

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



Otimização de compostos de quinolina para Doenças Negligenciadas

Bloqueio de vias de metabolização

Carolina Neves Carrilho

Dissertação orientada por:

Orientadora: Professora Doutora Francisca Lopes

Co-orientadora: Professora Doutora Maria de Jesus Perry

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa, 2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



Otimização de compostos de quinolina para Doenças Negligenciadas

Bloqueio de vias de metabolização

Carolina Neves Carrilho

Dissertação orientada por:

Orientadora: Professora Doutora Francisca Lopes

Co-orientadora: Professora Doutora Maria de Jesus Perry

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa, 2016

Resumo

Segundo a organização mundial de saúde (OMS) estima-se que tenham ocorrido globalmente cerca de 200 milhões de casos de malária em 2013 e 1,6 milhões de novos casos de leishmaniose, tendo aumentado exponencialmente nos últimos anos. Uma das causas apontadas para o aumento de novos casos é o rápido desenvolvimento da resistência aos fármacos, sendo totalmente desaconselhado pela OMS o uso da monoterapia. Nas últimas décadas vários estudos evidenciam as vantagens da utilização de compostos híbridos, nos quais dois farmacóforos distintos são ligados covalentemente numa única molécula.

Nesta dissertação foram sintetizados novos compostos híbridos baseados nos farmacóforos 8-aminoquinolina e tetraoxano como possíveis candidatos à erradicação da malária e leishmaniose. A variação na cadeia lateral destes compostos têm como objetivo promover a sua atuação na fase hepática e sanguínea do ciclo infeccioso da malária e de igual forma na fase intracelular da leishmaniose. Adicionalmente, numa tentativa de diminuir a metabolização da parte 8-aminoquinolina, os compostos foram sintetizados com substituição na posição 5 do anel de quinolina. Os compostos sintetizados, foram caracterizados por espectroscopia IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN e técnicas bidimensionais de COSY, HMBC e HMQC.

Foram realizados estudos de estabilidade em homogenato de fígado de rato a 37°C , onde se verificou que os compostos sofreram uma rápida degradação metabólica, apresentando tempos de meia-vida entre os 15 e 35 minutos.

A atividade antimalárica dos compostos híbridos foi testada *in vitro* contra a fase sanguínea do *Plasmodium falciparum* W2. Neste estudo nenhum dos compostos híbridos apresentou uma atividade superior à artemisinina, mas todos os compostos demonstraram ter uma boa atividade antimalárica. No estudo da atividade na fase hepática, os novos compostos apresentaram atividade superior à primaquina em concentrações mais elevadas.

Em suma, os novos compostos híbridos possuem uma boa atividade contra a fase hepática e sanguínea do ciclo de vida da malária. A sua instabilidade pode ser relacionada com a metabolização na cadeia lateral. O composto híbrido com cadeia lateral de quatro carbonos (**52b**) demonstra ter maior atividade na fase sanguínea e hepática, sendo também o mais instável.

Palavras-chave: malária, leishmaniose, compostos híbridos, 8-aminoquinolina e tetraoxano.

Abstract

According to the World Health Organization (WHO) is estimated to have occurred globally about 200 million cases of malaria in 2013 and 1,6 million new cases of leishmaniasis are detected every year, and increasing exponentially in recent years. One of the many causes for the increase of new cases is the fast resistance development to the drugs, being totally unadvised by the WHO the use of monotherapy. In the last decades several studies point out the advantage of using hybrid compounds, in which two distinct drugs are covalently connected in one unique molecule.

In this work were synthesized new hybrid compounds based on 8-aminoquinoline and tetraoxane pharmacophores as possible candidates to the eradication of malaria and leishmaniasis. The variation of the side chain have the objective to promote its action in the hepatic and blood stages of the infectious cycle of malaria and in equal form acting in the intracellular stage of leishmaniasis. Furthermore, the compounds were synthesized with a substitution of the quinoline ring in the fifth position, in an attempt to reduce the metabolization of the 8-aminoquinoline part. The synthesized compounds were featured by IV spectroscopy, ^1H RMN, ^{13}C RMN techniques and two-dimensional of COSY, HMBC and HMQC.

Stability tests were performed in rat liver homogenate at 37°C in which was found that the compounds suffered a quick metabolic degradation, presenting half-life times between 15 and 35 minutes.

The antimalarial activity in the hybrid compounds was tested in vitro against the blood stage of the *Plasmodium falciparum* W2. In this study none of the hybrid compounds presented an activity higher than the artemisinin, but all of the compounds showed good antimalarial activity. In the liver stage activity study, the new compounds exhibit higher activity in higher concentrations to the primaquine.

In sum, the new hybrid compounds possess good activity against the liver and blood stages in the malaria life cycle. The instability may be related to the metabolism in the side chain. The hybrid compound with a lateral chain with four carbons (**52b**) demonstrates a higher activity in the blood and hepatic stages, being the less stable.

