dissolvido em THF seco (20 ml) foi adicionado lentamente o agente reductor LiAlH₄ (0,1 g; 2,6 mmol). A mistura reaccional foi mantida em banho de gelo de modo a permanecer a uma temperatura de cerca de 0°C. A reacção foi monitorizada por TLC e ficou completa ao fim de 2h. Adicionou-se depois uma solução de KHSO₄ (0,504 g; 3,7 mmol) em H₂O (4 ml) e mais 25 ml de H₂O. A fase aquosa foi tratada com éter etílico (3 x 50 ml) e a fase orgânica obtida foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml) e brine (3 x 20 ml). Após seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada evaporou-se o solvente.

- Espuma amarelada (83%; 0,54 g).
- **IV**: $\nu_{\max} = 2926, 2872, 1722, 1377, 1056, 879 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl₃): 9,90 (1H, *q*: $J = 2 \text{ Hz}$, HC=O), 5,28 (1H, *s*, H₁₂), 4,01-3,94 (1H, *m*, H₁₀), 2,65-2,60 (2H, *m*), 2,41-2,31 (2H, *m*), 2,05-1,98 (1H, *m*), 1,91-1,84 (1H, *m*), 1,74-1,66 (2H, *m*), 1,56-1,45 (3H, *m*), 1,40 (3H, *s*, C₃CH₃), 1,28-1,23 (2H, *m*), 1,08-1,01 (1H, *m*), 0,96 (3H, *d*: $J = 6,4 \text{ Hz}$, C₆CH₃), 0,79 (3H, *d*: $J = 7,2 \text{ Hz}$, C₉CH₃).

5.4.1.9. Híbrido ART-PQ (58)

A uma solução de **59** (0,54 g; 1,7 mmol) em DCM seco (15 ml), em agitação e sob atmosfera de azoto, foi adicionada a primaquina previamente neutralizada (0,496 g; 1,9 mmol). A mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente, durante cerca de 1h, e monitorizada por TLC. Seguidamente procedeu-se em simultâneo à adição de AcOH (0,157 g; 2,6 mmol) e do agente reductor (0,553 g; 2,6 mmol), e deixou-se reagir durante a noite. Após 12h fez-se uma recarga de AcOH (0,105 g; 1,7 mmol) e NaBH(OCOCH₃)₃ (0,369 g; 1,7 mmol), deixando-se reagir por mais 15h. O AcOH foi neutralizado pela adição de solução saturada de NaHCO₃ até pH básico (≈ 10), e fizeram-se lavagens sucessivas com éter etílico (2 x 20 ml) e AcOEt (1 x 20 ml). Após lavagem com brine (1 x 20 ml), secou-se com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se uma mistura de produtos que foi purificada por cromatografia em coluna (sílica gel). Como eluente usou-se uma mistura de solventes nas seguintes percentagens: 1% TEA, 10% MeOH e 89% de AcOEt.

- sólido alaranjado (63%; 0,607 g).
- p.f.: 53-56°C
- $\text{IV: } \nu_{\text{max}} = 3383, 3300, 2873, 1614, 1573, 1520, 1454, 1386, 1051 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN (400 MHz, CDCl}_3\text{)}$: 8,51 (1H, *dd*: $J = 2,4 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_2), 7,93 (1H, *dq*: $J = 3,6 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_4), 7,31 (1H, *qd*: $J = 3,2 \text{ Hz}, 1,2 \text{ Hz}$, Ar- H_3), 6,30 (1H, *t*: $J = 2,2 \text{ Hz}$, Ar- H_5), 6,29 (1H, *d*: $J = 2,4 \text{ Hz}$, Ar- H_7), 5,31 (1H, *d*: $J = 16,8 \text{ Hz}$, H_{12}), 4,50-4,44 (1H, *m*, H_{10}), 3,88 (3H, *s*, -OCH₃), 3,67-3,61 (1H, *m*, $H_{1'}$), 3,32-3,25 (1H, *m*, CH₂ linker), 3,14-3,07 (1H, *m*, $H_{4'}$), 3,02- 2,93 (1H, *m*, CH₂ linker), 2,93-2,82 (1H, *m*, $H_{4'}$), 2,53-2,48 (1H, *m*, H_9), 2,28-2,14 (1H, *m*), 2,12-2,02 (1H, *m*, H_{13}), 1,93-1,58 (10H, *m*), 1,38-1,34 (1H, *m*), 1,31-1,29 (3H, *m*, C₃CH₃), 1,25-1,23 (3H, *m*, C₁-CH₃), 1,21-1,08 (4H, *m*), 0,92-0,88 (3H, *m*, C₆CH₃), 0,80 (3H, *t*: $J = 6,8 \text{ Hz}$, C₉CH₃).
- $\delta^{13}\text{C-RMN (100,61 MHz, CDCl}_3\text{)}$: 159,9 (Cq-Ar), 145,1 (Cq-Ar), 144,7 (CH-Ar), 135,5 (CH-Ar), 130,5 (Cq-Ar), 122,3 (CH-Ar), 103,5 (Cq), 97,9 (CH-Ar), 92,6 (CH-Ar), 90,3 (CH), 81,3 (Cq), 75,4 (CH), 55,7 (-OCH₃), 52,24 (CH), 48,8 (), 48,02 (CH₂ linker), 47,8 (CH₂), 47,6 (CH) 43,8 (CH), 37,6 (CH), 36,8 (CH₂), 34,6 (CH₂), 33,7 (CH₂), 32,3 (CH₂), 30,8 (CH), 26,3 (CH₃), 25,0 (CH₂), 23,6 (CH₂), 20,8 (CH), 20,4 (CH₃), 12,7 (CH₃).
- **ESI-MS (+)** m/z: 554,3549 [M + H⁺]
- **Análise Elementar (%)** para C₃₆H₅₃N₃O₉ (na forma de sal); 671,3782 g mol⁻¹
Calculada: C 64,36; H 7,95; N 6,25
Experimental: C 62,40; H 7,10; N 5,59

5.4.2. Síntese de híbridos de tetraoxanos

5.4.2.1. Ester tetraoxano (72)

A uma solução em agitação de 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo (**68**: 0,310g; 1,8 mmol) dissolvido em ACN (2 ml) foi adicionado HCOOH (1,65 g, 35,8 mmol).^[83] A mistura foi mantida em banho de gelo, à temperatura de 0°C, durante cerca de 10 min. Adicionou-se H₂O₂ a 30% (0,69 ml; 6 mmol), e deixou-se reagir 2h á temperatura ambiente. A reacção foi monitorizada por TLC, tendo-se efectuada após 1h 30 min uma recarga de H₂O₂ a 30%. Quando terminada, a mistura reaccional foi diluída com H₂O destilada (3 ml) e tratada com DCM (8 ml). A fase aquosa foi novamente extraída com DCM. As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporado o solvente. Com o produto obtido seguiu-se para a reacção seguinte.

À mistura, em agitação, sob azoto e a 0°C, previamente preparada de 2-adamantanona (**69**, 0,410 g; 2,7 mmol) e óxido de rênio (VII) (0,018 g; 0,04 mmol) em DCM seco (2 ml), foi adicionada uma solução do hidroperóxido sintetizado anteriormente em DCM (2 ml). A mistura reaccional foi posteriormente colocada á temperatura ambiente, e permaneceu em agitação durante 2h, sendo monitorizada por TLC. Quando completa a mistura reaccional foi diluída com DCM e filtrada a vácuo, através de um *plug de sílica*, para remover o catalisador óxido de rênio (VII). Depois de seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada, evaporada e purificada por cromatografia em coluna usando como eluente hexano com 5% de AcOEt, obteve-se o composto final **72**.

- Sólido branco (47%; 0,3 g).
- p.f.: 74-76°C
- IV: $\nu_{\max} = 2929, 1732, 1445, 1192, 1176, 1060, 923 \text{ cm}^{-1}$.
- δ ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 4,13 (2H, *q*: $J = 7,2 \text{ Hz}$, CH₂CH₃), 3,28-3,03 (1H, *sl*), 3,03-2,75 (1H, *sl*), 2,45-2,35 (1H, *m*, H_{7''}), 2,04-1,47 (22H, *m*), 1,24 (3H, *t*: $J = 7,2 \text{ Hz}$, CH₂CH₃).
- δ ¹³C-RMN (100,61 MHz, CDCl₃): 174,8 (C_{19''}=O), 110,7 (C_q), 107,3 (C_q), 60,6 (CH₂CH₃), 41,8 (CH), 37,1 (CH₂), 33,3 (CH₂), 27,2 (CH), 14,4 (CH₂CH₃)

5.4.2.2. Ácido tetraoxano (**67**)

Com base na literatura referida anteriormente ^[83], a uma solução de **72** (0,3 g; 0,85 mmol) numa mistura de *i*-propanol/H₂O (3:1, 20 ml) em agitação, adicionou-se solução de NaOH 10M (47,8 µl; 2,55 mmol). A mistura reaccional foi aquecida até atingir a temperatura de 80°C, na qual permaneceu 30 min. Quando terminada a hidrólise, o balão de reacção foi arrefecido até temperatura ambiente e a mistura diluída com H₂O destilada (20 ml) e DCM (30 ml). Após separação de fases, a fase aquosa foi acidificada com solução de HCl 1M até pH ≈ 2 e novamente extraída com DCM (3 \times 20 ml). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com H₂O destilada (1 \times 20 ml) e solução de brine (1 \times 20 ml), secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporadas. Por recristalização com éter etílico obteve-se o produto final.

- Cristais brancos (96%; 0,265 g).
- p.f.: 182-186°C
- IV: $\nu_{\max} = 2908, 1697, 1446, 1217, 1060, 997 \text{ cm}^{-1}$.
- δ ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 3,26-3,02 (1H, *sl*), 3,02-2,81 (1H, *sl*), 2,52-2,40 (1H, *m*, H_{7''}), 2,10-1,46 (22H, *m*).

- $\delta^{13}\text{C-RMN}$ (100,61 MHz, CDCl_3): 180,3 (C=O), 110,7 (Cq), 107,3 (Cq), 41,3 (CH), 37,1 (CH₂), 33,3 (CH₂), 27,2 (CH).

5.4.2.3. Híbrido com função amida (66)

A uma solução de **67** (0,1 g; 0,31 mmol) em DCM seco (7 ml) foi adicionada TEA (0,05 g; 0,5 mmol) e TBTU (0,099 g; 0,31 mmol). A mistura reaccional permaneceu em agitação, sob atmosfera de azoto e à temperatura de 0°C durante 60 min. Em seguida foi adicionada uma solução de PQ na forma de sal (0,140 g; 0,31 mmol) e TEA (0,033 g; 0,33 mmol), em DCM (2 ml). O banho de gelo foi removido passados 30 min e deixou-se decorrer a reacção durante a noite, à temperatura ambiente. Monitorizou-se por TLC e após 13h deu-se a reacção por terminada. Diluiu-se a mistura reaccional com AcOEt (30 ml) e extraiu-se com solução saturada de NaHCO_3 (30 ml). A fase orgânica separada foi guardada e a fase aquosa lavada com AcOEt (2 x 30 ml). Todas as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de NaHCO_3 (30 ml) e solução de brine (2 x 30 ml). Após seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada obteve-se um óleo amarelo que foi purificado por cromatografia de coluna (eluente: Hexano/AcOEt (4:6)).

- Sólido amarelo (44%; 0,076 g).
- p.f.: 78-82°C
- IV : $\nu_{\text{max}} = 3383, 3300, 2933, 1641, 1614, 1595, 1577, 1454, 1386, 1220, 1060, 997 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 8,53 (1H, *dd*: $J = 2,4 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_2), 7,93 (1H, *dd*: $J = 6,8 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_4), 7,31 (1H, *q*: $J = 4,4 \text{ Hz}$, Ar- H_3), 6,34 (1H, *d*: $J = 2,4 \text{ Hz}$, Ar- H_7), 6,28 (1H, *d*: $J = 2,4 \text{ Hz}$, Ar- H_5), 5,98 (1H, *d*: $J = 8,4 \text{ Hz}$, NH), 5,58-5,50 (1H, *m*, NH), 3,89 (3H, *s*, -OCH₃), 3,69-3,56 (1H, *m*, $H_{1'}$), 3,34-3,20 (2H, *m*, $H_{4'}$), 3,18-3,02 (2H, *sl*), 2,10-1,46 (24H, *m*), 1,29 (3H, *d*: $J = 6,4 \text{ Hz}$, C₁-CH₃).
- $\delta^{13}\text{C-RMN}$ (100,61 MHz, CDCl_3): 174,3 (C=O), 159,3 (Cq), 144,8 (Cq), 144,3 (CH), 135,3 (Cq), 134,8 (CH), 129,9 (Cq), 121,9 (CH), 110,5 (Cq), 107,1 (Cq), 96,9 (CH), 91,7 (CH), 55,2 (-OCH₃), 47,7 (CH), 44,1 (CH₂), 39,3 (CH₂), 36,9 (CH), 33,8 (CH₂), 33,1 (CH₂), 26,9 (CH), 26,1 (CH₂), 20,6 (CH₃).
- ESI-MS (+) *m/z*: 566,3229 [M + H⁺]
- Análise Elementar (%) para C₃₂H₄₃N₃O₆: 565,3152 gmol^{-1}
Calculada: C 67,94; H 7,66; N 7,43
Experimental: C 67,57; H 7,52; N 7,07

5.4.2.4. Derivado Hidroxamato (73)

Usou-se o mesmo procedimento que no ponto 5.4.1.7., e a única alteração introduzida foi o eluente usado na cromatografia em coluna: Hexano/AcOEt (4:6). A reacção foi realizada a partir de 0,77 mmol (0,25 g) do composto **67**.

- Sólido branco (92%; 0,26 g).
- p.f.: 115-118°C
- IV: $\nu_{\max} = 2935, 2360, 1660, 1417, 1388, 1060, 997 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 3,70 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,18 (3H, s, $-\text{NCH}_3$), 2,80-2,69 (1H, m, $H_{7'}$), 2,04–1,50 (22H, m).

5.4.2.5. Derivado Aldeído (71)

Usou-se o mesmo procedimento que no ponto 5.4.1.8. A reacção de redução, catalisada pelo reagente LiAlH_4 , iniciou-se com 0,68 mmol (0,25 g) do composto **73**.

- Óleo transparente (100%; 0,21 g).
- IV: $\nu_{\max} = 2918, 2856, 1714, 1361, 1062, 997 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 9,65 (1H, s, $\text{HC}=\text{O}$), 3,23-3,10 (1H, sl), 2,90-2,70 (1H, sl), 2,39-2,29 (1H, m, $H_{7'}$), 2,04–1,50 (22H, m).

5.4.2.6. Híbrido com função amina (70)

O procedimento aplicado encontra-se previamente descrito no ponto 5.4.1.9., aquando síntese do composto híbrido **58**. A reacção iniciou-se com 0,658 mmol (0,203 g) do aldeído **71**, tendo-se alterado o tempo total de reacção; em vez de se deixar a reagir durante a noite fez-se recarga com AcOH (1 eq.) e $\text{NaBH}(\text{OCOCH}_3)$ (1 eq.) após 5h. Monitorizou-se por TLC e após 7h deu-se a reacção por terminada. O eluente usado para a purificação do produto de reacção foi: TEA:MeOH:AcOEt (0,5:1:8,5).

- Espuma amarela (65%; 0,23 g)
- IV: $\nu_{\max} = 3294, 3203, 1660, 1613, 1541, 1457, 1378, 1165, 1093, 971 \text{ cm}^{-1}$.
- $\delta^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): 8,52 (1H, dd: $J = 2,8 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_2), 7,91 (1H, dd: $J = 6,8 \text{ Hz}, 1,6 \text{ Hz}$, Ar- H_4), 7,30 (1H, q: $J = 4,1 \text{ Hz}$, Ar- H_3), 6,33 (1H, d: $J = 2,4 \text{ Hz}$, Ar- H_7), 6,28 (1H, d: $J = 2,4 \text{ Hz}$, Ar- H_5), 6,03 (1H, d: $J = 7,6 \text{ Hz}$, NH), 3,88 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,68-

3,56 (1H, *m*, CH₁), 3,22-2,97 (2H, *sl*), 2,63 (2H, *t*: $J = 6,8$ Hz, H₄), 2,47 (2H, *d*: $J = 6$ Hz, CH_{2 linker}), 2,03-1,41 (24H, *m*), 1,30 (3H, *d*: $J = 6,4$ Hz, C₁·CH₃).

- δ ¹³C-RMN (100,61 MHz, CDCl₃): 159,6 (Cq), 145,2 (Cq), 144,5 (CH), 135,6 (Cq), 134,9 (CH), 130,1 (Cq), 122 (CH), 110,5 (Cq), 108,3 (Cq), 96,9 (CH), 91,8 (CH), 55,4 (-OCH₃), 55,3 (CH_{2 linker}), 50,1 (CH₂), 48,2 (CH), 37,2 (CH₂), 37,1 (CH), 34,5 (CH₂), 33,3 (CH₂), 27,3 (CH), 26,6 (CH₂), 20,8 (C₁·CH₃).
- ESI-MS (+) *m/z*: 552,3425 [M + H⁺]
- Análise Elementar (%) para C₃₂H₄₅N₃O₅; 551,3359 gmol⁻¹
Calculada: C 69,66; H 8,22; N 7,62
Experimental: C 69,12; H 8,51; N 7,31

5.5. Estabilidade dos híbridos sintetizados

O estudo da estabilidade dos derivados foi efectuado por HPLC, utilizando-se um método por amostragem no qual várias alíquotas da mistura reaccional foram retiradas e analisadas ao longo do tempo. A análise fez-se por injeção das amostras no cromatógrafo do sistema de HPLC utilizado, através de um injector com capacidade para 20 µl. Dependendo do composto injectado a proporção entre a fase aquosa e a fase orgânica do eluente era variável, tal como referido no capítulo III. O estudo de estabilidade em tampão fosfato foi realizado em duplicado, enquanto os restantes estudos nos meios biológicos utilizados foram efectuados em triplicado. Para todos os ensaios o comprimento de onda utilizado foi 270 nm, escolhido pela determinação da absorvância máxima por espectroscopia de UV-Visível.

5.5.1. Estabilidade em tampão fosfato

Este estudo de estabilidade iniciou-se pela transferência de 5ml de tampão fosfato isotónico pH = 7,4 para um frasco de reacção de vidro que foi colocado num banho de água a 37°C. Após estabilizada a temperatura adicionou-se 5 µl da solução do substrato na concentração de 10⁻² mol.dm⁻³ (previamente preparada em acetonitrilo), obtendo-se assim uma concentração final de 10⁻⁵ mol.dm⁻³. Várias alíquotas foram retiradas ao longo do ensaio e injectadas directamente no cromatógrafo para análise.

5.5.2. Estabilidade em plasma humano

O sangue para este ensaio foi recolhido de vários doadores saudáveis para tubos contendo heparinato de sódio. Depois de centrifugado, o plasma foi reunido e dividido por vários frascos de vidro (2ml) e armazenado a -20°C . Aquando da sua utilização, o plasma foi descongelado gradualmente de modo a evitar a desnaturação das proteínas.

O estudo de estabilidade dos substratos foi realizado em plasma humano a 80% diluído com tampão fosfato isotónico $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 7,4 (2 ml de plasma mais 0,5 ml de tampão). O frasco de vidro contendo o plasma diluído foi colocado num banho termostaticado a 37°C , de modo a estabilizar a temperatura do meio reaccional, adicionando-se posteriormente uma alíquota ($12,5 \mu\text{l}$) da solução stock do substrato, obtendo-se uma concentração de $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Em tempos determinados com inicio no tempo zero, $100 \mu\text{l}$ da mistura reaccional, foi transferida para *eppendorfs* contendo $200 \mu\text{l}$ de acetonitrilo, ocorrendo precipitação das proteínas do plasma e término da reacção. A mistura foi centrifugada durante 5 minutos (13000 rpm) e retirou-se, cuidadosamente, o sobrenadante para injeção e análise no cromatógrafo.

5.5.3. Estabilidade em Homogenato de Fígado de Rato

O concentrado de homogenato de fígado de rato, obtido comercialmente, foi conservado á temperatura de -20°C .

Aquando realização do ensaio colou-se $10 \mu\text{l}$ do concentrado de homogenato num *eppendorf* de 2 ml, e adicionou-se sequencialmente $920 \mu\text{l}$ de tampão fosfato isotónico, $50 \mu\text{l}$ de sistema gerador de NADPH e $10 \mu\text{l}$ de glucose 6-P-desidrogenase. Após uma breve estabilização da temperatura até 37°C adicionou-se $10 \mu\text{l}$ do substrato $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, de modo a obter uma concentração final de $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Durante o decorrer da reacção foi-se retirando $50 \mu\text{l}$ de amostra em tempos determinados, os quais eram transferidos para *eppendorfs* contendo $450 \mu\text{l}$ de acetonitrilo dando-se a reacção por terminada. A mistura foi centrifugada (5 minutos, 13000 rpm) e injectou-se o sobrenadante, contendo uma concentração de $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de substrato, no cromatógrafo do sistema de HPLC para análise.

Capítulo 6

Bibliografía

- (1) Sinclair, D., Zani, B., Donegan, S., Olliaro, P., and Garner, P.. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev.* **2009.** 8: 3-5;
- (2) <http://www.who.int/topics/malaria/en/>;
- (3) WHO. 2010. World Malaria Report 2010. WHO Press;
- (4) <http://www.malaria.org/>;
- (5) Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H. and Duffy, P. E.. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* **2008.** 118:1266-76;
- (6) Greenwood, B. M., Bojang, K., Whitty, C. J. M. and Targett, G. A. T.. Malaria. *Lancet.* **2005.** 365:1487-98;
- (7) Crutcher, J. M and Hoffman, S. L.. *Medical Microbiology.* University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. **1996.** Chapter 83;
- (8) Wirth, D. F. Biological revelations. *Nature.* **1992.** 419:495-6;
- (9) Shio, M. T., Kassa, F. A., Bellemare, M-J. and Olivier, M.. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect.* **2010.** 12:889-99;
- (10) Stiebler, R., Correa Soares, J. B. R., Timm, B. L., Silva, J. R., Mury, F. B., Dansa-Petretski, M. and Oliveira, M. F.. On the mechanisms involved in biological heme crystallization. *J Bioenerg Biomembr.* **2011.** 43:93-99;
- (11) Bray, P. G., Ward, S. A. and O’neill, P. M.. Quinolines and Artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2005.** 295:3-38;
- (12) Francis, S. E., Sullivan, D. J. and Goldberg, D. E.. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium Falciparum.* *Annu. Rev. Microbiol.* **1997.** 51:97-123;
- (13) Egan, T. J.. Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol.* **2008.** 157:127-132;
- (14) Egan, T. J.. Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets.* **2003.** 2:115-124;
- (15) Rosenthal, P. J.. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerg Infect Dis.* **1998.** 4:49-57;
- (16) Sahu, N. K., Sahu, S. and Kohli. D. V.. Novel molecular targets for antimalarial drug development. *Chem Biol Drug Des.* **2008.** 71:287-97;
- (17) Bruce-Chwatt, L. J.. Classification of antimalarial drugs in relation to different stages in the life-cycle of the parasite: commentary on a diagram. *Bull World Health Organ.* **1962.** 27: 287-290;
- (18) Roepe, P. D.. Malarial parasite pathogenesis and drug targets. *F1000 Biol Rep.* **2009.** 1:18;
- (19) Meshnick, S. R., Taylor, T. E. and Kamchonwongpaisan, S.. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev.* **1996.** 60:301-15;
- (20) Medhi, B., Patyar, S., Rao, R. S., Byrav, D. S. P. and Prakash, A.. Pharmacokinetic and toxicological profile of artemisinin compounds: an update. *Pharmacology.* **2009.** 84:323-32;
- (21) Woodrow, C. J., Haynes, R. K. and Krishna, S.. Artemisinins. *Postgrad Med J.* **2005.** 81:71-8;
- (22) Meshnick, S. R.. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* **2002.** 32:1655-60;

- (23) Hao, H.-D., Li, Y., Han, W.-B. and Wu, Y.. A Hydrogen Peroxide Based Access to Qinghaosu (Artemisinin). *Org Lett.* **2011**.
- (24) Li, J. and Zhou, B.. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules.* **2010.** 15:1378-97;
- (25) Meunier, B. and Robert, A.. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Acc Chem Res.* **2010.** 43:1444-1451;
- (26) O'Neill, P. M. and Posner, G. H.. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem.* **2004.** 47:2945-64;
- (27) Kumar, N., Singh, R. and Rawat, D. S.. Tetraoxanes: synthetic and medicinal chemistry perspective. *Med Res Rev.* **2010**.
- (28) Opsenica, I., Opsenica, D., Lanteri, C. A., Anova, L., Milhous, W. K., Smith, K. S. and Solaja, B. A.. New chimeric antimalarials with 4-aminoquinoline moiety linked to a tetraoxane skeleton. *J Med Chem.* **2008.** 51:6216-9;
- (29) Dhanawat, M., Das, N., Nagarwal, R. C. and Shrivastava, S. K.. Antimalarial drug development: past to present scenario. *Mini Rev Med Chem.* **2009.** 9:1447-69;
- (30) Dong, Y., Matile, H., Chollet, J., Kaminsky, R., Wood, J. K. and Vennerstrom, J. L.. Synthesis and antimalarial activity of 11 dispiro-1,2,4,5-tetraoxane analogues of WR 148999. 7,8,15,16-Tetraoxadispiro[5.2.5.2]hexadecanes substituted at the 1 and 10 positions with unsaturated and polar functional groups. *J Med Chem.* **1999.** 42:1477-80;
- (31) Opsenica, D. M. and Šolaja, B. A.. Antimalarial peroxides. *Society.* **2009.** 74:1155-1193;
- (32) a) Haynes, R. K. and Krishna, S.. Artemisinins: activities and actions. *Microbes and infection.* **2004.** 6:1339-46; b) Opsenica, I., Terzić, N., Opsenica, D., Angelovski, G., Lehnig, M., Eilbracht, P., Tinant, B., Juranić, Z., Smith, K. S., Yang, Y. S., Diaz, D. S., Smith, P.L., Milhous, W. K., Doković, D. and Solaja, B. A.. Tetraoxane antimalarials and their reaction with Fe(II). *J Med Chem.* **2006.** 49:3790-9;
- (33) Posner, G. H. and O'Neill, P. M.. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc Chem Res.* **2004.** 37:397-404;
- (34) Cazelles, J., Robert, A. and Meunier, B.. Alkylation of heme by artemisinin, an antimalarial drug. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC – Chemistry.* **2001.** 4:85-89;
- (35) Kannan, R., Sahal, D. and Chauhan, V. S.. Heme-Artemisinin Adducts Are Crucial Mediators of the Ability of Artemisinin to Inhibit Heme Polymerization. *Chem Biol.* **2002.** 9:321-332;
- (36) Haynes, R. K., Chan, W. C., Lung, C.-M., Uhlemann, A.-C., Eckstein, U., Taramelli, D., Parapini, S., Monti, D. and Krishna, S.. The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: the unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *ChemMedChem.* **2007.** 2:1480-1497;
- (37) Cardi, D., Pozza, A., Arnou, B., Marchal, E., Clausen, J. D., Andersen, J. P., Krishna, S., Møller, J. V., Maire, M. le and Jaxel, C.. Purified E255L mutant SERCA1a and purified PfATP6 are sensitive to SERCA-type inhibitors but insensitive to artemisinins. *J Biol Chem.* **2010.** 285:26406-16;
- (38) White, N. J.. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science.* **2008.** 320:330-4;
- (39) O'Neill, P. M., Miller, A., Bishop, L. P., Hindley, S., Maggs, J. L., Ward, S. A., Roberts, S. M., Scheinmann, F., Stachulski, A. V., Posner, G. H. and Park, B. K.. Synthesis, antimalarial activity, biomimetic iron(II) chemistry, and in vivo metabolism of novel, potent C-10-phenoxy derivatives of dihydroartemisinin. *J Med Chem.* **2001.** 44:58-68;

- (40) Vale, N., Moreira, R. and Gomes, P.. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem.* **2009.** 44:937-53;
- (41) Edwards, G.. Antimalarial chemotherapy: Mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. *Br J Clin Pharmacol.* **2001.** 52:464;
- (42) Basso, L. G. M., Rodrigues, R. Z., Naal, R. M. Z. G. and Costa-Filho, A. J.. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim Biophys Acta.* **2011.** 1808:55-64;
- (43) Mihaly, G. W., Ward, S. A., Edwards, G., Orme, M. L. and Breckenridge, A. M.. Pharmacokinetics of primaquine in man: identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite. *Br J Clin Pharmacol.* **1984.** 17:441-6;
- (44) a) Bowman, Z. S., Morrow, J. D., Jollow, D. J. and McMillan, D. C.. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther.* **2005.** 314:838-45; b) Bowman, Z. S., Oatis, J. E. Jr., Whelan, J. L., Jollow, D. J. and McMillan, D. C.. Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther.* **2004.** 309:79-85;
- (45) Bolchoz, L. J., Budinsky, R. A., Mcmillan, D. C. and Jollow, D. J.. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J Pharmacol Exp Ther.* **2001.** 297:509-15;
- (46) Vásquez-Vivar, J. and Augusto, O.. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. Oxidation and redox cycling. *J Biol Chem.* **1992.** 267:6848-54;
- (47) Clark, A. M., Hufford, C. D., Puri, R. K. and McChesney, J. D.. Production of a novel dimeric metabolite of primaquine by *Streptomyces rimosus*. *Appl Environ Microb.* **1984.** 47:540-3;
- (48) Hufford, C. D., Clark, A. M., McChesney, J. D. and Baker, J. K.. Stereochemistry of dimeric microbial metabolites of primaquine. *J Org Chem.* **1984.** 49:2822-2823;
- (49) Percy, M. J., McFerran, N. V. and Lappin, T. R. J.. Disorders of oxidised haemoglobin. *Blood Rev* **2005.** 19:61-8;
- (50) McMillan, D. C., Powell, C. L., Bowman, Z. S., Morrow, J. D. and Jollow, D. J.. Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. *Toxicol sci.* **2005.** 88:274-83;
- (51) Meunier, B.. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc Chem Res.* **2008.** 41:69-77;
- (52) Walsh, J. J., Coughlan, D., Heneghan, N., Gaynor, C. and Bell, A.. A novel artemisinin-quinine hybrid with potent antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett.* **2007.** 17:3599-602;
- (53) Zimmermann, G. R., Lehár, J. and Keith, C. T.. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today.* **2007.** 12: 34-42;
- (54) Morphy, R., Kay, C. and Rankovic, Z.. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today.* **2004.** 9:641-51;
- (55) White, N., Nosten, F., Hien, T. T., Watkins, W. and Olliaro, P.. Averting a malaria disaster. *Lancet.* **1999.** 354:1389-1390;
- (56) a) Muregi, F. W. and Ishih, A.. Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. *Drug Develop Res.* **2010.** 71:20-32; b) Capela, R., Oliveira, R., Gonçalves, L. M., Domingos, A., Gut, J., Rosenthal, P. J., Lopes, F. and Moreira, R.. Artemisinin-dipeptidyl vinyl sulfone hybrid molecules: Design, synthesis and preliminary SAR for antiplasmodial activity and falcipain-2 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett.* **2009.** 19:3229-3232;

- (57) Vale, N., Prudêncio, M., Marques, C. A., Collins, M. S., Gut, J., Nogueira, F., Matos, J., Rosenthal, P. J., Cushion, M. T., Rosário, V. E. do, Mota, M. M., Moreira, R. and Gomes, P. Imidazoquinones as antimalarial and antipneumocystis agents. *J Med Chem.* **2009.** 52:7800-7;
- (58) Wells, T. N. C., Burrows, J. N. and Baird, J. K.. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **2010.** 26:145-51;
- (59) Chaturvedi, D., Goswami, A., Saikia, P. P., Barua, N. C. and Rao, P. G.. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem Soc Rev.* **2010.** 39:435-454;
- (60) Stocks, P. A., Bray, P. G., Barton, V. E., Al-Helal, M., Jones, M., Araujo, N. C., Gibbons, P., Ward, S. A., Hughes, R. H., Biagini, G. A., Davies, J., Amewu, R., Mercer, A. E., Ellis, G. and O'Neill, P. M.. Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2007.** 46: 6278-83;
- (61) Blaskó, G., Cordell, G. A. and Lankin, D. C.. Definitive ¹H- and ¹³C-nmr Assignments of Artemisinin (Qinghaosu). *J Nat Prod.* **1988.** 51:1273-1276;
- (62) Silverstein, R. M., Webster, F. X. and Kiemle, D. J.. *Spectrometric identification of organic compounds.* Seventh Edition. John Wiley & Sons, Inc. 2005;
- (63) Brossi, A., Venugopalan, B., Dominguez Gerpe, L., Yeh, H. J., Flippen-Anderson, J. L., Buchs, P., Luo, X., D. Milhous, W. and Peters, W.. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *J Med Chem.* **1988.** 31:645-50;
- (64) D'Acquarica, I., Gasparrini, F., Kottoni, D., Pierini, M., Villani, C., Cabri, W., Mattia, M. Di and Giorgi, F.. Stereodynamic investigation of labile stereogenic centres in dihydroartemisinin. *Molecules.* **2010.** 15:1309-23;
- (65) Wei, G-F., Liao, X-J., Pan, G-Y., Huang, Z-L., Cheng, J-S. and He, Y-C.. Facile One-pot Conversion and Characterization of Dihydroartemisinin and Artemether. *J Nat Prod.* **2010.** 3:161-4;
- (66) Cabri, W., D'Acquarica, I., Simone, P., Iorio, M. Di., Mattia, M. Di., Gasparrini, F., Giorgi, F., Mazzanti, A., Pierini, M., Quaglia, M. and Villani, C. Stereolability of dihydroartemisinin, an antimalarial drug: a comprehensive thermodynamic investigation. Part 1. *J Org Chem.* **2011.** 76: 1751-8;
- (67) Hindley, S., Ward, S. A., Storr, R. C., Searle, N. L., Bray, P. G., Park, B. K., Davies, J. and O'Neill, P. M.. Mechanism-based design of parasite-targeted artemisinin derivatives: synthesis and antimalarial activity of new diamine containing analogues. *J Med Chem.* **2002.** 45: 1052-63;
- (68) O'Neill, P. M., Pugh, M. D., Stachulski, A. V., Ward, S. A., Davies, J. and Park, B. K.. Optimisation of the allylsilane approach to C-10 deoxy carba analogues of dihydroartemisinin: synthesis and in vitro antimalarial activity of new, metabolically stable C-10 analogues. *J Chem Soc., Perkin Trans. 1.* **2001.** 2682-2689;
- (69) Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. and Wothers, P.. *Organic Chemistry.* Oxford University Press Inc., New York. 2001;
- (70) Lemieux, R. U. and Rudloff, E. V. Periodate - permanganate oxidations: I. Oxidation of olefins. *Can J Chemistry.* **1955.** 33: 1701-1709;
- (71) Monson, R. S.. *Advanced Organic Synthesis: Methods and Techniques.* Academic Press. 1971;
- (72) Dash, S., Patel, S. and Mishra, B. K.. Oxidation by permanganate: synthetic and mechanistic aspects. *Tetrahedron.* **2009.** 65: 707-739;

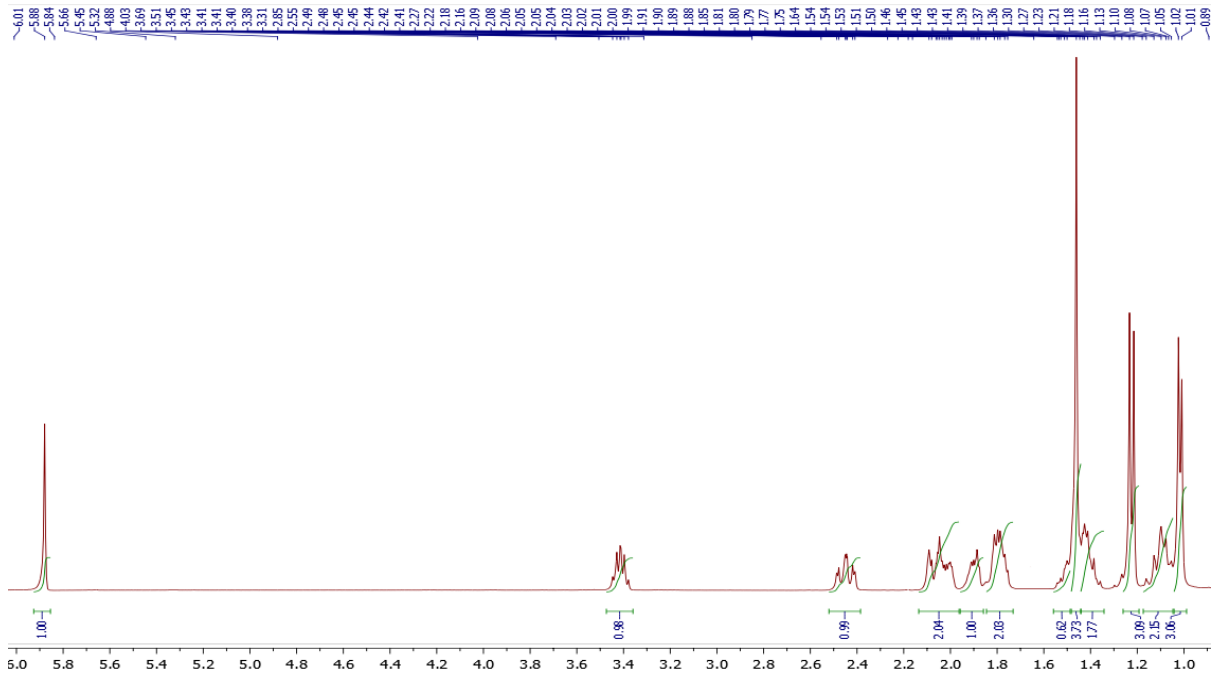
- (73) Fehrentz, J-A. and Castro, B.. An Efficient Synthesis of Optically Active α -(t-Butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -Amino Acids. *Synthesis*. **1983**. 1983:676-678;
- (74) Han, K.-J. and Kim, M.. Direct synthesis of weinreb amides from carboxylic acids using triphosgene. *ChemInform*. **2007**. 38: 20-22;
- (75) Luca, L. De., Giacomelli, G. and Taddei, M.. An easy and convenient synthesis of weinreb amides and hydroxamates. *J Org Chem*. **2001**. 66: 2534-2537;
- (76) Valeur, E. and Bradley, M.. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev*. **2009**. 38: 606-31;
- (77) Balalaie, S., Mahdidoust, M. and Chemistry, P.. TBTU as an efficient coupling reagent for the amidation and phenylhydrazation of carboxylic acids at room temperature. *Peptide ch*. **2007**. 4: 364-369;
- (78) Abdel-Magid, A. F. and Mehrman, S. J.. A Review on the use of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. *Org Process Res Dev*. **2006**. 10: 971-1031;
- (79) Carlson, M. W., Ciszewski, J. T., Bhatti, M. M., Swanson, W. F. and Wilson, A. M.. A simple secondary amine synthesis: Reductive amination using sodium triacetoxyborohydride. *J Chem Educ*. **2000**. 77: 270;
- (80) Abdel-Magid, A. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. A. and Shah, R. D.. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J Org Chem*. **1996**. 61: 3849-3862;
- (81) Clark, A. M., Hufford, C. D., Gupta, R. C., Puri, R. K. and McChesney, J. D.. Microbial transformation of primaquine by *Candida tropicalis*. *Appl Environ Microb*. **1984**. 47: 537-9;
- (82) Mitra, A., Assarpour, A., Seaton, P. J. and Williamson, R. T.. Synthesis of quinolines and their characterization by 2-D NMR Spectroscopy. *J Chem Educ*. **2002**. 79: 106;
- (83) O'Neill, P. M., Amewu, R. K., Nixon, G. L., Bousejra ElGarah, F., Mungthin, M., Chadwick, J., Shone, A. E., Vivas, L., Lander, H., Barton, V., Muangnoicharoen, S., Bray, P. G., Davies, J., Park, B. K., Wittlin, S., Brun, R., Preschel, M., Zhang, K. and Ward, S. A.. Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2010**. 49: 5693-7;
- (84) Dong, Y.. Synthesis and antimalarial activity of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Mini-rev Med Chem*. **2002**. 2: 113-23;
- (85) Opsenica, I., Opsenica, D., Smith, K. S., Milhous, W. K. and Solaja, B. A.. Chemical stability of the peroxide bond enables diversified synthesis of potent tetraoxane antimalarials. *J Med Chem*. **2008**. 51: 2261-6;
- (86) Rhodes, C. T. and Carstensen, J. T.. *Drug stability: principles and practices*. 3rd Edition. Marcel Dekker Inc, New York. 2000;
- (87) Portela, M. J., Moreira, R., Valente, E., Constantino, L., Iley, J., Pinto, J., Rosa, R., Cravo, P. and Rosário, V. E. do. Dipeptide derivatives of primaquine as transmission-blocking antimalarials: effect of aliphatic side-chain acylation on the gametocytocidal activity and on the formation of carboxyprimaquine in rat liver homogenates. *Pharm Res*. **1999**. 16: 949-55;
- (88) Chang, T. K. H., Crespi, C. L. and Waxman, D. J.. Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. *Methods Mol Biol*. **2006**. 320: 127-31;