Keywords: malaria, leishmaniasis, hybrid compounds, 8-aminoquinoline and tetraoxanes

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado. A todos eles deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Francisca Lopes como orientadora, total apoio, acompanhamento e disponibilidade, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pelas opiniões e críticas, que contribuíram para a evolução do meu percurso académico e por todas as palavras de incentivo.

À Professora Doutora Maria de Jesus Perry como co-orientadora, pelas sugestões de melhoria, disponibilidade, simpatia e palavras de incentivo.

À Daniela Miranda e Joana Magalhães um agradecimento muito especial por todo o conhecimento teórico e experimental transmitido e por todo o apoio, amizade, paciência, preocupação e por todas as palavras de incentivo nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado e laboratório, pelo apoio e todos os momentos de boa disposição que foram proporcionando durante as horas de trabalho.

Ao Jorge Sousa e Silva um agradecimento especial por todo o apoio, motivação, pela grande amizade e presença constante tanto nos bons como nos maus momentos, durante estes anos.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, pela compreensão, motivação, carinho e palavras de incentivo sem os quais não conseguiria chegar até aqui.

Ao Telmo Trigueiro por todo o carinho, disponibilidade, pela paciência e compreensão durante este período e também por todo o incentivo ao longo destes anos.

Às minhas amigas e amigos, em especial à Tânia Leandro e Ana Pereira o meu muito obrigada pelo apoio e motivação constante, pela amizade e preocupação durante todos estes anos de amizade.

Aos chefes e colegas de trabalho, por toda a compreensão, paciência, alegria e disponibilidade de horários que foram essenciais para a realização desta dissertação.

Índice Geral

Resumo.....	I
Abstrat.....	III
Agradecimentos.....	V
Índice geral.....	VII
Índice das Figuras.....	X
Índice das Tabelas.....	XII
Abreviaturas.....	XIII
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Malária.....	4
1.1.1.Ciclo de vida do protozoário Plasmódio.....	4
1.1.2.Fármacos antimaláricos.....	6
1.2. Leishmaniose.....	10
1.2.1.Ciclo de vida do protozoário leishmânia.....	12
1.2.2.Fármacos usados no tratamento da leishmaniose.....	13
1.3. 8-Aminoquinolina.....	18
1.3.1.Mecanismo de ação.....	19
1.3.2.Metabolismo.....	21
1.3.3.Toxicidade.....	22
1.4. Endoperóxidos.....	24
1.4.1.Mecanismo de ação.....	26
1.4.2.Toxicidade.....	27
1.5. Compostos híbridos.....	28
1.6. Âmbito da tese.....	30
Capítulo 2 – Síntese e Caracterização dos Compostos híbridos.....	32
2.1. Síntese do derivado bromado.....	34
2.2. Síntese do 5-(fluorfenilo)-6-metoxi-8-nitroquinolina.....	36
2.3. Síntese do derivado amina.....	37
2.4. Proteção da cadeia lateral alquílica.....	39

2.5. Acoplamento da cadeia lateral á 8-aminoquinolina.....	41
2.6. Reação de desproteção da amina primária.....	44
2.7. Síntese dos compostos híbridos.....	46
Capítulo 3 – Estabilidade e Atividade dos Compostos híbridos.....	50
3.1. Ensaio de estabilidade dos compostos híbridos.....	51
3.2. Estudos biológicos dos compostos híbridos na fase sanguínea da malária.....	55
3.3. Estudos biológicos dos compostos híbridos na fase hepática da malária.....	56
3.4. Estudos biológicos dos compostos híbridos na leishmaniose.....	57
Capítulo 4 – Conclusão.....	58
Capítulo 5 – Procedimento experimental.....	60
5.1. Reagentes e solventes.....	61
5.1.1. Reagentes.....	61
5.1.2. Solventes.....	61
5.2. Cromatografia.....	62
5.3. Equipamentos.....	62
5.4. Procedimento de síntese e caracterização dos compostos.....	63
5.4.1. Composto 46: 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina.....	63
5.4.2. Composto 47: 5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-nitroquinolina.....	63
5.4.3. Composto 48: 5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina.....	64
5.4.4. Composto 53: 5-bromo-1-pentanoftalimida.....	64
5.4.5. Composto 47: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-alquil-isoindolina-1,3-diona.....	65
5.4.5.1. Composto 47a: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-isoindolina-1,3-diona.....	65
5.4.5.2. Composto 47b: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-isoindolina-1,3-diona.....	65
5.4.5.3. Composto 47c: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-isoindolina-1,3-diona.....	66