- (89) www.bdbiosciences.com (Mammalian Liver Microsomes Guidelines for use. TF000017, Rev1.0);
- (90) Silverman, R. B.. *The organic chemistry of drug design and drug action*. Second Edition. Elsevier Academic Press. 2004;
- (91) Capela, R., Cabal, G. G., Rosenthal, P. J., Gut, J., Mota, M. M., Moreira, R., Lopes, F. and Prudêncio, M.. Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy. *Antimicrob Agents Ch.* **2011**. 55: 4698-4706;
- (92) Coterón, J. M., Catterick, D., Castro, J., Chaparro, M. J., Díaz, B., Fernández, E., Ferrer, S., Gamo, F. J., Gordo, M., Gut, J., Heras, L. de las, Legac, J., Marco, M., Miguel, J., Muñoz, V., Porras, E., Rosa, J. C. de la, Ruiz, J. R., Sandoval, E., Ventosa, P., Rosenthal, P. J. and Fiandor, J. M.. Falcipain inhibitors: optimization studies of the 2-pyrimidinecarbonitrile lead series. *J Med Chem.* **2010**. 53: 6129-52;
- (93) Brossi, A., Venugopalan, B., Dominguez Gerpe, L., Yeh, H. J. C., Flippen-Anderson, J. L., Buchs, P., Luo, X. D., Milhous, W.; and Peters, W.. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *J Med Chem.* **1988**. 31: 645-650;

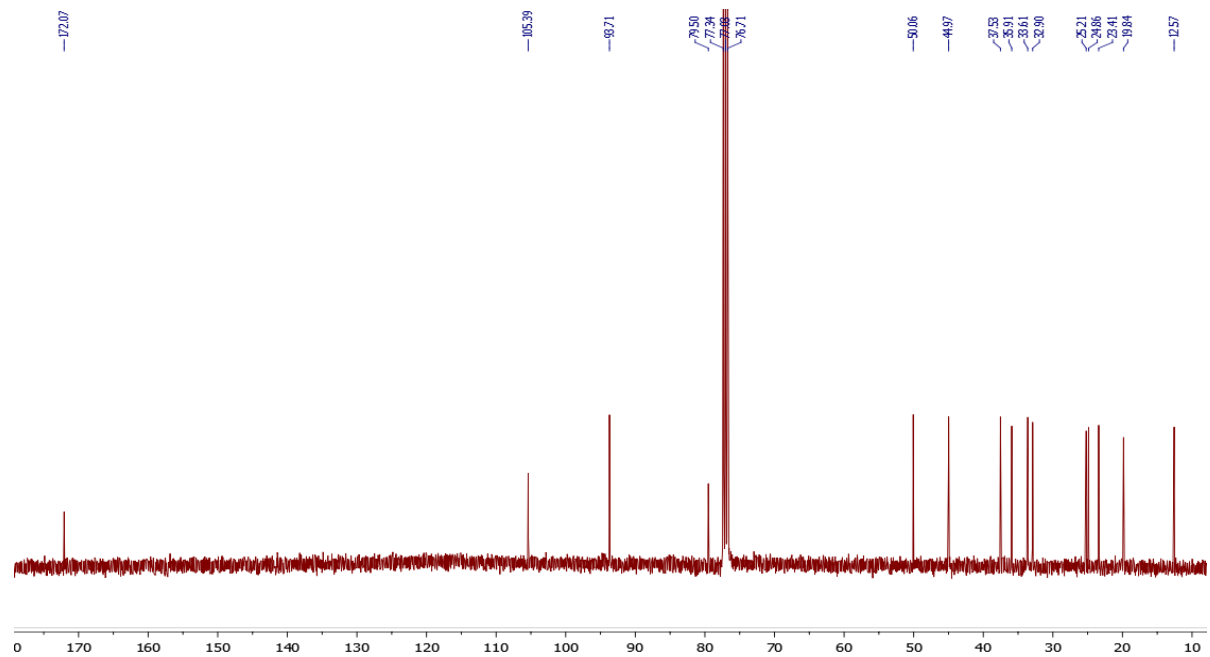
Capítulo 7

Anexos

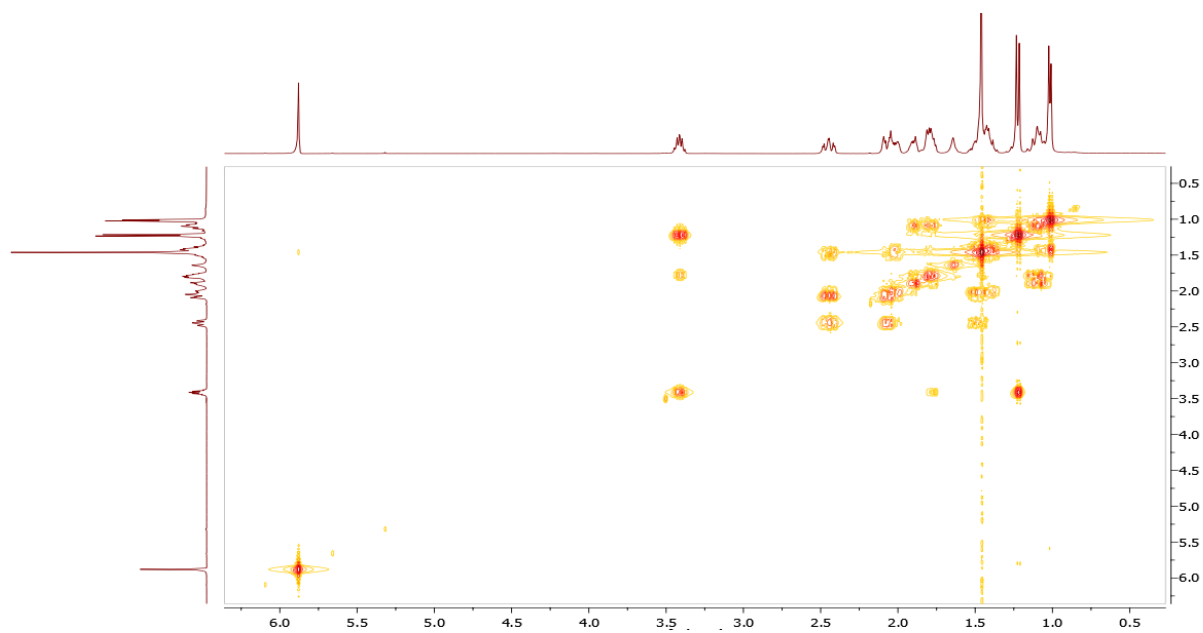
Espectro ¹H-RMN da Artemisinina (1)



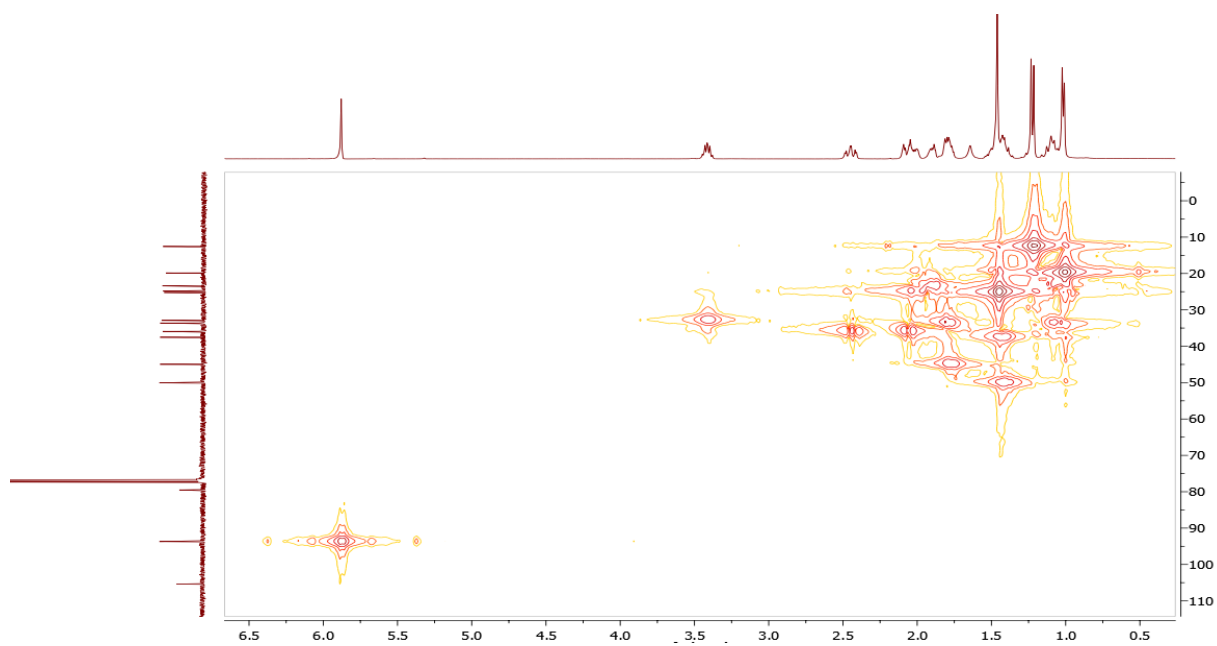
Espectro ¹³C-RMN da Artemisinina (1)

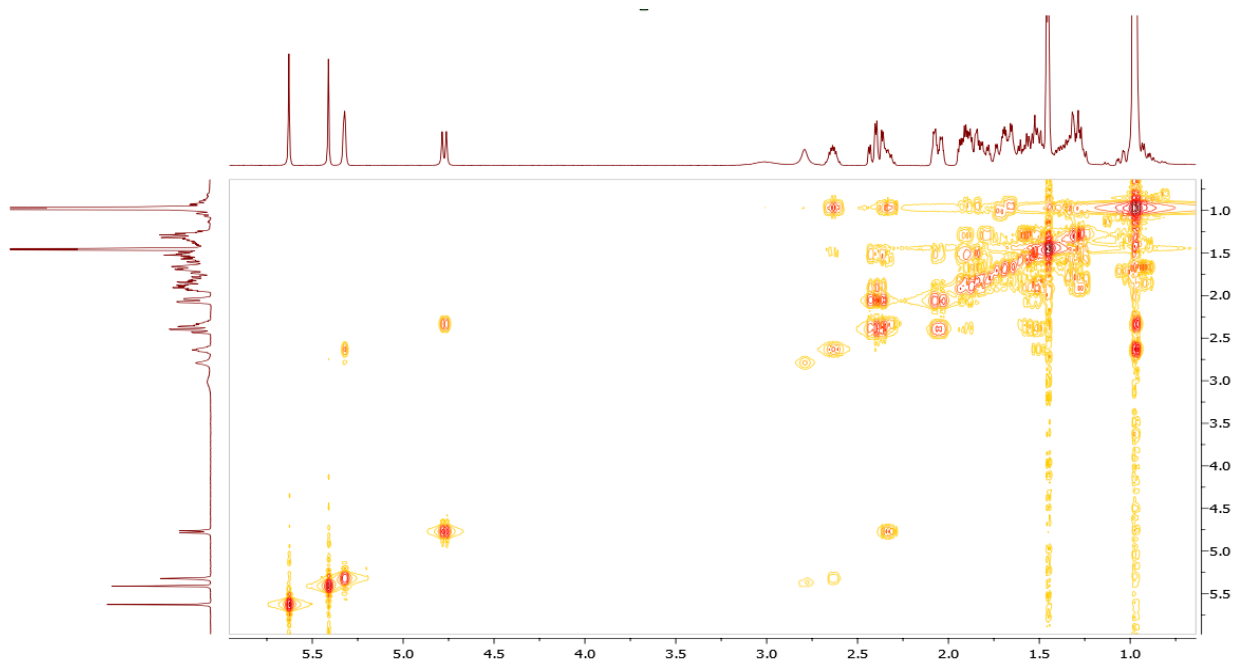
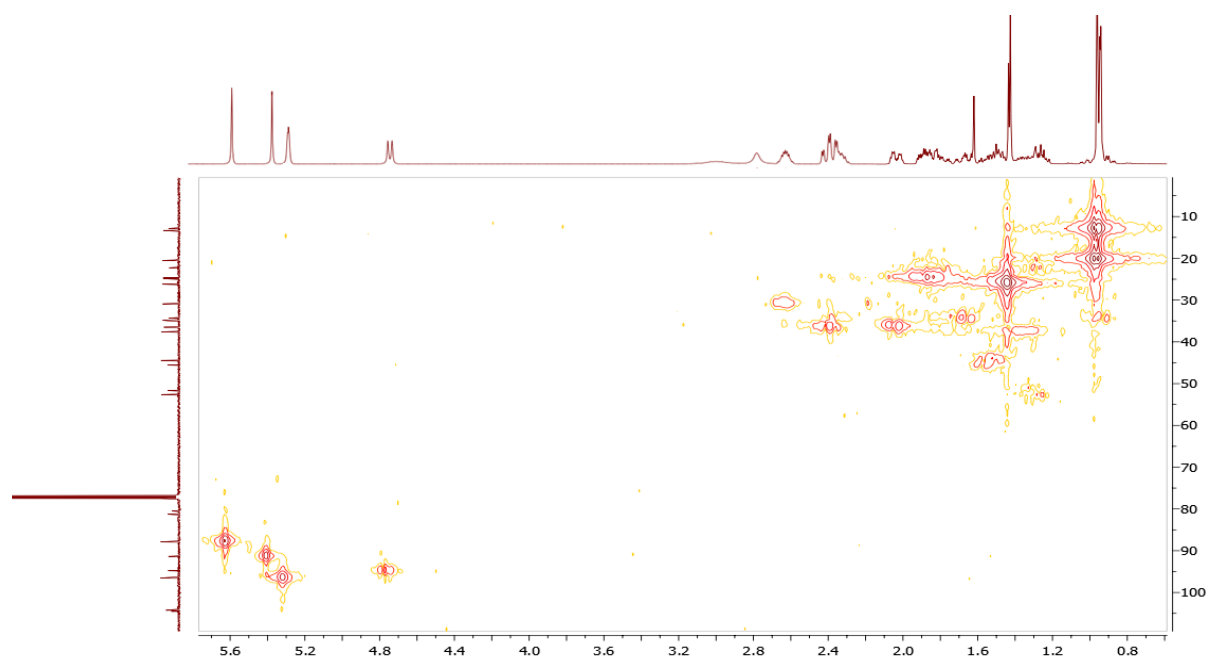


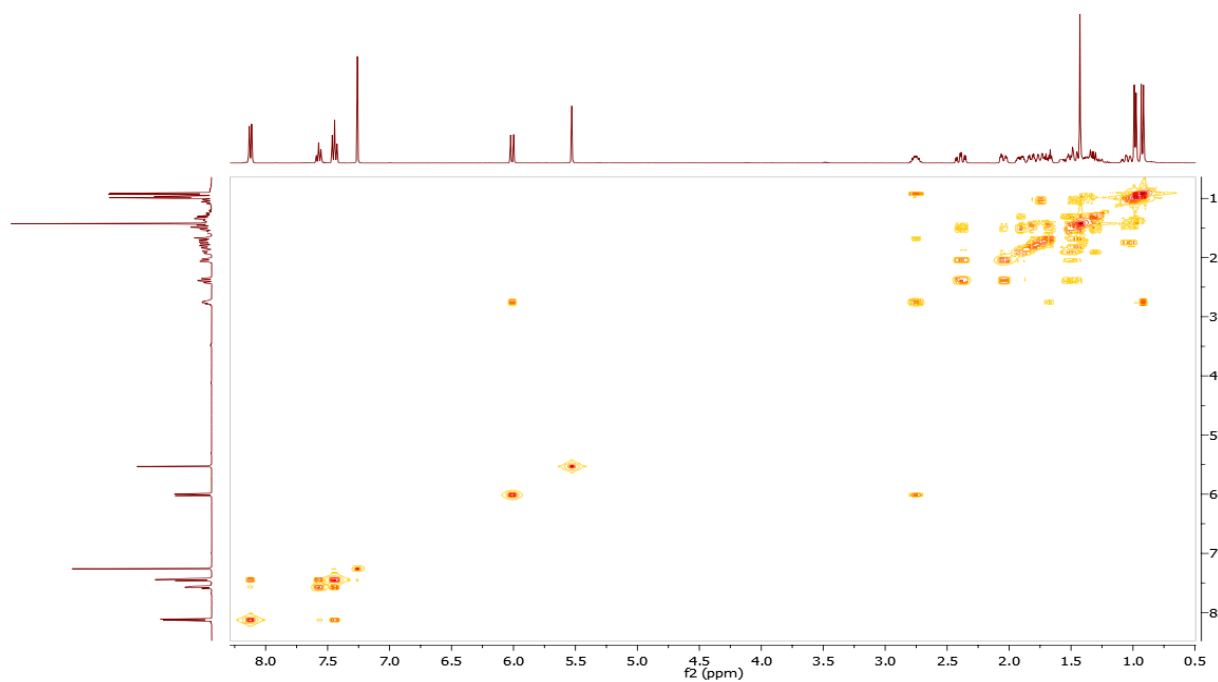
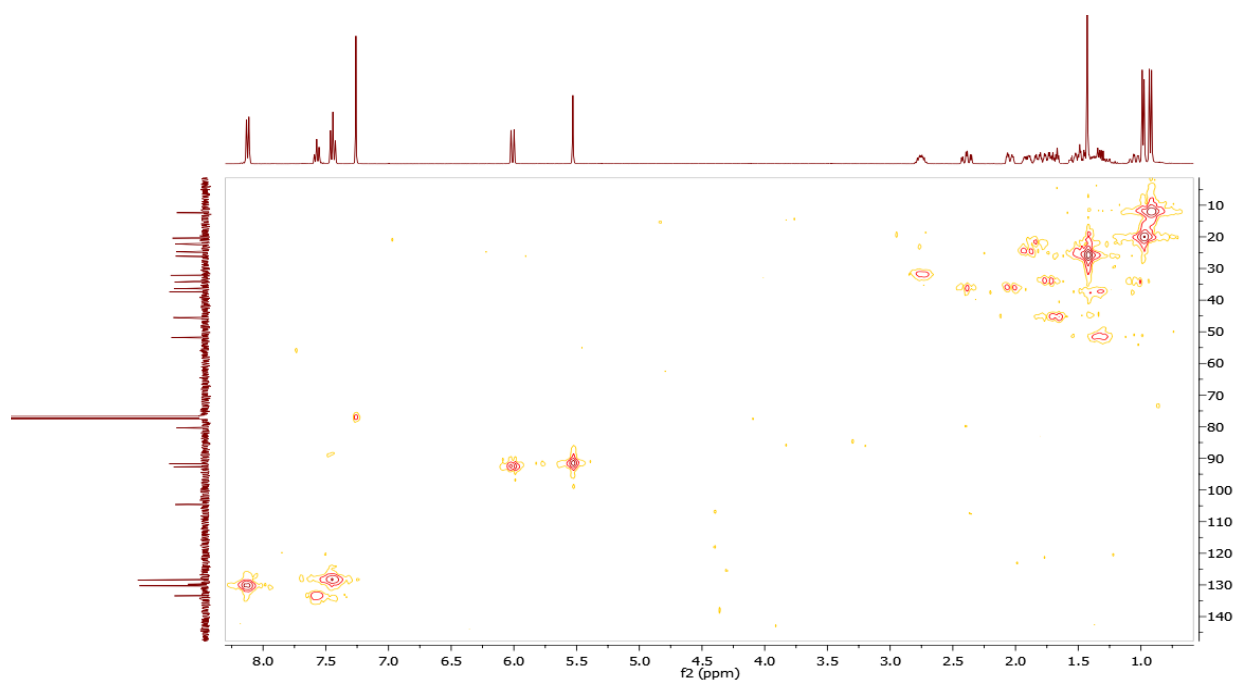
Espectro bidimensional de COSY da Artemisinina (1)



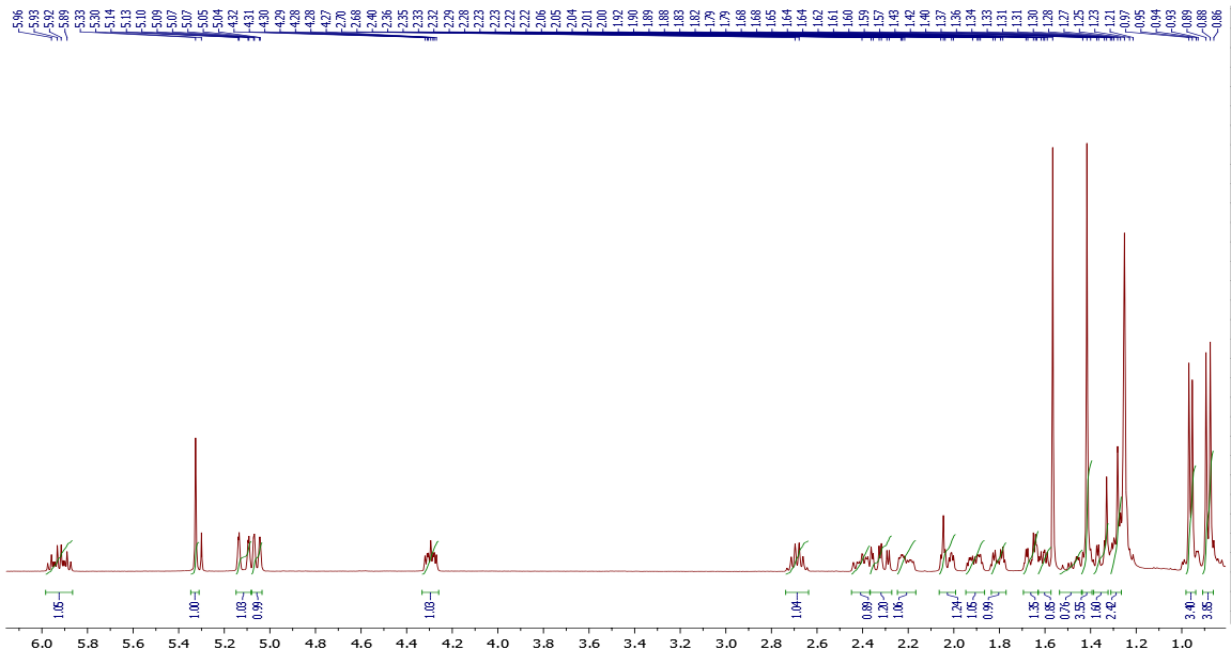
Espectro bidimensional HMQC da Artemisinina (1)



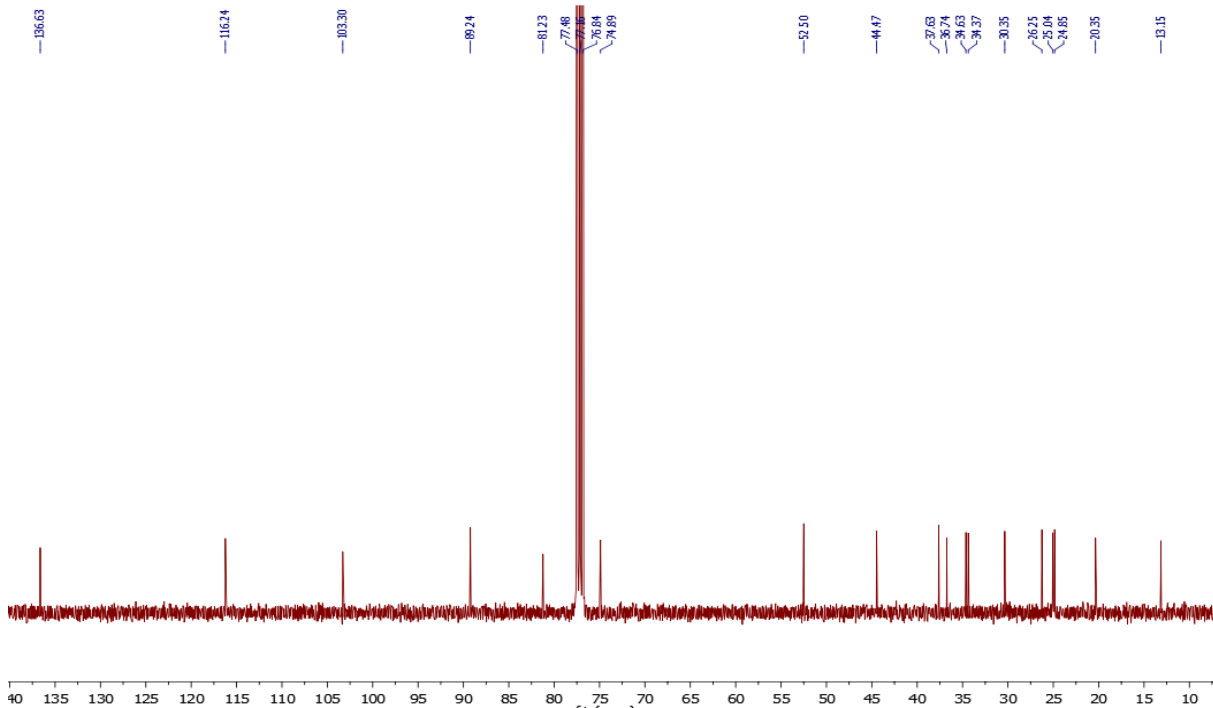
Espectro bidimensional COSY da Di-hidroartemisinina (2)**Espectro bidimensional HMQC da Di-hidroartemisinina (2)**

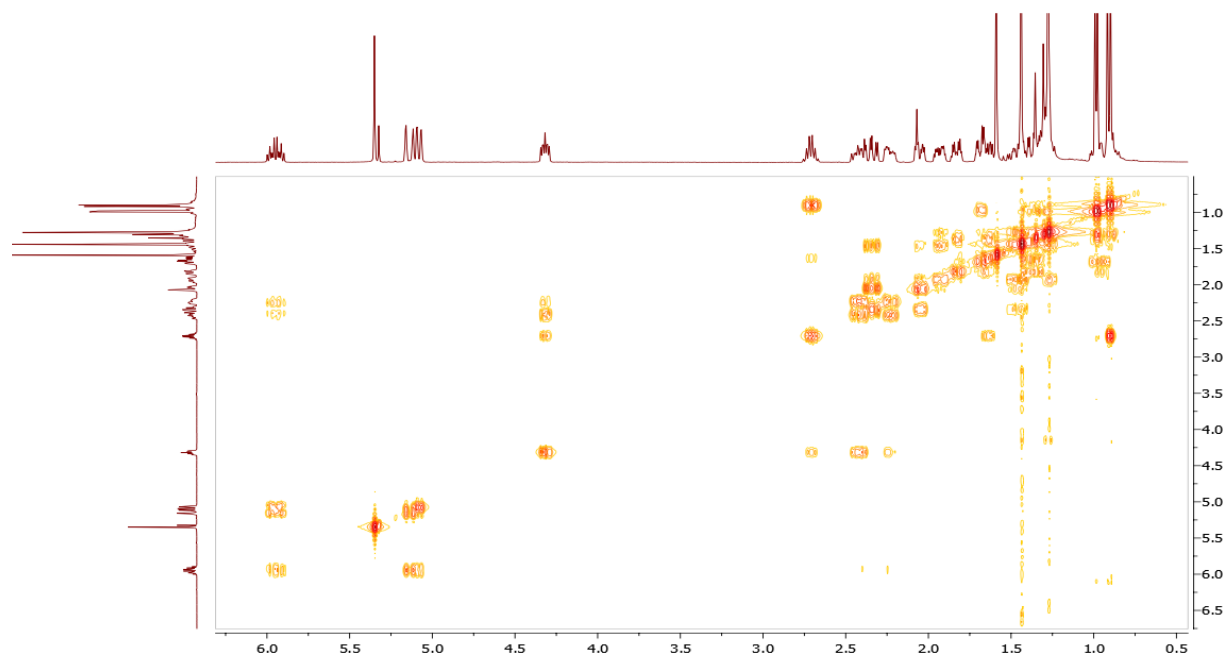
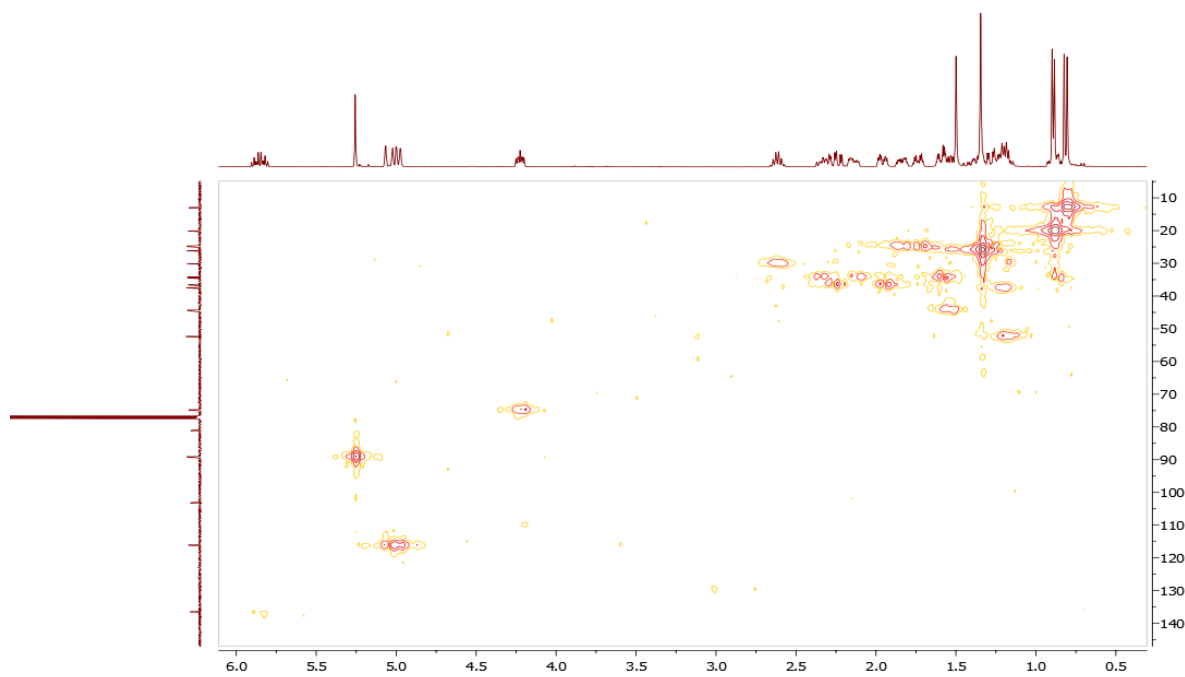
Espectro bidimensional COSY do derivado DHART 10 α -Benzoato (61)**Espectro bidimensional HMQC do derivado DHART 10 α -Benzoato (61)**

Espectro ¹H-RMN do derivado C-10β alildeoxoartemisinina (60)

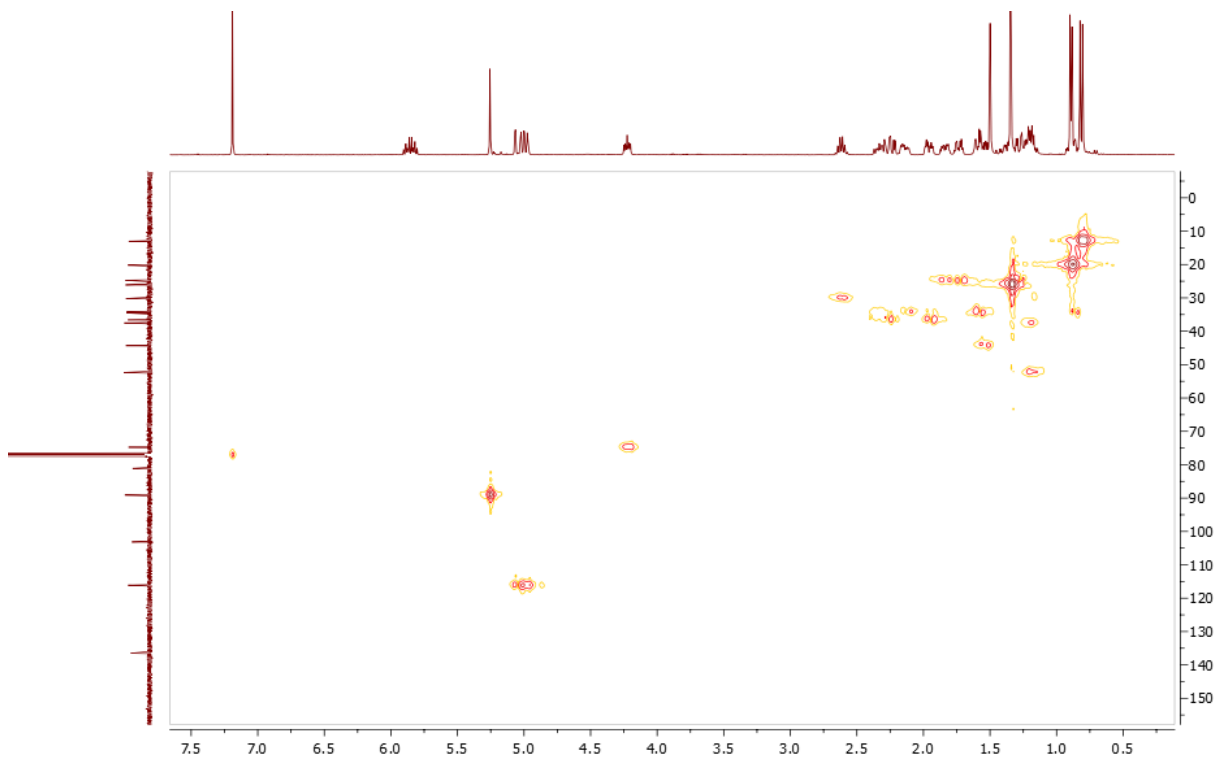


Espectro ¹³C-RMN do derivado C-10β alildeoxoartemisinina (60)

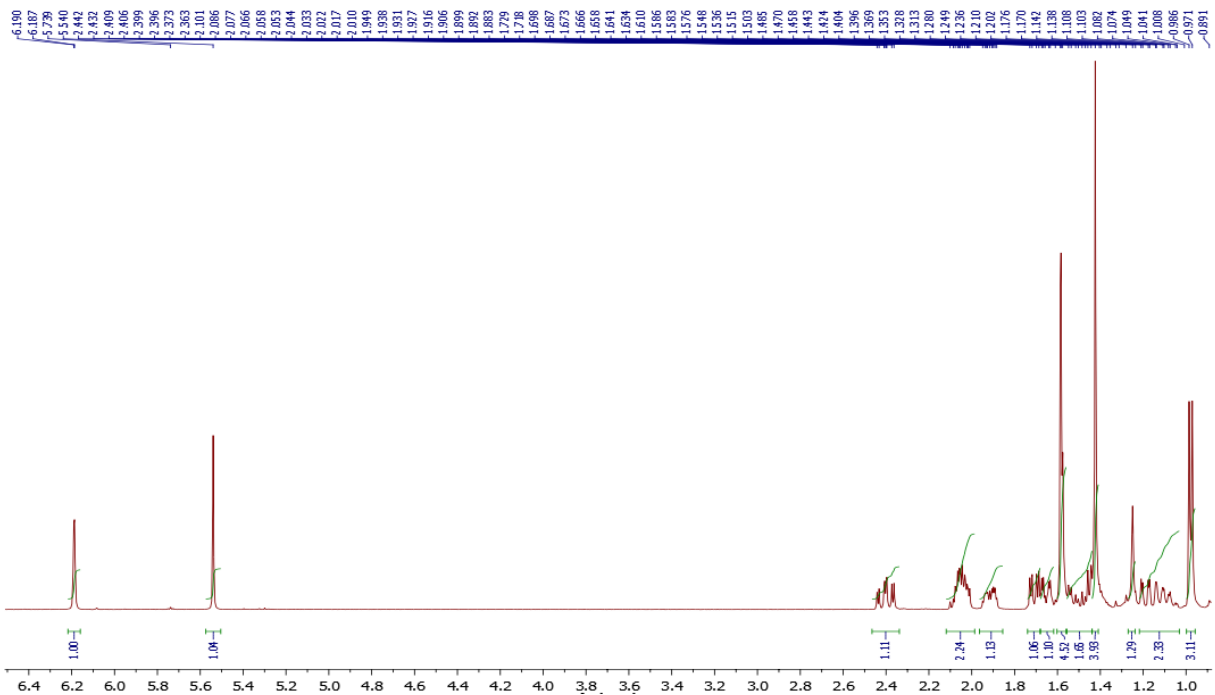


Espectro bidimensional COSY do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60)**Espectro bidimensional HMQC do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60)**