5.4.6. Composto 48: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-alquil-1,3-diamina.....	66
5.4.6.1. Composto 48a: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-1,3-diamina.....	66
5.4.6.2. Composto 48b: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-1,3-diamina.....	67
5.4.6.3. Composto 48c: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-1,3-diamina.....	67
5.4.7. Composto 51: Tetraoxano com função ácido.....	67
5.4.8. Composto 52: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-alquil-1,3-diamina tetraoxano.....	68
5.4.8.1. Composto 52a: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-1,3-diamina tetraoxano.....	68
5.4.8.2. Composto 52b: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-1,3-diamina tetraoxano.....	69
5.4.8.3. Composto 52c: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-1,3-diamina tetraoxano.....	69
5.5. Estabilidade dos compostos híbridos em microsomas de fígado de rato.....	69
Capítulo 6 – Bibliografia.....	71

Índice das Figuras

Figura 1 – Distribuição mundial de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea em 2012.....	2
Figura 2 – Distribuição mundial de transmissão da malária em 2013.....	3
Figura 3 – Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> , no hospedeiro humano e no mosquito <i>Anopheles</i> fêmea.....	4
Figura 4 – Representação estrutural da hematina (a) e hemozoína (b) com as respectivas interações químicas.....	6
Figura 5 – Fármacos antimaláricos com importância histórica e atual.....	7
Figura 6 – Ciclo de vida do parasita <i>Leishmânia</i> , no hospedeiro e no mosquito flebótomo fêmea.....	13
Figura 7 – Fármacos usados no tratamento da leishmaniose.....	14
Figura 8 – Estrutura das 8-aminoquinolinas.....	18
Figura 9 – Estrutura química dos compostos como atavaquona 23 e tafenoquina 24	20
Figura 10 – Estruturas químicas dos principais metabolitos da primaquina.....	21
Figura 11 – Derivados semi-sintéticos da artemisinina, di-hidroartemisinina (DHA) (35), artemeter (36) e artesunato (37).....	24
Figura 12 – Exemplos de compostos 1,2,4-trioxanos.....	25
Figura 13 – Exemplo de compostos 1,2,4,5-tetraoxanos.....	25
Figura 14 – Representação esquemática do modo de atuação dos compostos endoperóxidos..	26
Figura 15 – Mecanismo proposto para a reação do Fe (II) com o tetraoxano.....	27
Figura 16 – Compostos híbridos ativos contra a fase intracelular da leishmaniose (41) e ativo contra a fase hepática e sanguínea da malária (42).....	29
Figura 17 – Retrossíntese dos compostos híbridos tetraoxano-8-aminoquinolina com variação da cadeia lateral.....	33
Figura 18 – Síntese dos compostos híbridos.....	34
Figura 19 – Mecanismo de reação para a síntese do composto 44	34
Figura 20 – Espectro de ¹ H RMN do composto 44	35
Figura 21 – Ciclo catalítico da reação de Suzuki.....	36

Figura 22 - Espectro de ^1H RMN do composto 45	37
Figura 23 – Mecanismo de ação do grupo nitro a amina.....	38
Figura 24 – Espectro de ^1H RMN do composto 46	38
Figura 25 – Reação da conversão da ftalimida no respetivo sal de potássio.....	39
Figura 26 – Mecanismo proposto para a síntese do composto 53	39
Figura 27 – Espectro de ^1H RMN do composto 53	40
Figura 28 – Esquema reacional do acoplamento da cadeia lateral para obtenção composto 47a-c	41
Figura 29 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção dos compostos 47a-c	41
Figura 30 – Espectro de ^1H RMN do composto 47a	42
Figura 31 – Mecanismo proposto para a síntese do composto 48a-c	44
Figura 32 – Espectro de ^1H RMN do composto 48a	45
Figura 33 – Mecanismo proposto para a catálise ácida e posterior ciclização para obter o composto 50	46
Figura 34 – Esquema reacional dos intermediários envolvidos na síntese dos compostos híbridos.....	47
Figura 35 – Espectro de ^1H RMN do composto 52a	48
Figura 36 – Cromatogramas do composto 52a obtido durante o estudo de estabilidade em homogenato de fígado de rato.....	52
Figura 37 – Gráfico da correlação entre o $\ln(\text{área})$ em função do tempo do estudo de estabilidade do composto híbrido 52a	53
Figura 38 – Estrutura química do composto 54 e 55	54
Figura 39 – Estrutura de alguns possíveis metabolitos dos compostos híbridos resultantes do estudo de estabilidade.....	55
Figura 40 – Atividade dos compostos em estudo como esquizonticidas tecidulares sobre o parasita da malária.....	57