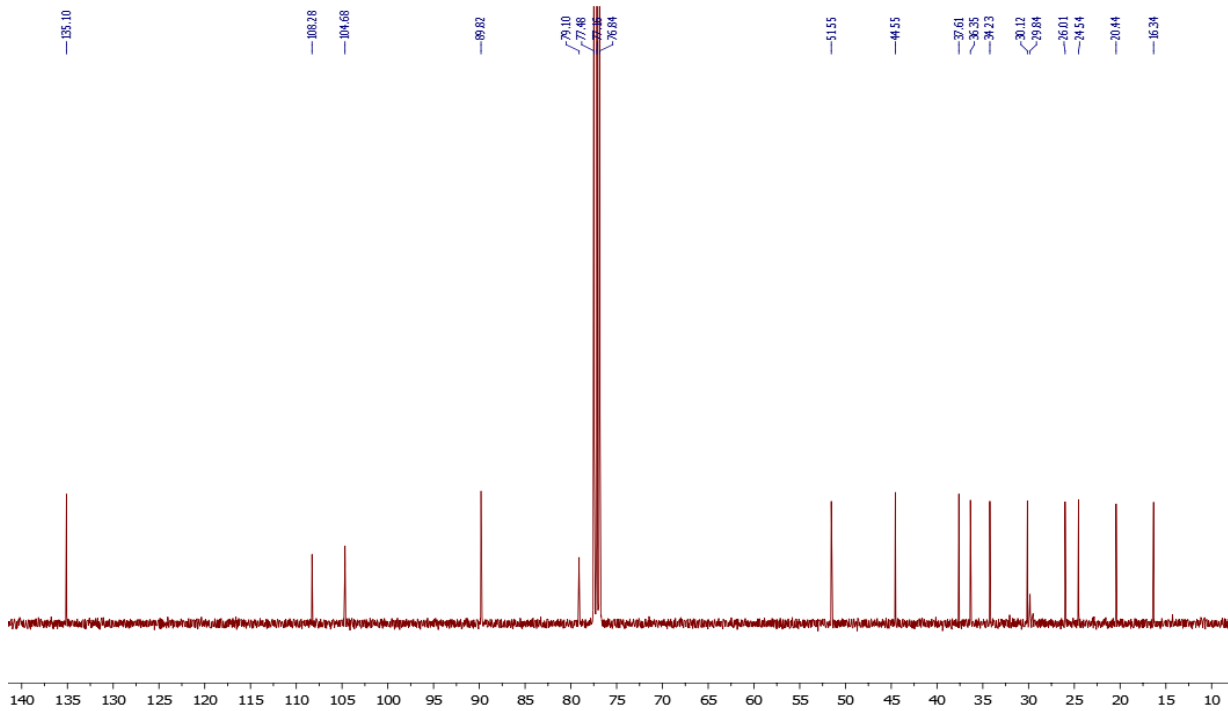
Espectro bidimensional HMBC do derivado C-10 β alildeoxoartemisinina (60)



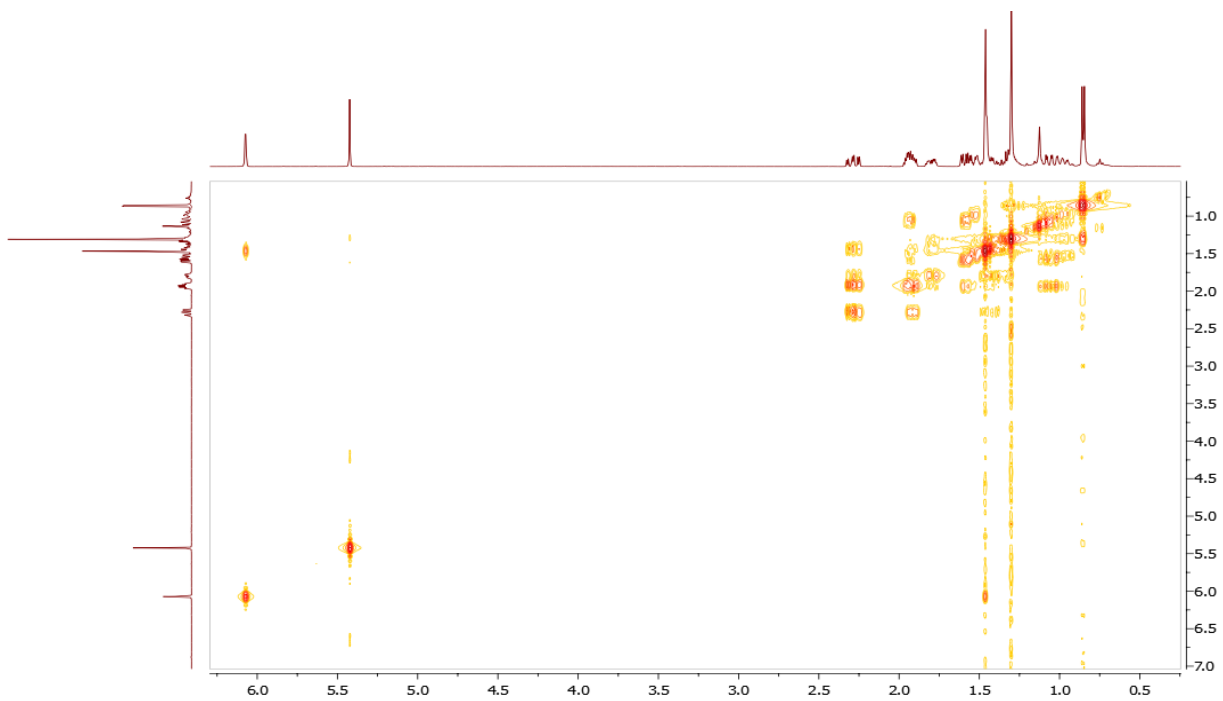
Espectro ¹H-RMN do produto secundário AHA (64)



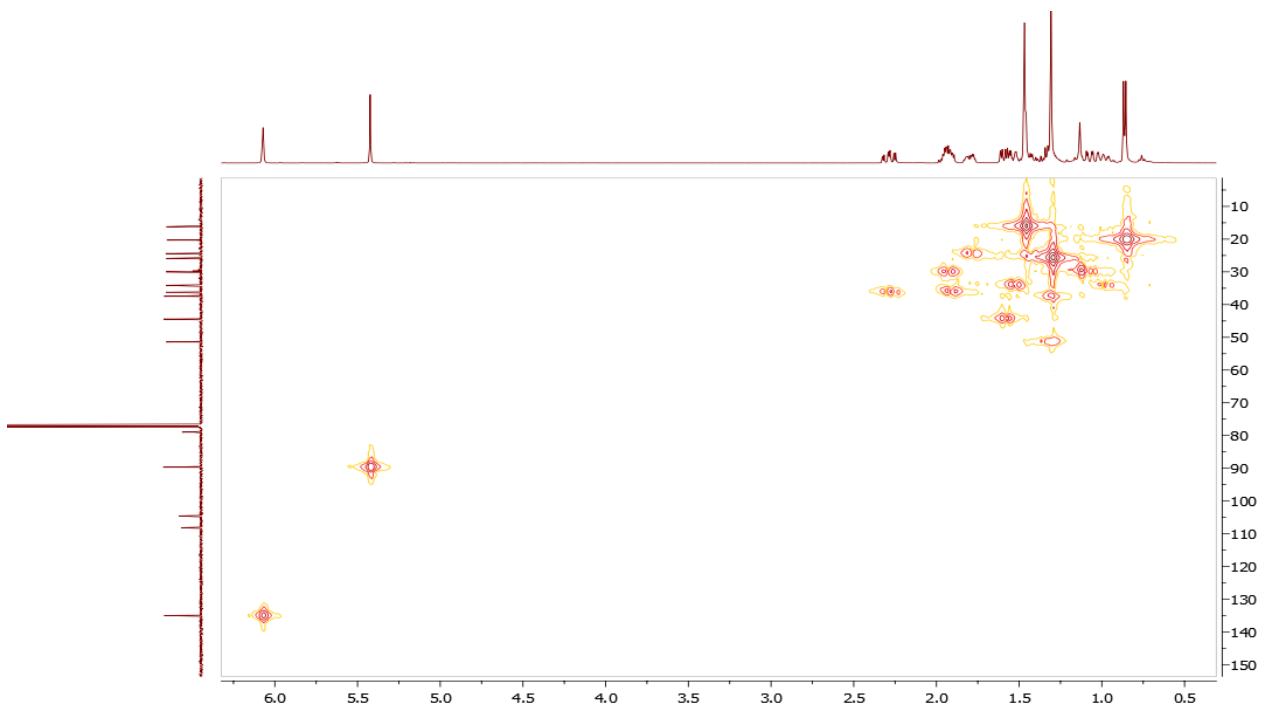
Espectro ^{13}C -RMN do produto secundário AHA (64)



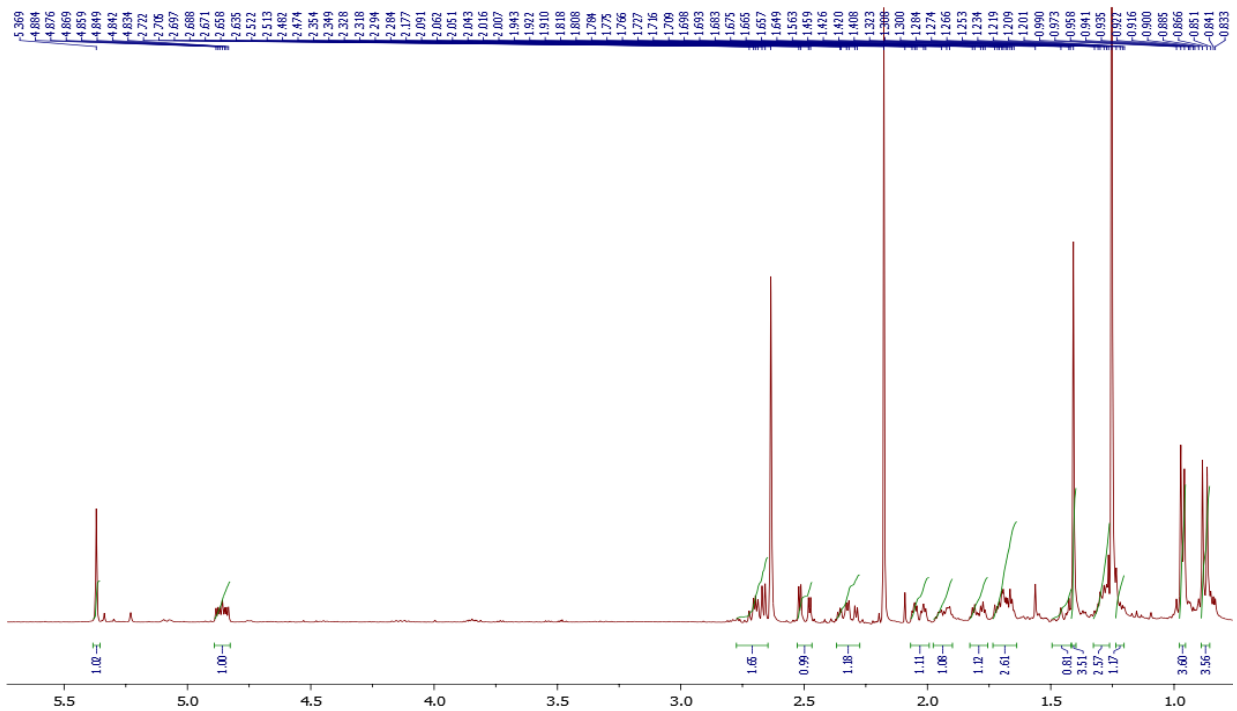
Espectro bidimensional COSY do produto secundário AHA (64)



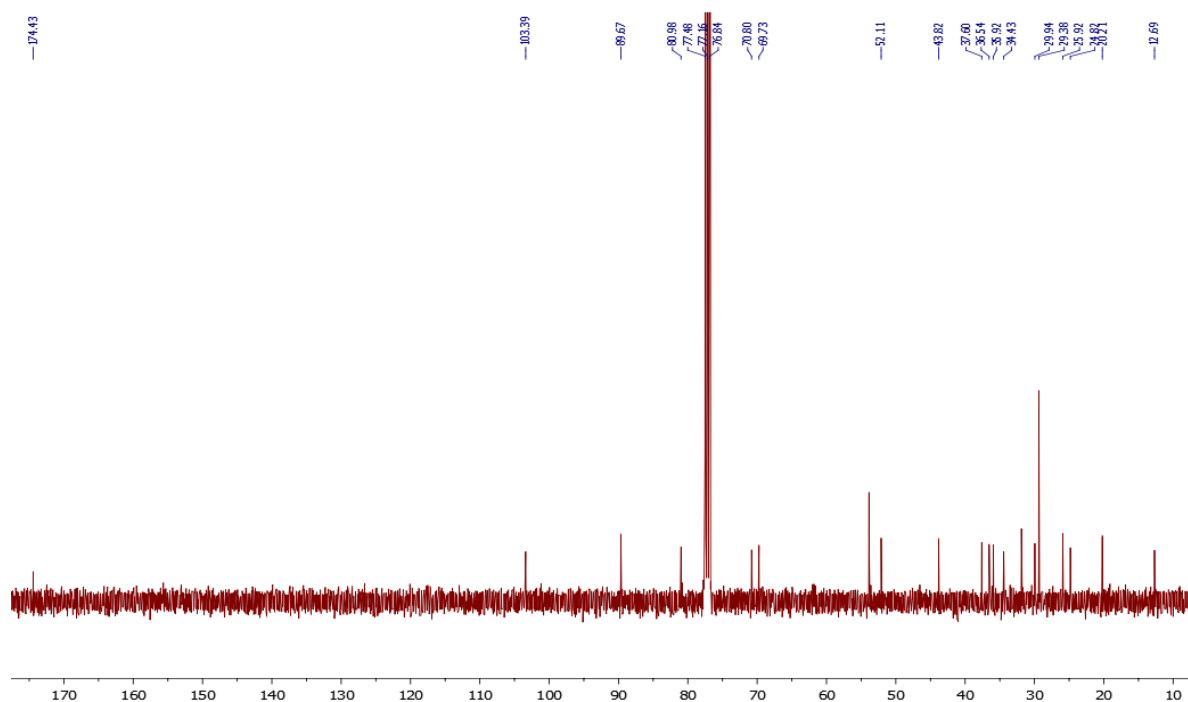
Espectro bidimensional HMQC do produto secundário AHA (64)



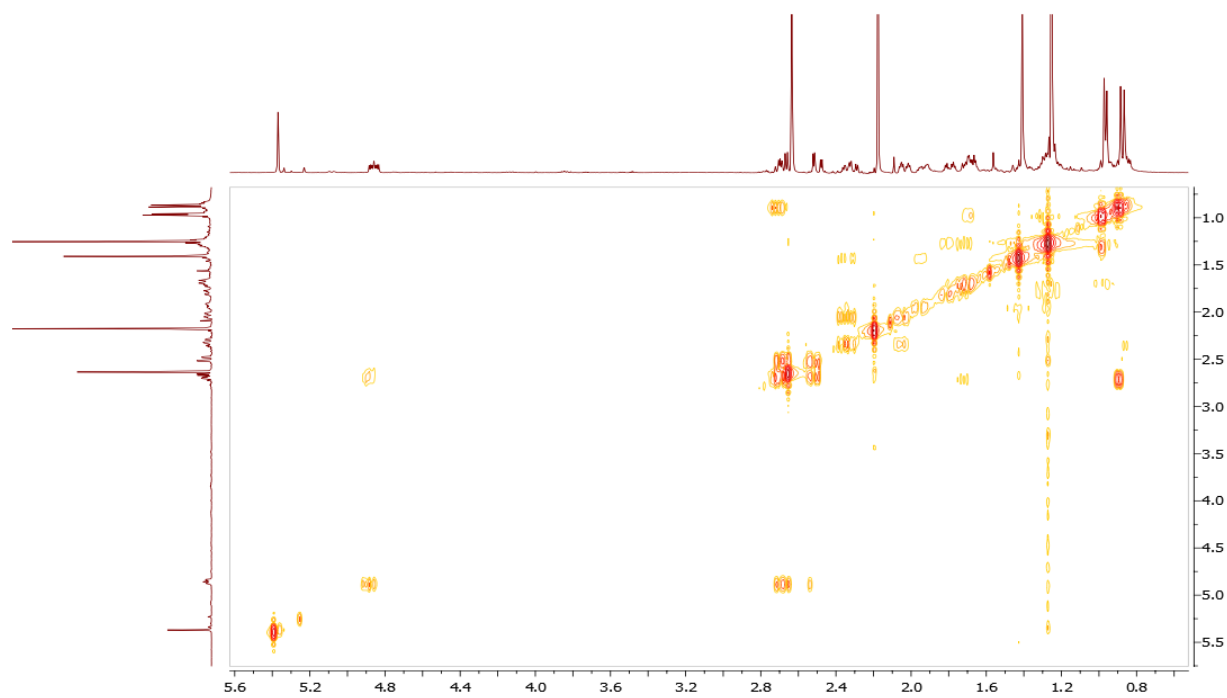
Espectro de ¹H-RMN do derivado ácido carboxílico (62)



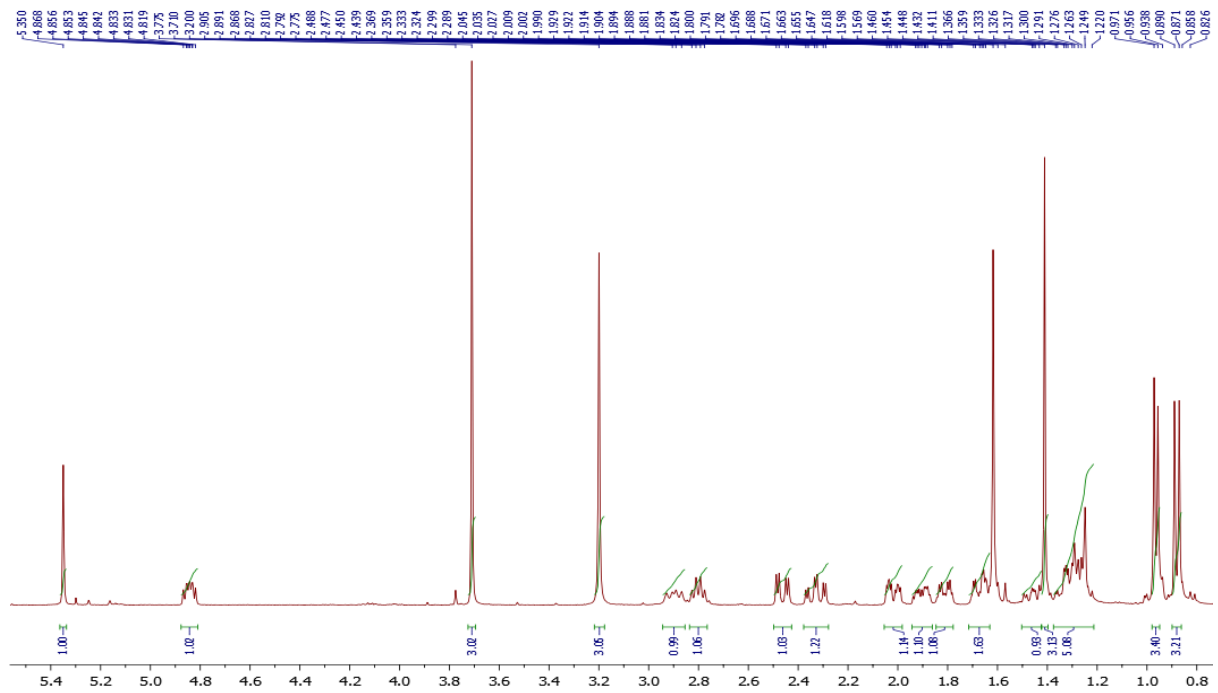
Espectro de ^{13}C -RMN do derivado ácido carboxílico (62)