Índice das Tabelas

Tabela 1 – Classificação dos compostos antimaláricos tendo em conta o seu modo de ação no ciclo de vida do parasita da malária.....	8
Tabela 2 – Modo de ação dos fármacos antimaláricos, segundo a sua classe.....	9
Tabela 3 – Diferentes tipos de doenças da leishmaniose, espécies de parasitas e regiões.....	12
Tabela 4 – Modo de ação dos fármacos usados contra a leishmaniose, segundo a sua classe...	15
Tabela 5 – Rendimento das reações de acoplamento da cadeia lateral ao derivado 8-aminoquinolina.....	42
Tabela 6 – Desvio químico dos protões dos compostos 47a-c	43
Tabela 7 – Rendimentos das reações de desproteção dos compostos 48a-c	45
Tabela 8 – Desvio químico dos protões dos compostos 48a e c	45
Tabela 9 – Rendimentos das reações de desproteção dos compostos 52a-c	47
Tabela 10 – Desvio químico dos protões dos compostos 52a-c	48
Tabela 11 – Tempo de retenção dos compostos híbridos.....	52
Tabela 12 – Valores das constantes de velocidade e tempo de meia-vida dos compostos híbridos, determinado com base nos resultados obtidos no estudo de estabilidade.....	53
Tabela 13 – Atividade esquizotocida sanguínea dos compostos híbridos em estudo e da artemisinina.....	55
Tabela 14 – IC ₅₀ da fase hepática dos compostos híbridos em estudo.....	57

Abreviaturas

^1H RMN – Ressonância Magnética de próton

^{13}C RMN – Ressonância Magnética de carbono

ACT – Terapia Combinada à base de Artemisinina

ADME – absorção, distribuição, metabolização e excreção

ART – Artemisinina

ACN – Acetonitrilo

COSY – Correlation Spectroscopy

DCM - Diclorometano

DN – Doenças Negligenciadas

G6PD – Glucose-6-fosfato-desidrogenase

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HPLC – Cromatografia Líquida de alta resolução

IC_{50} – Concentração inibitória 50%

IV – Espetroscopia de infravermelho

J – Constante de acoplamento

k_{obs} – Constante de velocidade de reação

MAO – monoaminoxidase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão Fosfato Isotónico

ppm – parte por milhão

PQ – Primaquina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

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

TEA – Trietilamina

TLC – cromatografia em camada fina

t_r – tempo de retenção

UV-Vis – Ultravioleta – Visível

Capítulo 1

Introdução

As doenças negligenciadas (DN) têm um elevado impacto social e económico sobre as populações mais pobres da África, Ásia e América Latina, causando cerca de 2 milhões de mortes por ano.^[1,2] Com um impacto económico-social semelhante, surge a malária, onde se estima que cerca de 3,3 mil milhões da população mundial corra o risco de ser infetada pela doença.^[3]

A malária e a leishmaniose são doenças causadas por parasitas protozoários, tendo uma elevada taxa de mortalidade e morbilidade, principalmente em países africanos.^[4]

Nas duas últimas décadas a distribuição da leishmaniose aumentou exponencialmente, existindo cerca de 1,6 milhões de novos casos. Esta doença pode-se manifestar sob diferentes formas (que serão abordadas na sessão 1.2), sendo os casos principais a leishmaniose cutânea e visceral. Estima-se que o número de casos de leishmaniose visceral varie entre os 2 mil e os 4 mil, sendo a maioria em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Norte do Sudão. No caso da leishmaniose cutânea, calcula-se que existam 7 mil a 1,2 milhões de novos casos por ano distribuídos em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irão, Paquistão, Perú, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia (Figura 1).^[5,6,7]

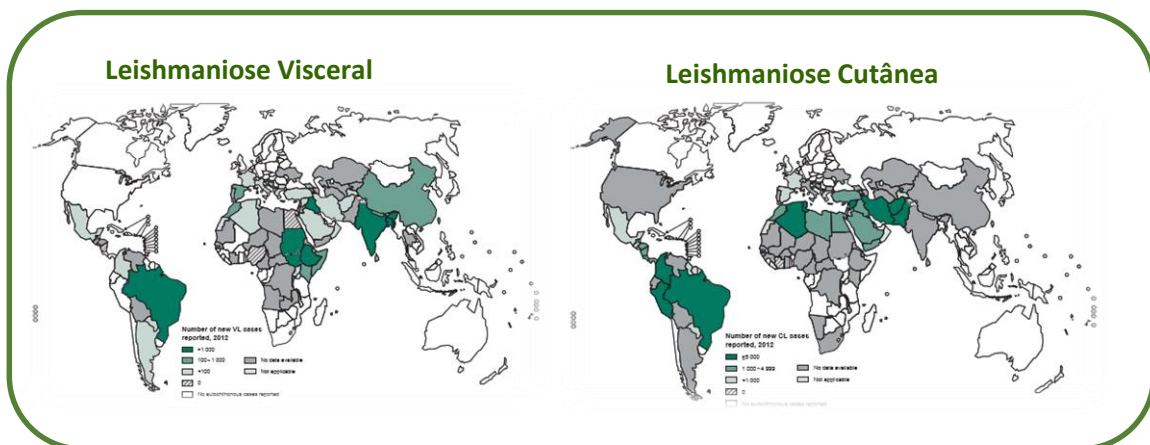


Figura 1 – Distribuição mundial de leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea em 2012. Imagem adaptada de [5].