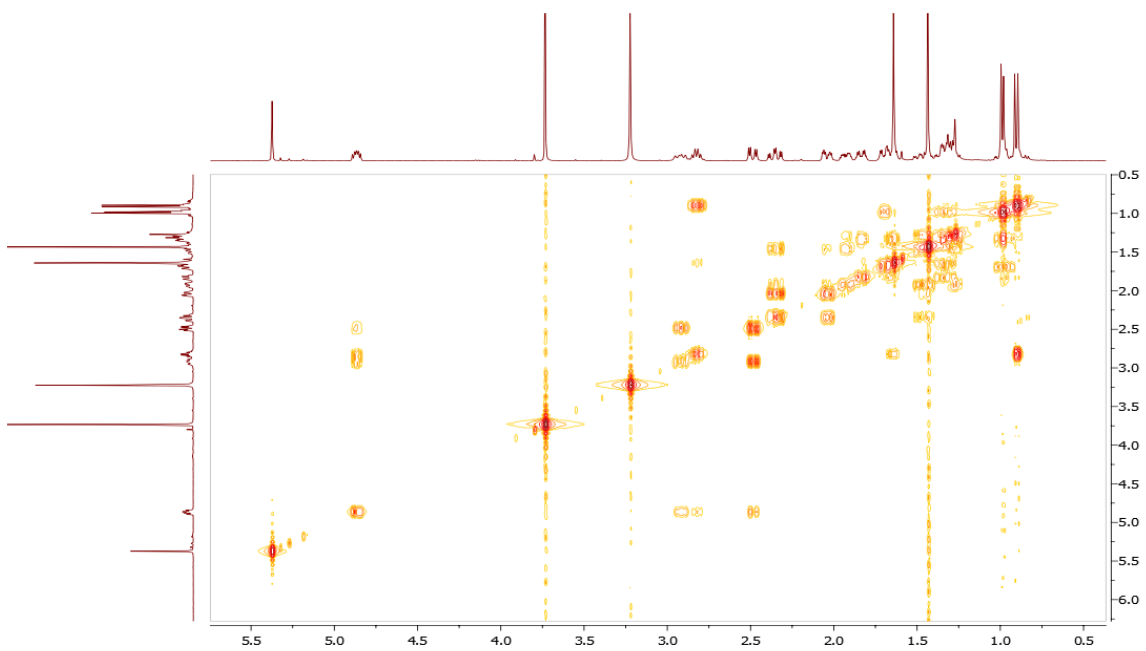
Espectro bidimensional COSY do derivado ácido carboxílico (62)



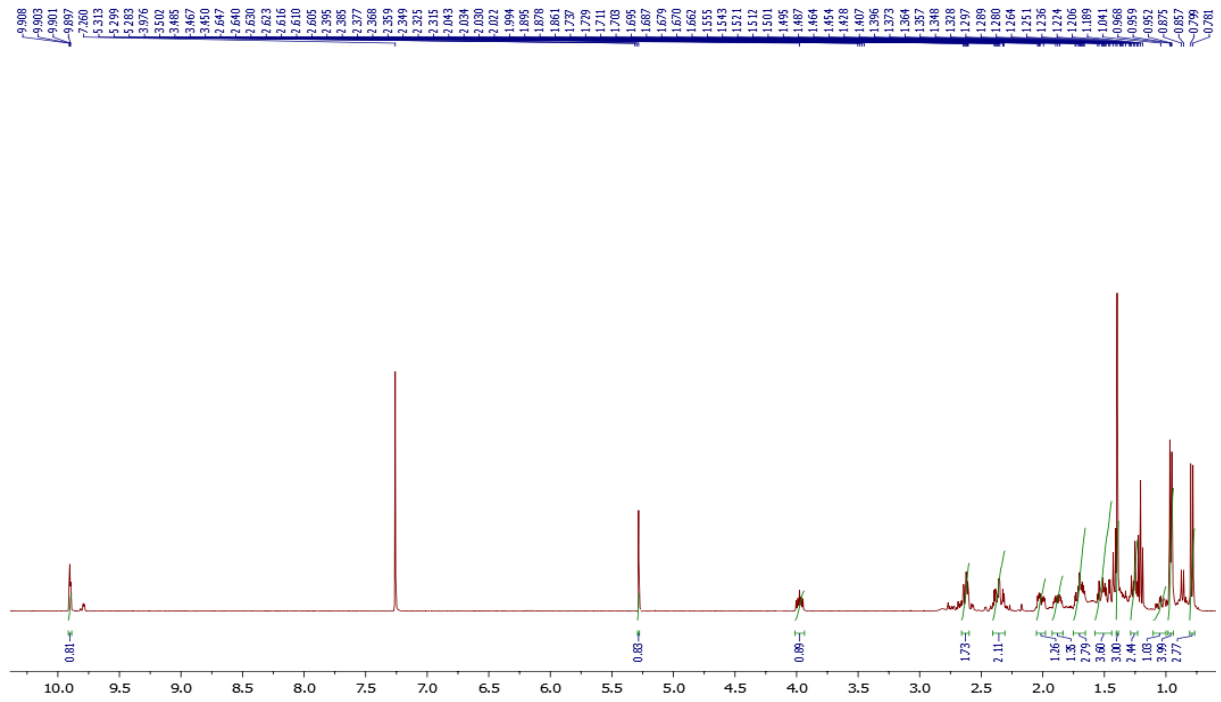
Espectro de ^1H -RMN do derivado hidroxamato (63, amida de Weinreb)



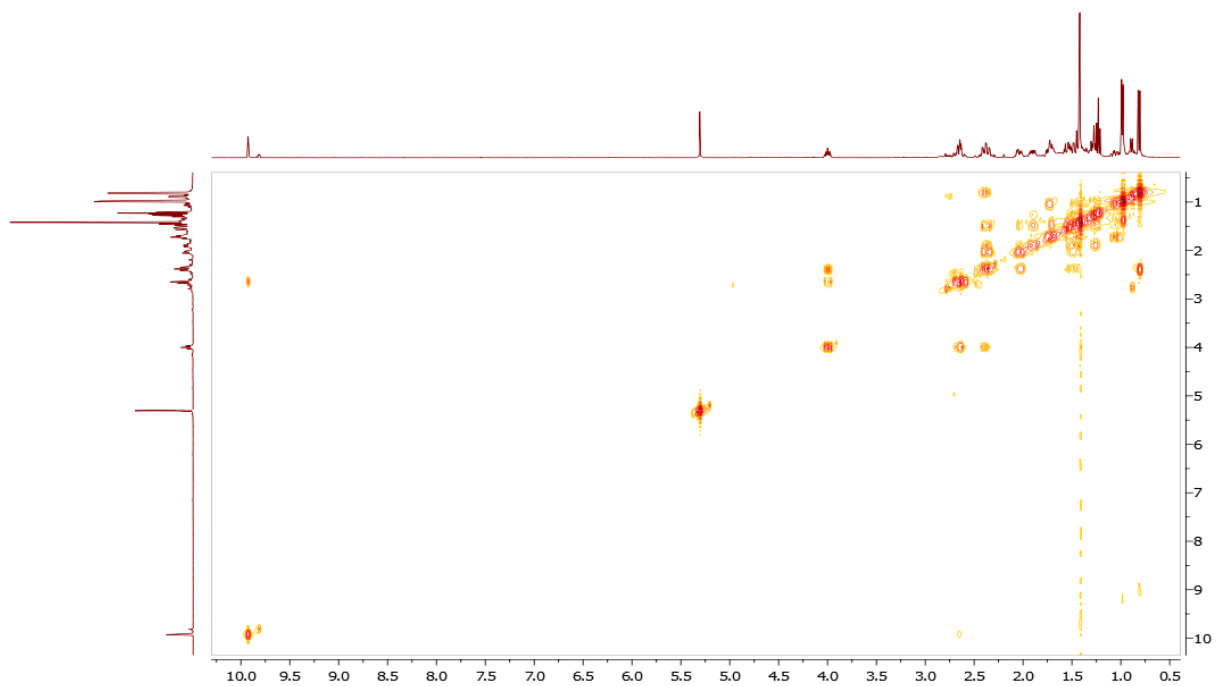
Espectro bidimensional COSY do derivado hidroxamato (63, amida de Weinreb)



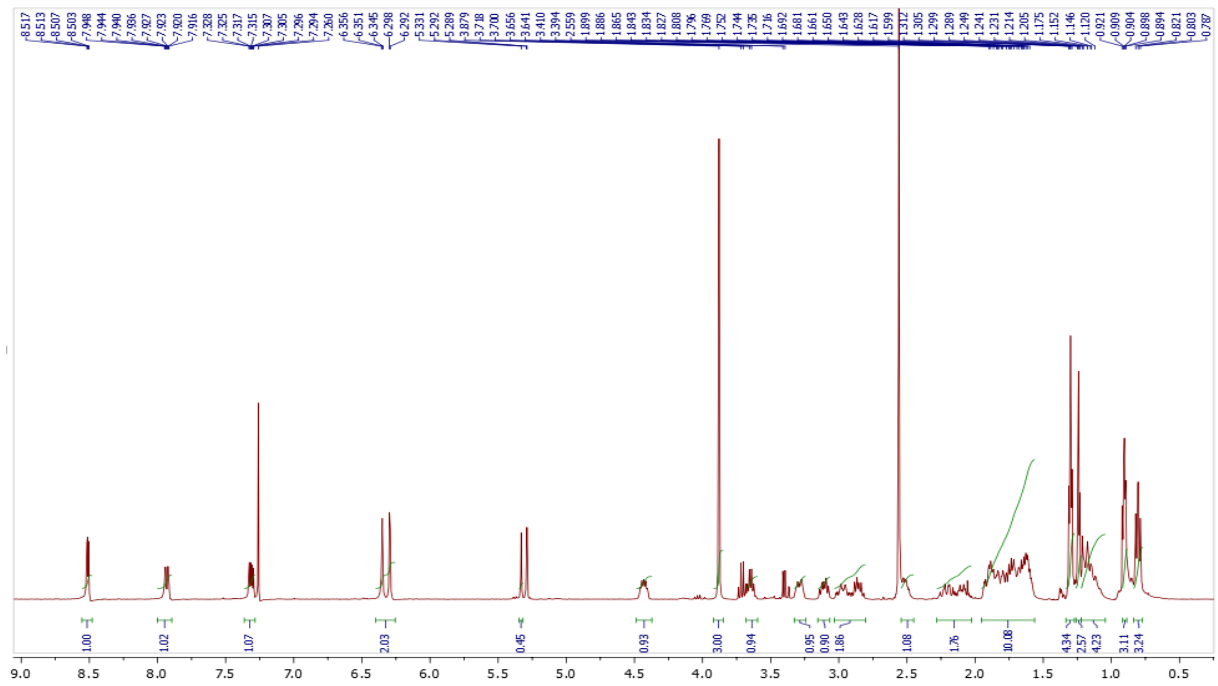
Espectro de ¹H-RMN do derivado aldeído (59)

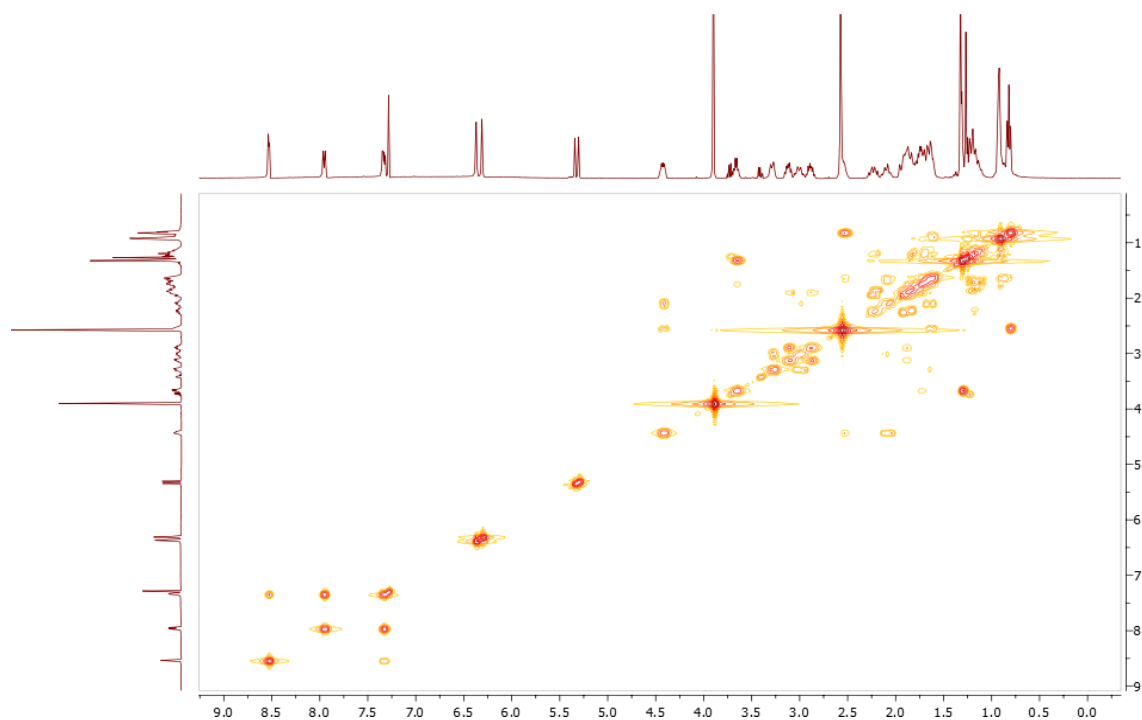
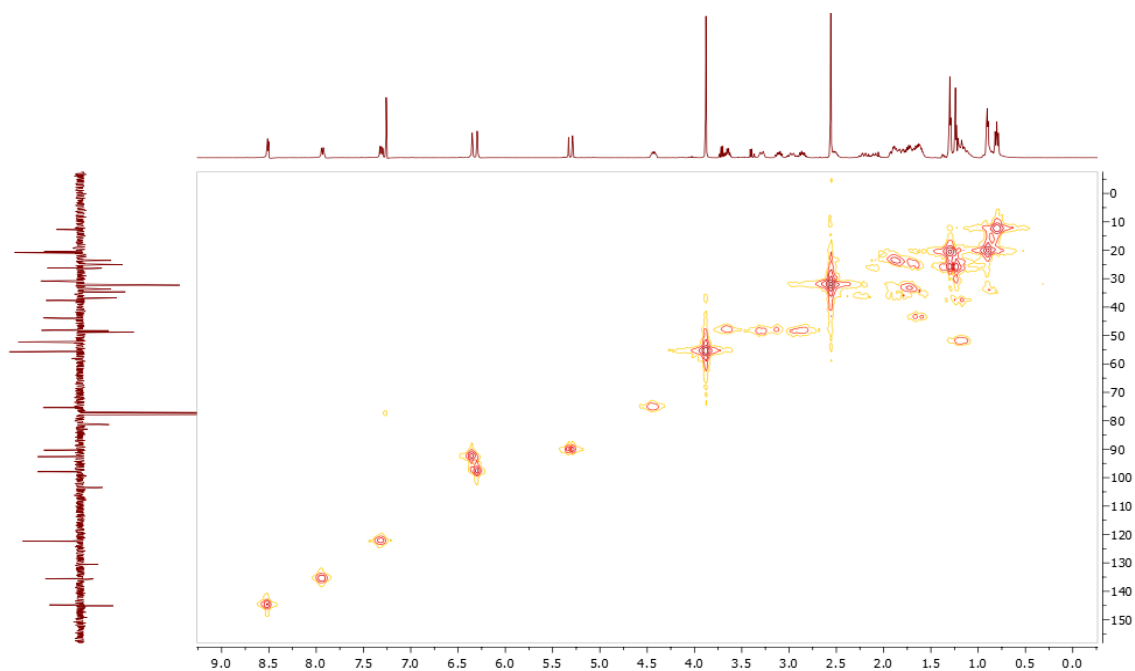


Espectro bidimensional COSY do derivado aldeído (59)

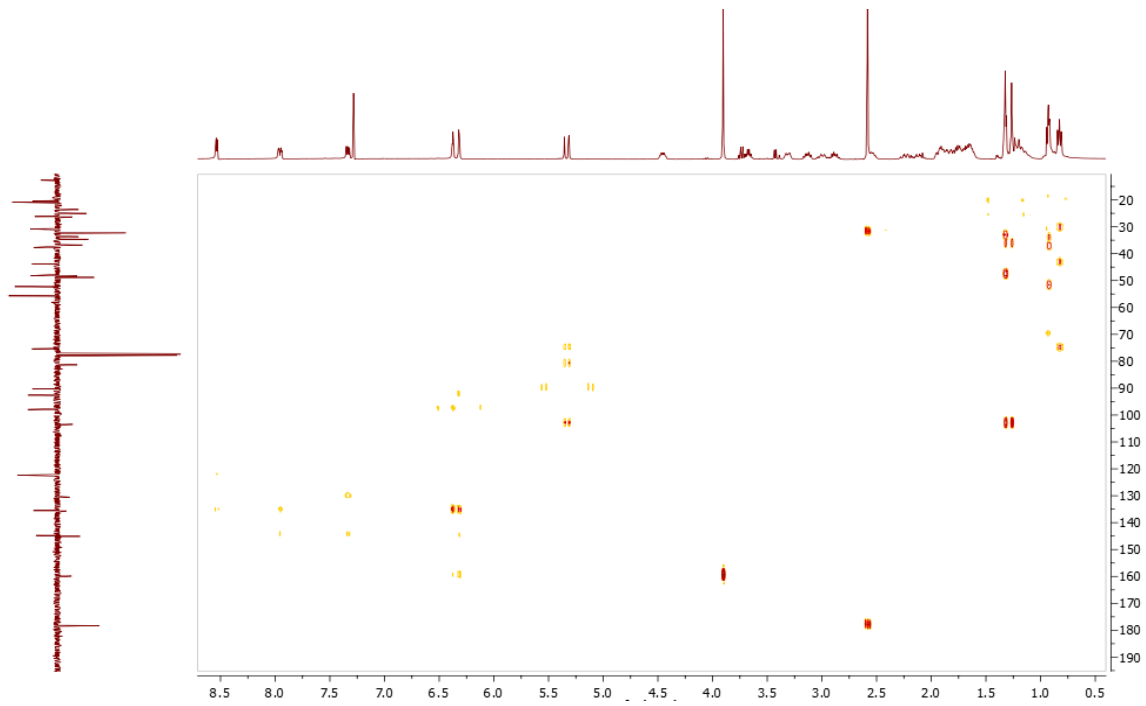


Espectro de ¹H-RMN do composto híbrido ART-PQ (58)