De acordo com a OMS, estima-se que tenham ocorrido cerca de 198 milhões de novos casos de malária, mundialmente em 2013. A malária é uma doença endémica em países como Nigéria, Moçambique, Tanzânia, Quênia, Zâmbia, Angola e República Democrática do Congo.^[3]

Esta doença levou a 584 mil mortes, sendo que o local mais afetado é o Continente Africano com cerca de 90% dos casos. Sabe-se que destes cerca de 78% das mortes ocorrem em crianças com idades inferiores a 5 anos (Figura 2).^[3,8]

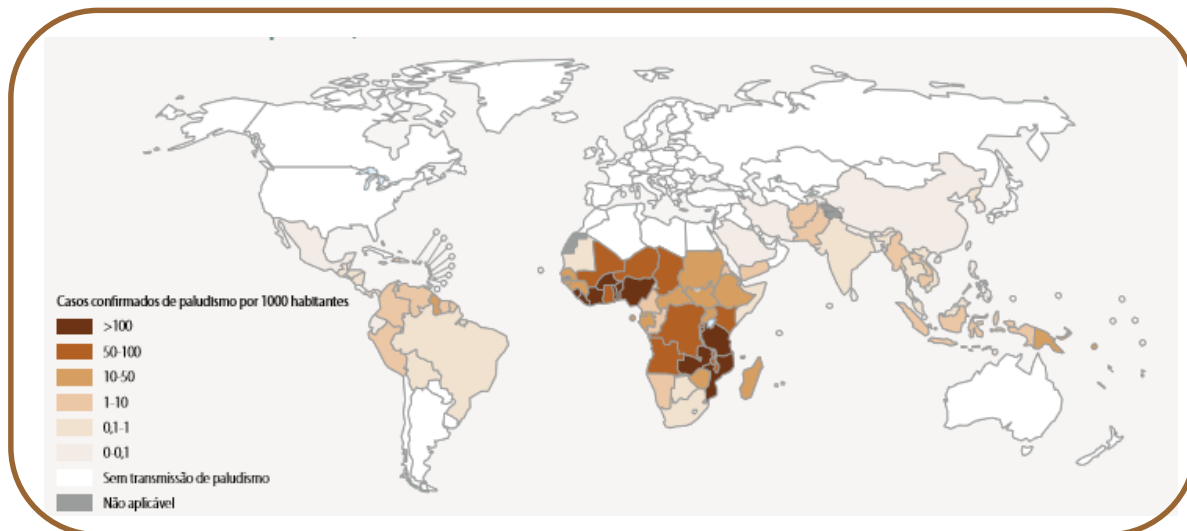


Figura 2 – Distribuição mundial de transmissão da malária em 2013. Imagem adaptada de [3].

1.1 Malária

A malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium* e é transmitida ao homem através de picada do mosquito infetado.^[8,9] Atualmente conhecem-se cerca de 400 espécies diferentes de mosquitos, mas apenas 30 são considerados vetores importantes, na origem da doença.^[3] As espécies *Plasmodium* capazes de provocar a doença nos humanos são, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e o *P. knowlesi*. O *Plasmodium falciparum* é de longe o mais mortal das 5 espécies, sendo responsável pela maior parte da mortalidade e morbilidade associada à malária, em países da África Sub-Sariana.^[8,10]

1.1.1 Ciclo de vida do protozoário Plasmódio

Durante o ciclo de vida da espécie *Plasmodium*, existem duas formas de replicação, a fase assexuada que ocorre no hospedeiro mamífero, e a fase sexuada que se desenvolve no mosquito *Anopheles* fêmea (Figura 3).^[11]

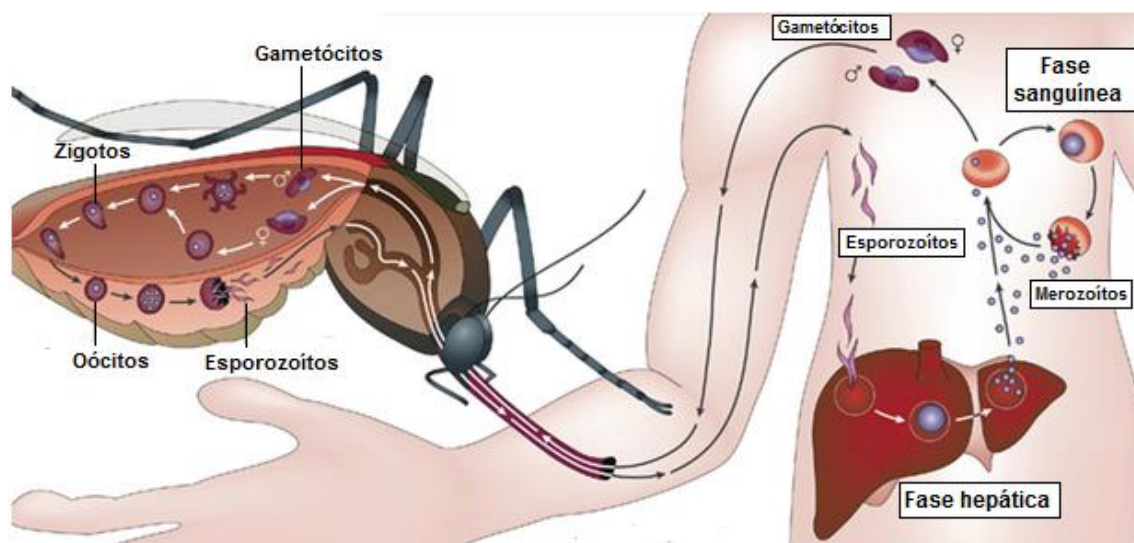


Figura 3 – Ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, no hospedeiro humano e no mosquito *Anopheles* fêmea. Adaptado de [12].

A infecção é iniciada quando os esporozoítos entram no hospedeiro através da picada de um mosquito infetado. Os esporozoítos migram rapidamente para o fígado, através da corrente sanguínea onde invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática da doença, que é assintomática. Cada esporozoíto diferencia-se e divide-se por mitose em

milhares de merozoítos. Passados 2 a 16 dias (dependendo da espécie de *Plasmodium*) milhares de merozoítos são libertados para a corrente sanguínea, onde invadem os eritrócitos – iniciando a fase sanguínea. Nesta fase os pacientes começam a sentir os sintomas da infecção.^[8,9,10] Sendo os sintomas semelhantes a uma gripe comum, com febre, calafrios, dor de cabeça e vômitos. O diagnóstico é confirmado pela identificação de parasitas no sangue do hospedeiro, com ajuda de um microscópio. Se não tratada a malária pode provocar anemia, hiperglicemia, insuficiência renal e malária cerebral, no caso da espécie *P. falciparum* pode levar à morte do paciente.^[8]

Cada merozoíto libertado dos hepatócitos invade um eritrócito, sofrendo algumas modificações morfológicas passando da fase de anel a trofozoítos. Após uma replicação assexuada dos trofozoítos formam-se novas estruturas, os esquizontes, que quando atingem a maturação rompem os eritrócitos sendo libertados novos merozoítos para a corrente sanguínea. Os merozoítos livres possuem a capacidade de invadir outros eritrócitos para continuar o ciclo assexuado da fase sanguínea. Esta replicação produz cerca de 16 a 32 merozoítos em ciclos de 48h.^[11] Uma pequena proporção dos merozoítos desenvolvem-se nas formas sexuais do parasita, os chamados gametócitos. Estes são absorvidos pelo mosquito durante a alimentação – nova picada no hospedeiro – infectando um novo mosquito.^[8,9,10]

Os gametócitos submetidos a fertilização dão origem aos zigotos que depois da maturação no intestino médio do mosquito, formam oócitos infecciosos. Quando totalmente desenvolvido o oócito rompe-se e liberta esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito, aguardando pela próxima picada no hospedeiro.^[9,10]

A maioria das mortes causada pela malária são da responsabilidade da espécie *P. falciparum*. A malária cerebral é causada por esta espécie, sendo uma complicação ao nível dos eritrócitos nos vasos sanguíneos do cérebro, associado a perda de consciência. Esta doença pode ser fatal se não for tratada imediatamente.

Os parasitas da espécie *P. vivax* e *P. ovale* podem permanecer na fase hepática na sua forma latente (hipnozoítos) durante anos, podendo causar recaídas clínicas.^[11]

Durante a fase sanguínea, o parasita degrada cerca de 80% da hemoglobina presente no eritrócito.^[13] No caso da espécie *P. falciparum* a degradação da hemoglobina ocorre durante a forma de trofozoítos e início dos esquizontes, estados onde os parasitas são metabolicamente ativos. O crescimento dos parasitas depende da disponibilidade dos

aminoácidos livres, os quais são obtidos a partir da degradação da hemoglobina com a ajuda de enzimas proteolíticas. A hemoglobina do eritrócito é ingerida e transportada para o vacúolo digestivo do trofozoíto, onde é digerida originando péptidos que posteriormente são hidrolisados a aminoácidos livre, sendo o alimento dos parasitas.^[13,14,15] Desta degradação resulta a libertação de grandes quantidades de heme livre no vacúolo digestivo. O heme livre (Fe^{2+}) é rapidamente oxidado a hematina (Fe^{3+}) funcionando como uma molécula capaz de gerar espécies reativas de oxigénio, que provocam danos celulares (Figura 4). Para superar a toxicidade da hematina, o parasita possui um sistema de defesa antioxidante, que converte a hematina num composto não tóxico – hemozoína ou pigmento da malária.^[14, 15]