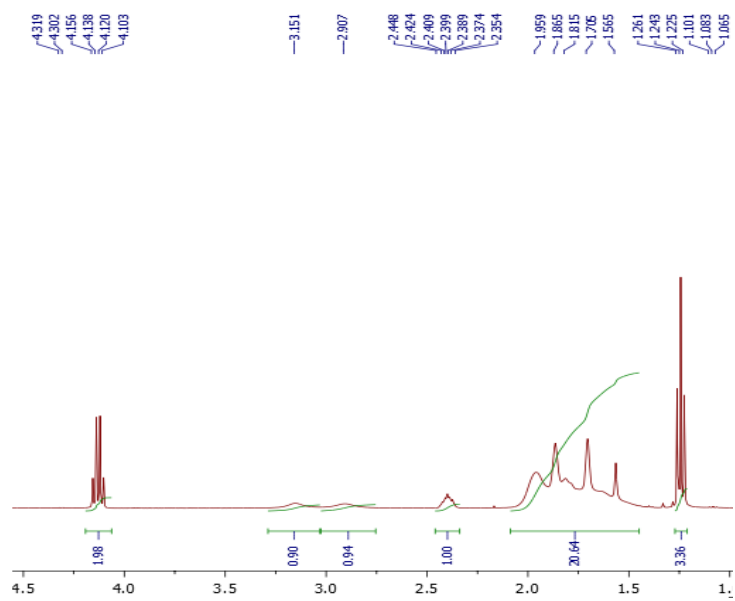


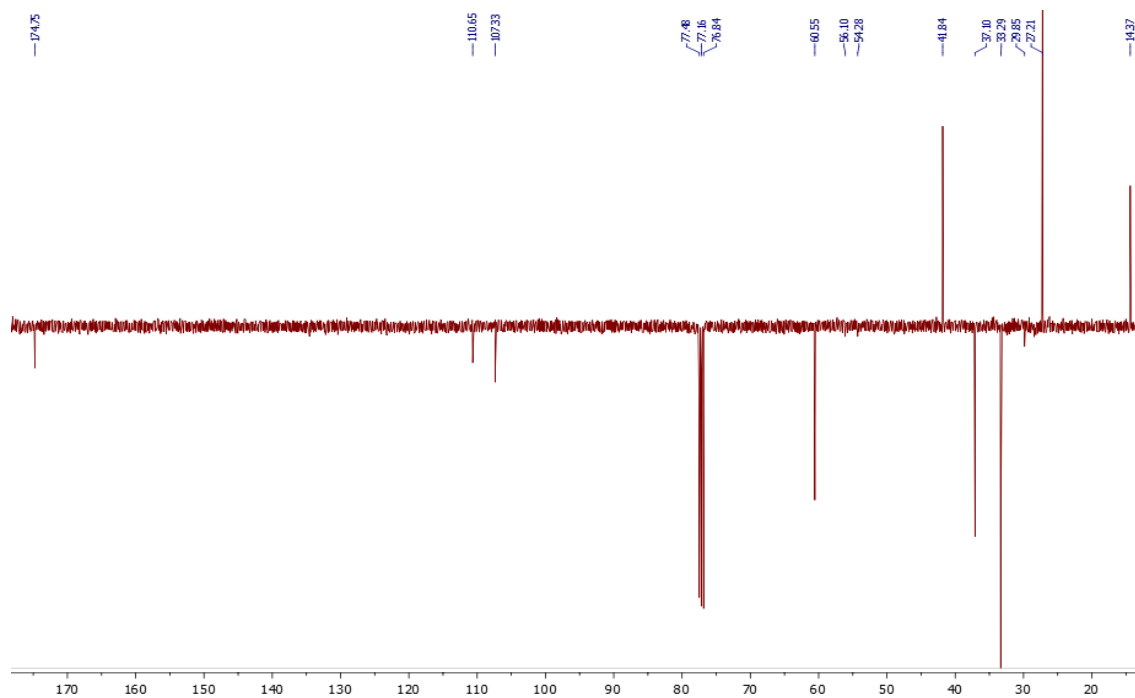
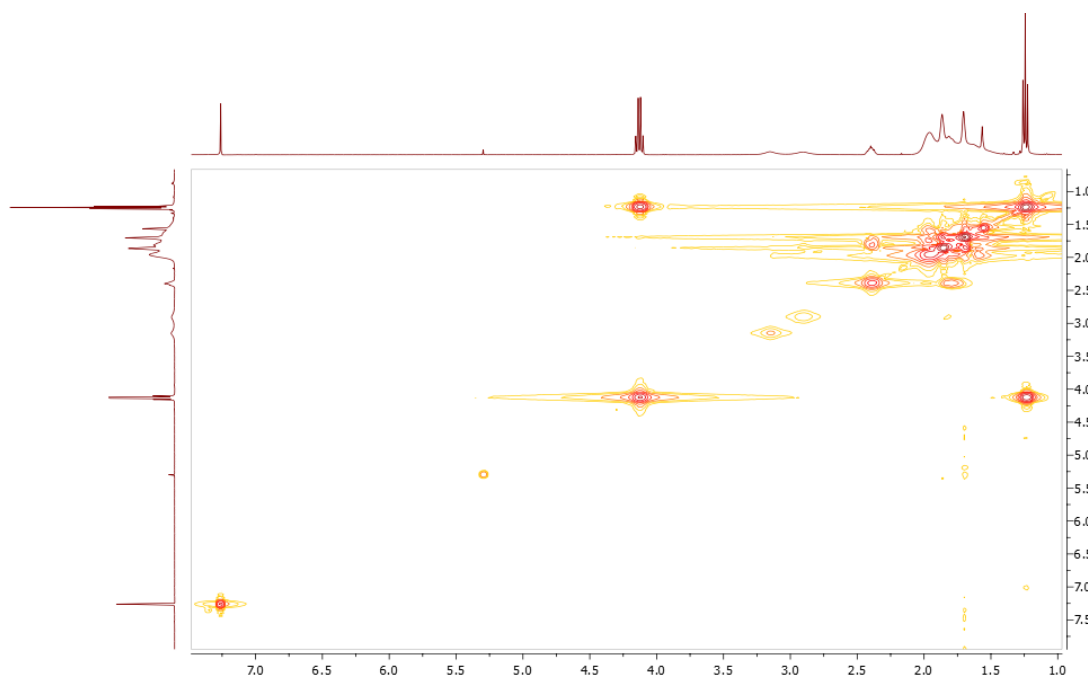
Espectro bidimensional COSY do composto híbrido ART-PQ (58)**Espectro bidimensional HMQC do composto híbrido ART-PQ (58)**

Espectro bidimensional HMBC do composto híbrido ART-PQ (58)

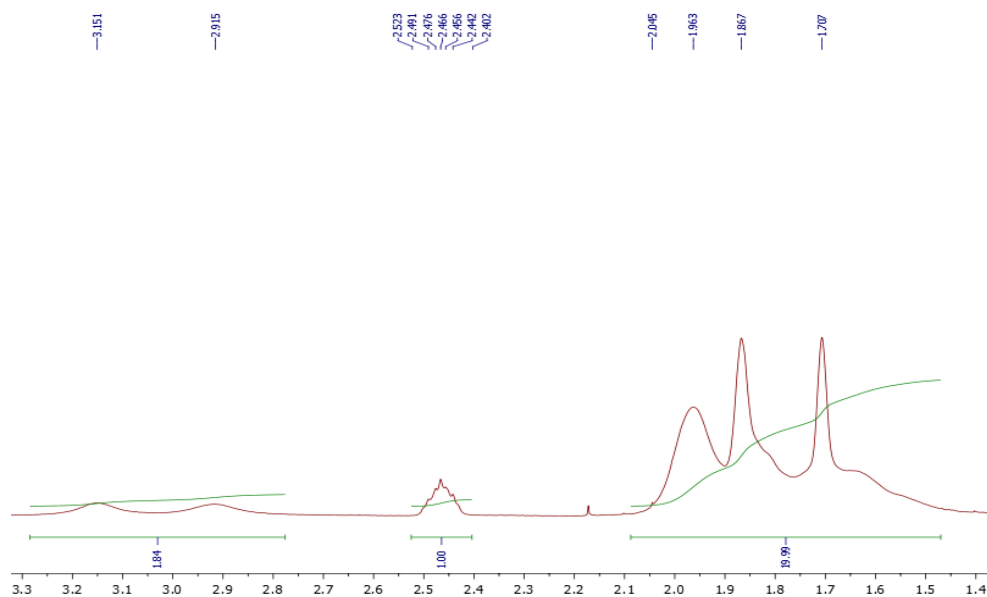


Espectro de ¹H-RMN do derivado ester tetraoxano (72)

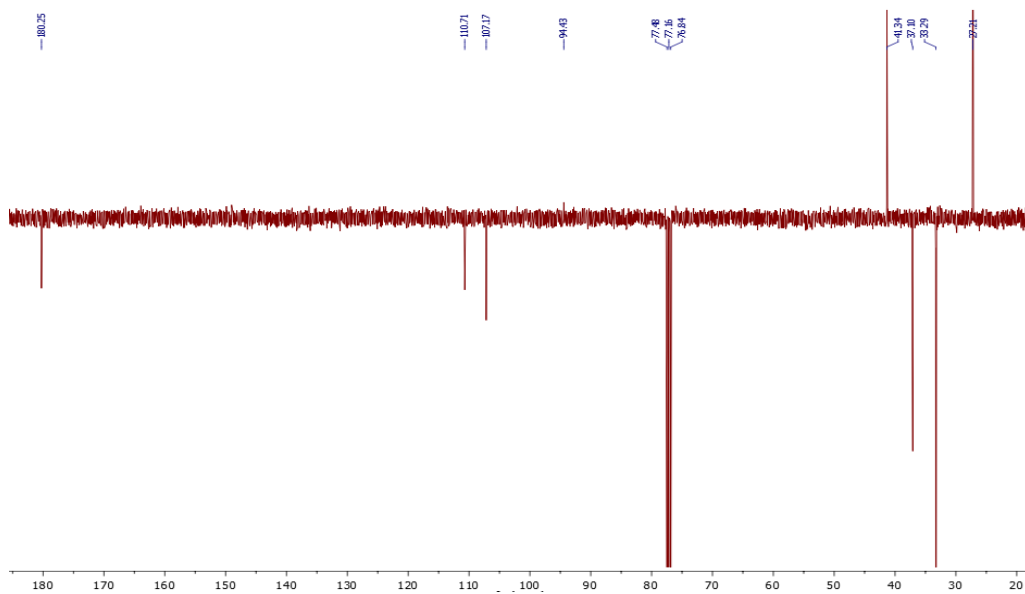


Espectro de ^{13}C -RMN do derivado ester tetraoxano (72)**Espectro bidimensional COSY do derivado ester tetraoxano (72)**

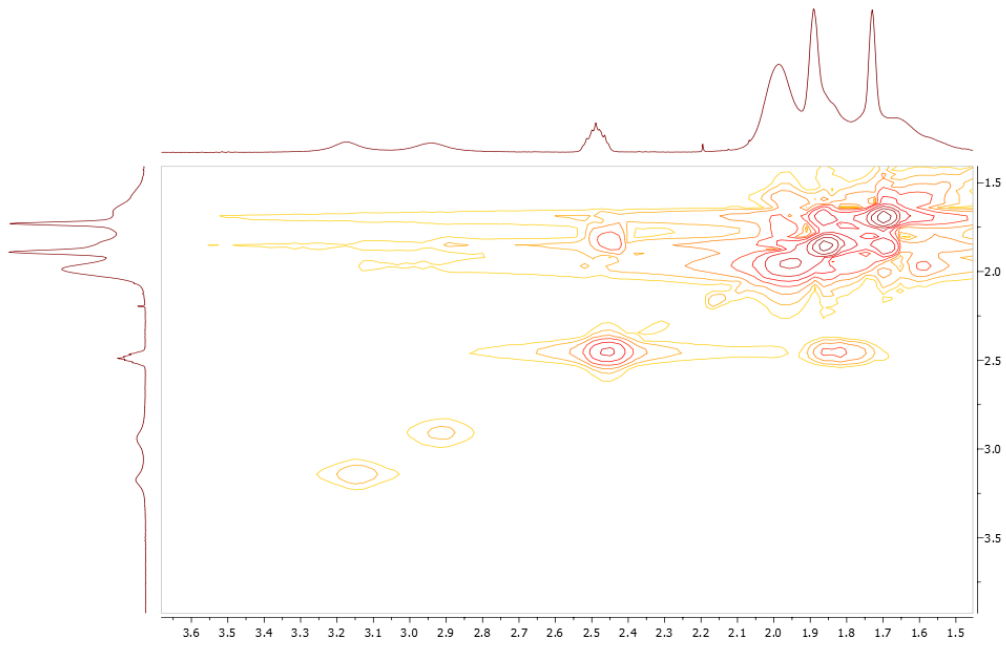
Espectro de ¹H-RMN do derivado ácido tetraoxano (67)



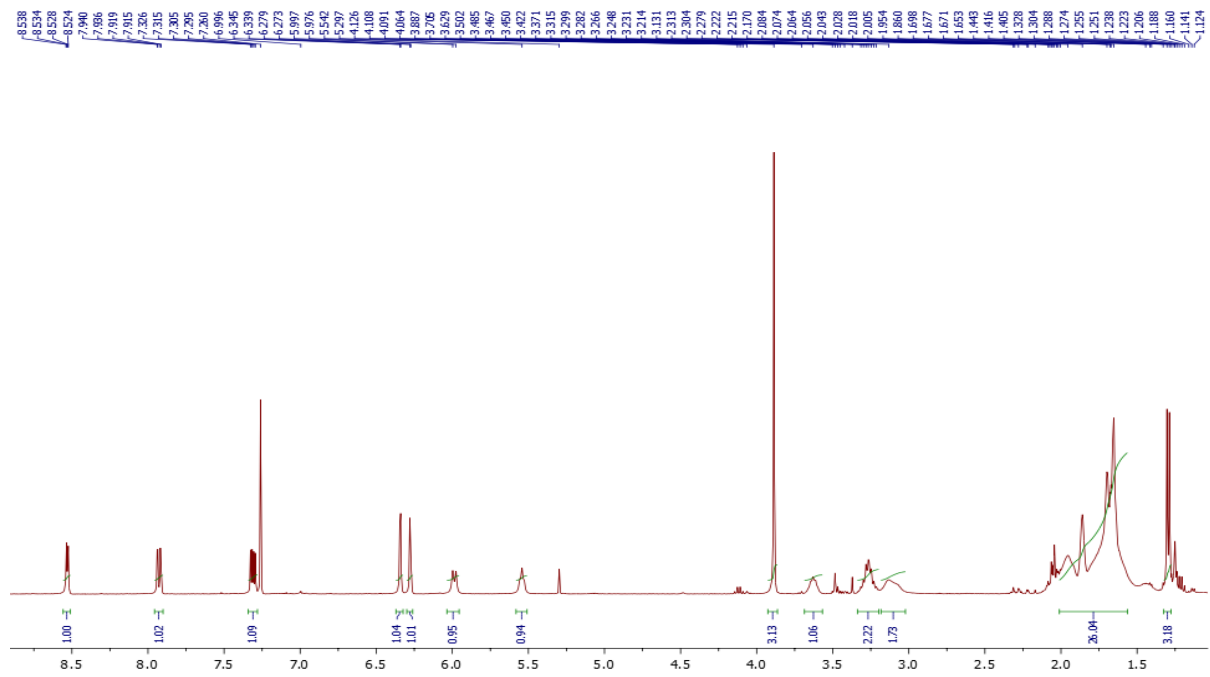
Espectro de ¹³C-RMN do derivado ácido tetraoxano (67)



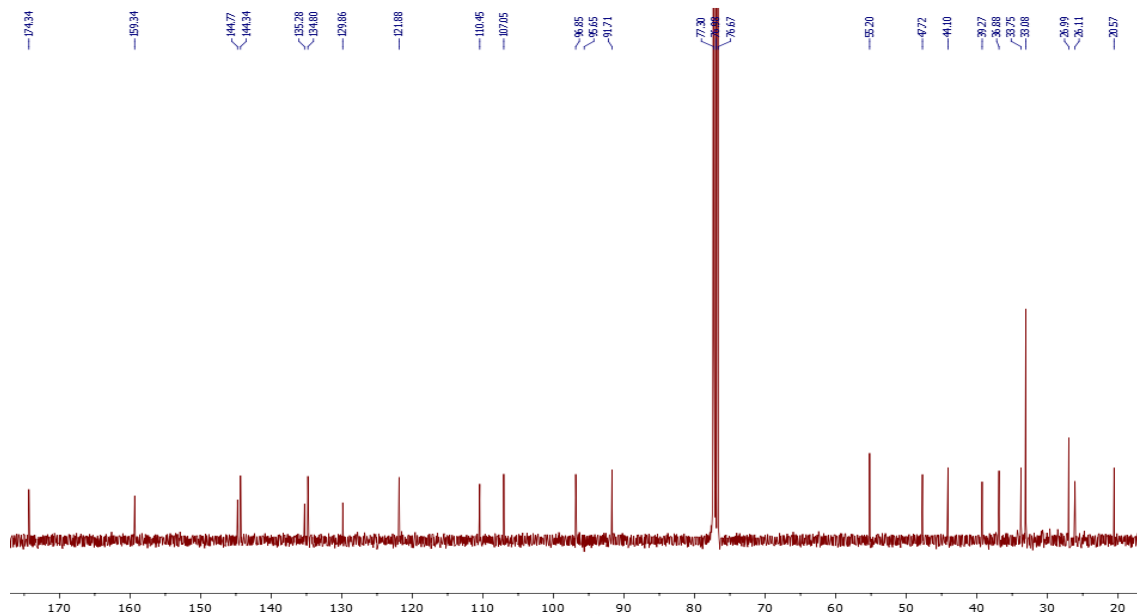
Espectro bidimensional COSY do derivado ácido tetraoxano (67)



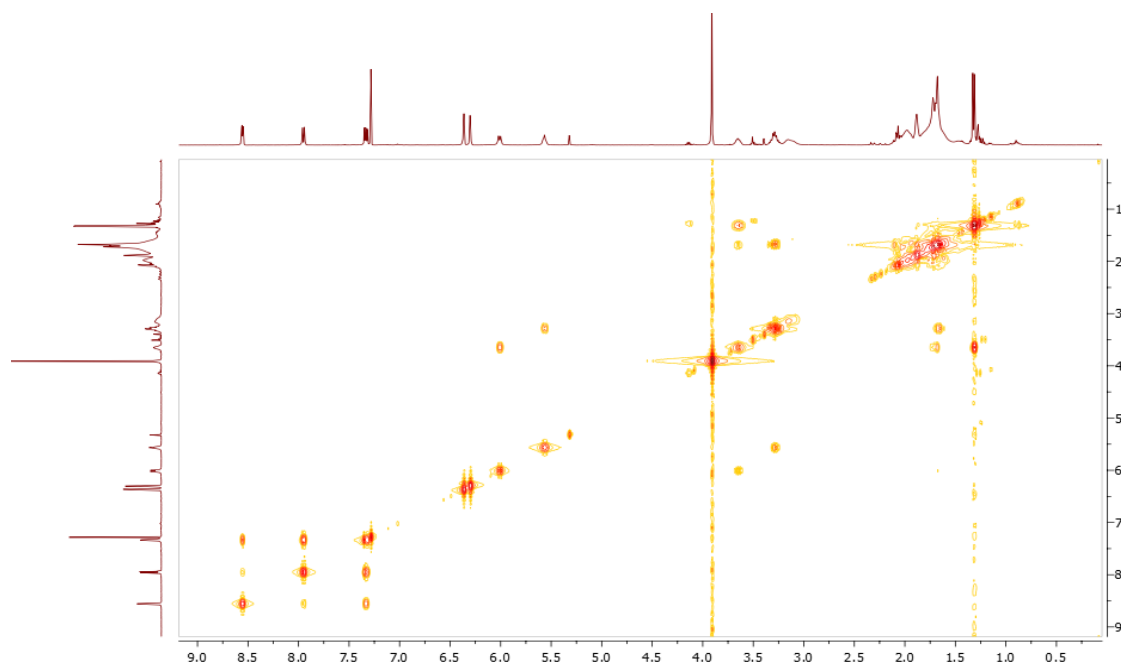
Espectro de ¹H-RMN do composto híbrido 66



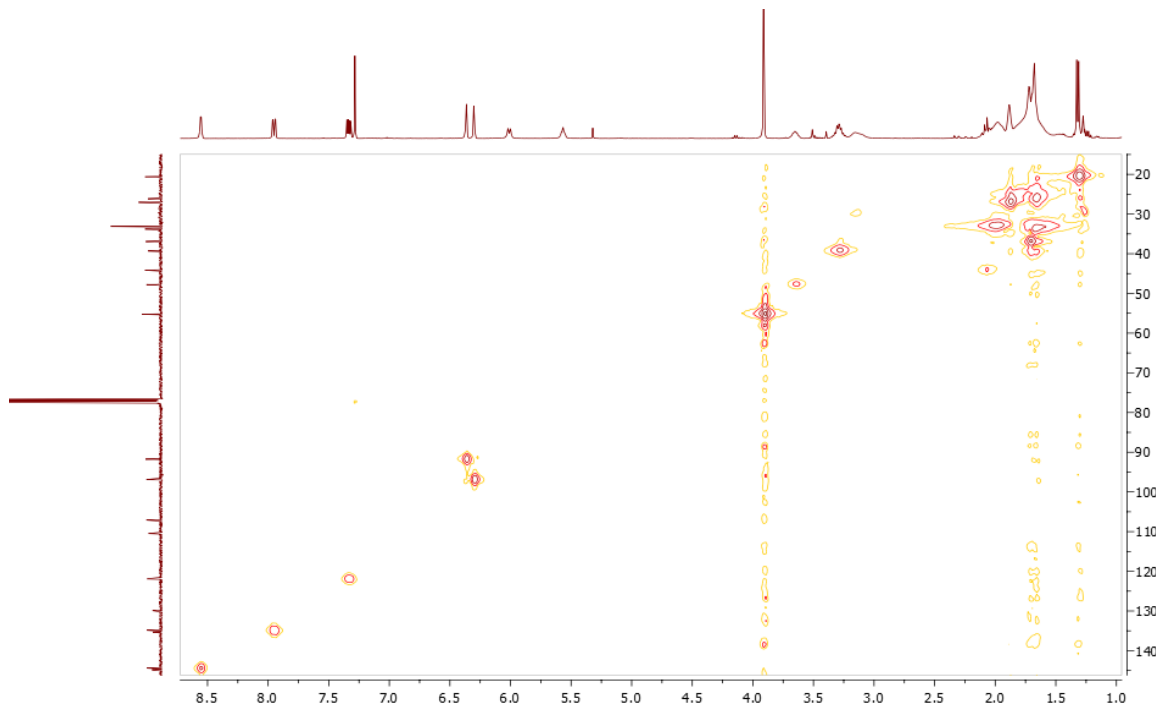
Espectro de ^{13}C -RMN do composto híbrido 66



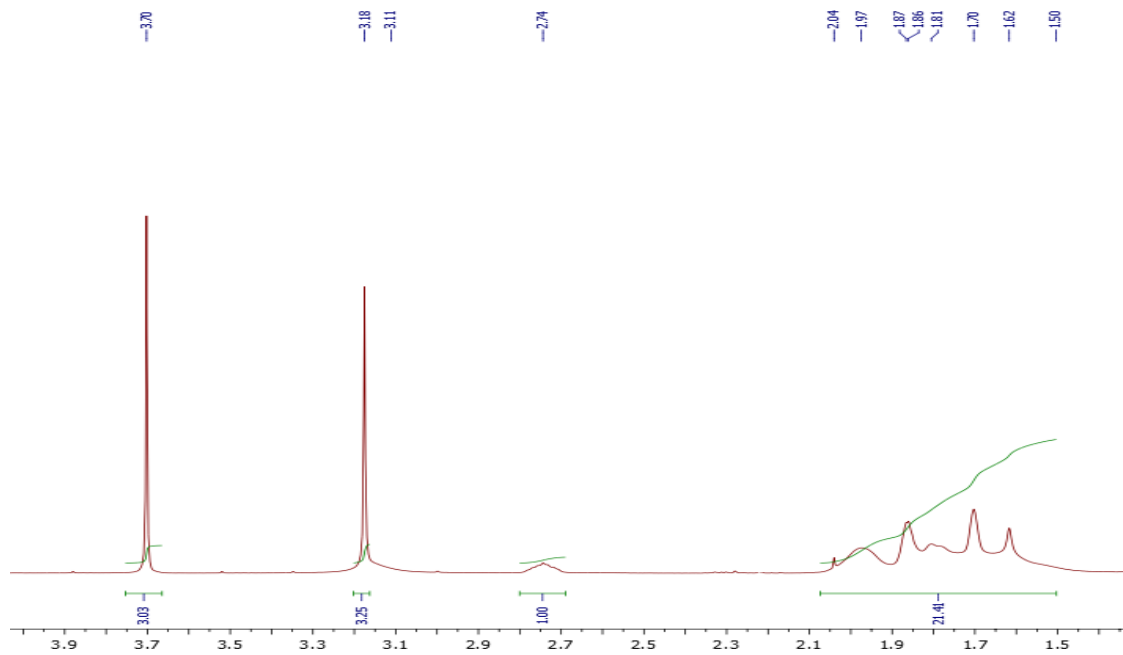
Espectro bidimensional COSY do composto híbrido 66



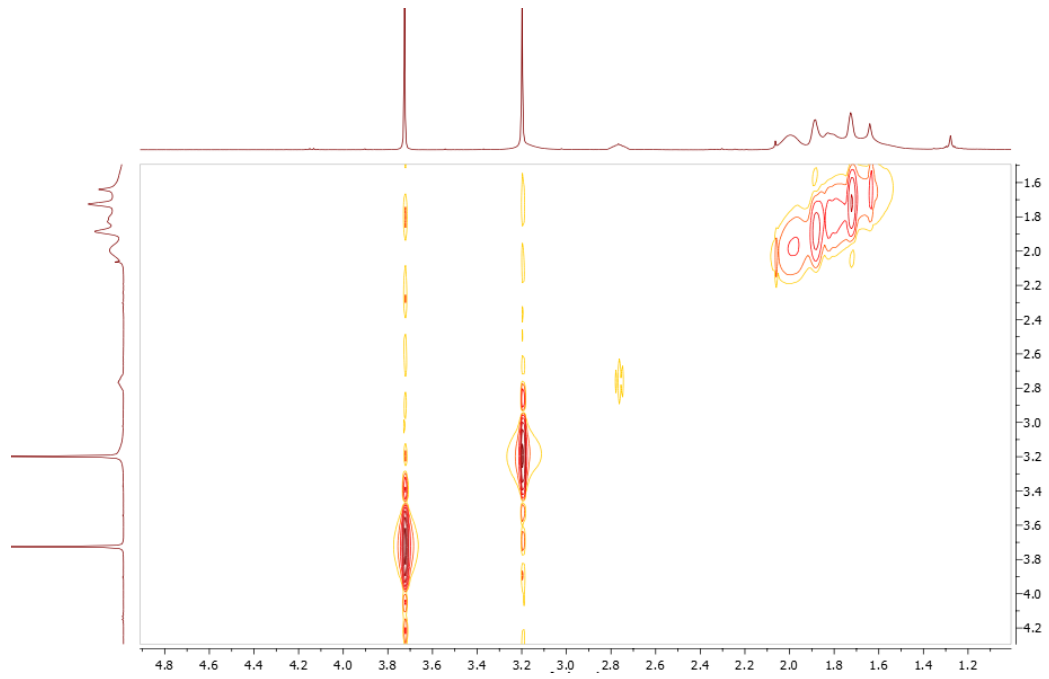
Espectro bidimensional HMQC do composto híbrido 66



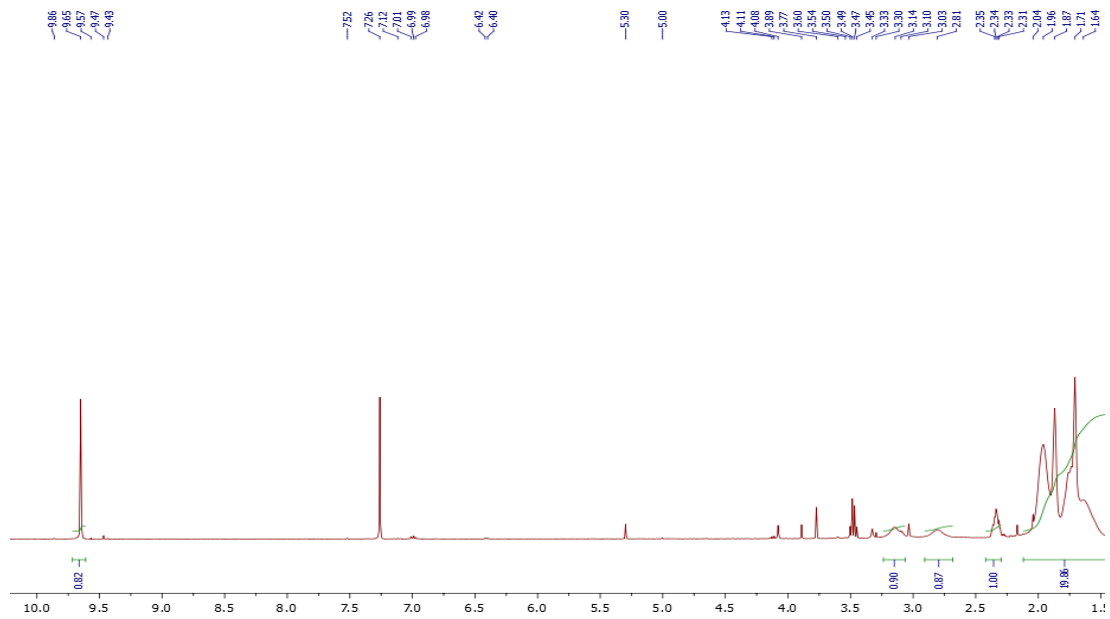
Espectro de ¹H-RMN do derivado hidroxamato (73, amida de Weinreb)



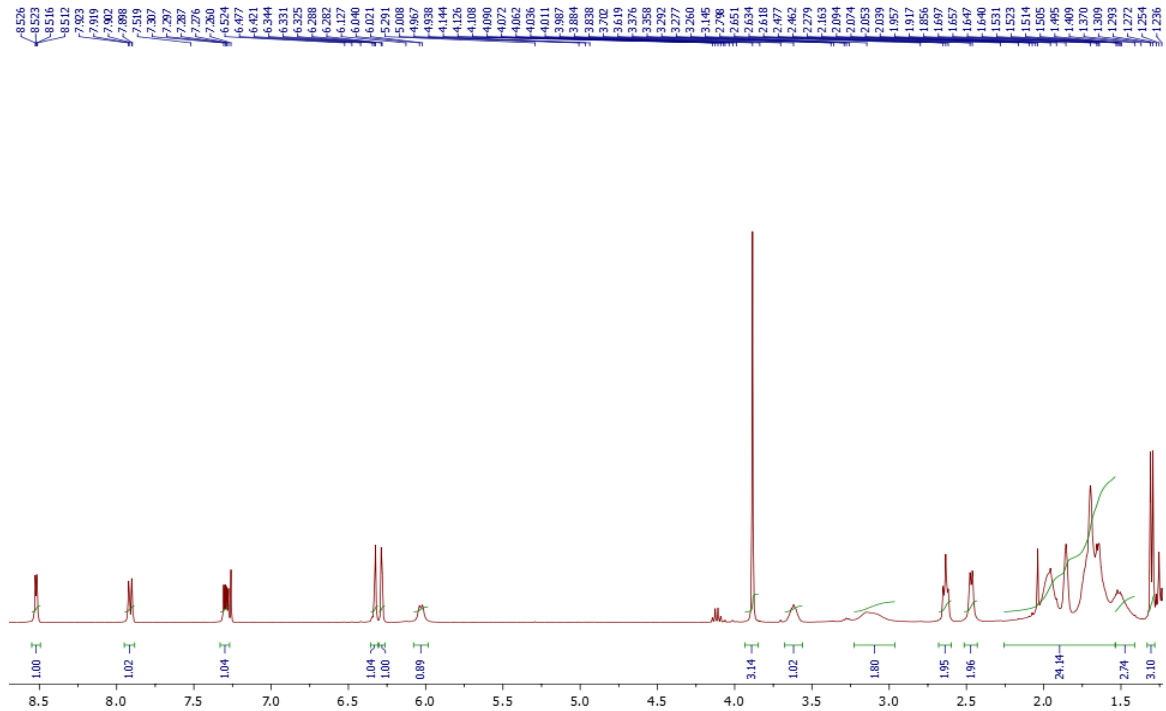
Espectro bidimensional COSY do derivado hidroxamato (73, amida de Weinreb)



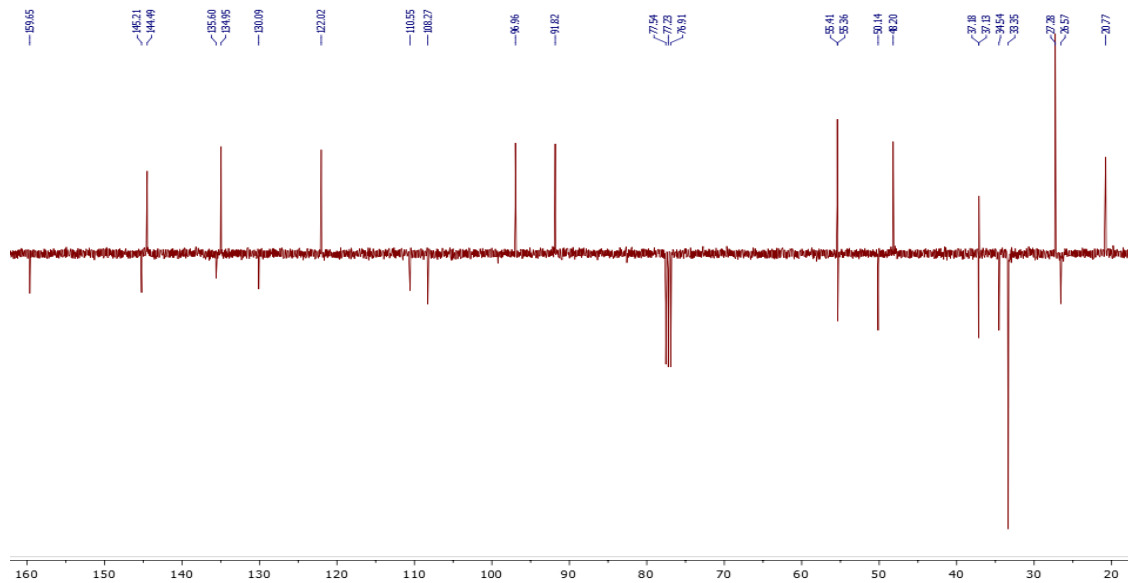
Espectro de ¹H-RMN do derivado aldeído tetraoxano (71)



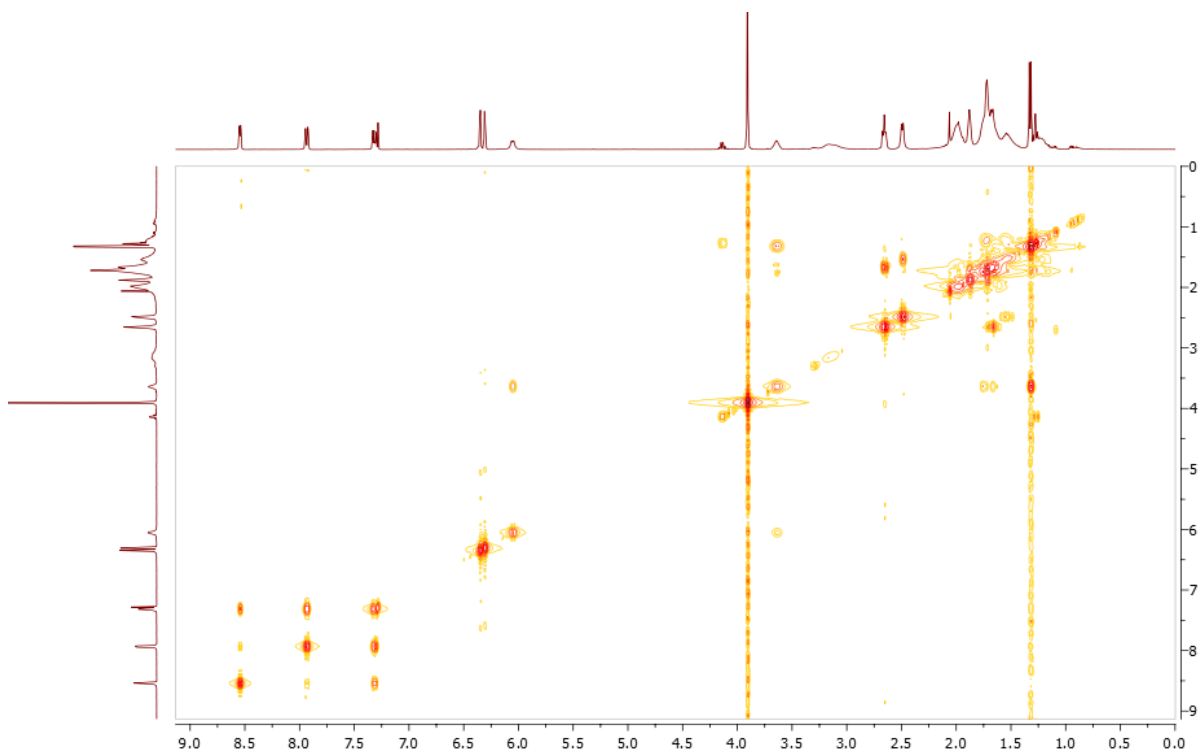
Espectro de ¹H-RMN do composto híbrido 70



Espectro de ¹³C-RMN do composto híbrido 70



Espectro bidimensional COSY do composto híbrido 70



Espectro bidimensional HMQC do composto híbrido 70