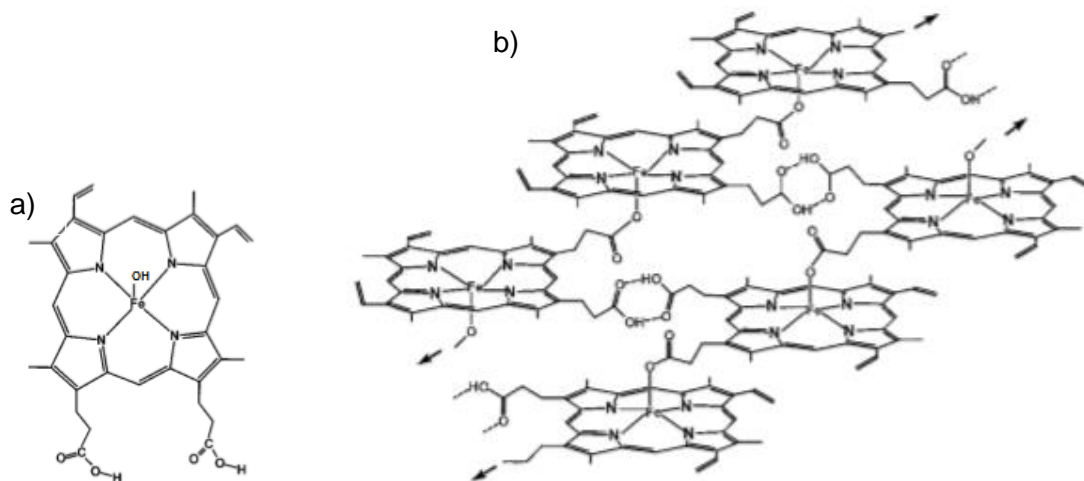


Figura 4 – Representação estrutural da hematina (a) e hemozoína (b) com as respetivas interações químicas. Adaptado de [16].

1.1.2 Fármacos antimaláricos

As primeiras tentativas de tratamento desta doença surgem por volta do séc. XII, com o uso de casca de Cinchona. Em 1820 foi isolada a quinina **1** que constitui o princípio ativo no tratamento da doença, tornando assim a malária uma das primeiras doenças tratadas com um composto químico puro. Em 1891 Paul Ehrlich, descobre que o corante azul metileno **2**, usado até então na indústria de tintas, tem propriedades antimaláricas, chegando a curar dois pacientes com este produto. Através da modificação do corante azul metileno ao longo dos anos, surgem estruturas como: pamaquina **3** (primeiro fármaco capaz de prevenir as recidivas da malária por *P. vivax*), 8-aminoquinolina **4**,

mepacrina **5** (fármaco ativo contra a fase sanguínea para o *P. falciparum*) e cloroquina **6** (uma 4-aminoquinolina considerada um antimalárico muito eficaz e importante). Nos dias de hoje algumas espécies desenvolveram resistência à cloroquina, surgindo assim a necessidade de desenvolver novos fármacos. Surgindo posteriormente o proguanilo **7**, mas devido à sua baixa eficácia surge como padrão para o desenvolvimento de outros fármacos como é o caso da pirimetamina **8**. Devido à baixa eficácia de alguns fármacos e à elevada resistência do parasita a fármacos como a cloroquina, sintetizou-se a mefloquina **9** e a halofantrina **10**, durante a Guerra do Vietname. Em 1972, foi isolada a artemisinina **11**, a partir da planta *Artemisia annua*, como sendo um composto ativo e com potencial antimalárico (Figura 5).^[9, 17]

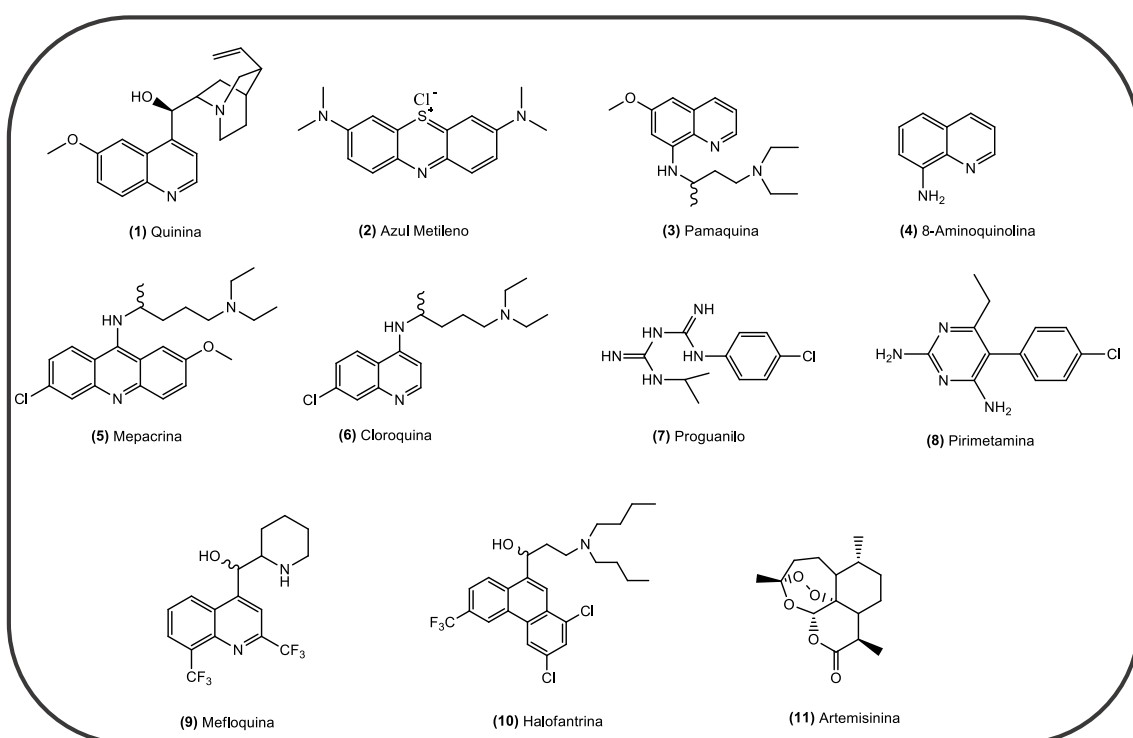


Figura 5 - Fármacos antimaláricos com importância histórica e atual. Adaptado de [9].

Considerando as fases do ciclo de vida do parasita no qual atuam, os compostos antimaláricos podem ser classificados em 5 grupos (Tabela 1).^[18]

Tabela 1 – Classificação dos compostos antimaláricos tendo em conta o seu modo de ação no ciclo de vida do parasita da malária.

<i>Classificação</i>		<i>Modo de ação</i>	<i>Compostos antimaláricos</i>
Esquizontocida tecidular	Primário	Fármacos que atuam nas formas parasitárias pré-eritrocíticas. Evitando a invasão dos eritrócitos.	8-Aminoquinolinas Antifolatos
	Secundário	Fármacos que atuam nas formas parasitárias latentes (hipnozoítos) do parasita <i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i> . Evita as recaídas.	8-Aminoquinolinas
Esquizontocida sanguíneo		Fármacos que atuam nas formas parasitárias assexuadas eritrocíticas. Atua nos sintomas da doença.	4-Aminoquinolinas Artemisinina
Gametocitocida		Fármacos que atuam nas formas parasitárias sexuadas. Evita a transmissão do mosquito.	8-Aminoquinolina Artemisinina
Esporontocida		Fármaco que impede o desenvolvimento do oócito.	8-Aminoquinolina 4-Aminoquinolina Antifolatos

O aumento de casos da doença deve-se principalmente, às limitações dos programas de controlo dos vetores e ao rápido desenvolvimento de resistência dos parasitas a fármacos como a cloroquina. Assim sendo o maior desafio da atualidade é a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos, bem como o desenvolvimento de compostos análogos aos antimaláricos já existentes.^[9, 19]

Tabela 2 – Modo de ação dos fármacos antimaláricos, segundo a sua classe.^[17, 20]

Classe	Fármacos	Mecanismo de ação
4-Aminoquinolinas	Cloroquina, Amodiaquina	Interfere na desintoxicação do heme
8-Aminoquinolinas	Pamaquina, Primaquina	Mecanismo ainda não totalmente esclarecido
Sulfonamida e Sulfonas	Sulfadoxina	Inibe a di-hidropteroato sintetase
	Pirimetamina	Inibe a di-hidrofolato redutase
Biguanidos	Proguanilo	Inibidor da di-hidrofolato redutase
Naftoquinonas	Atovaquona	Interfere na função mitocondrial
Amino-álcoois	Quinina, Mefloquina, Halofantrina	Interfere na degradação da hemoglobina
Peróxidos	Artemisinina, Dihidroartemisinina, artemeter, arteeter, artesunato	Forma radicais livres com a ativação da ligação peroxídica, através da ligação com heme

1.2 Leishmaniose

A leishmaniose é classificada como uma doença negligenciada, sendo causada por um agente protozoário do género *Leishmania*. A doença pode-se manifestar sob a forma de leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e ainda a leishmaniose pós-kala-azar cutânea.^[5,21] Os sintomas clínicos de todas as formas de leishmaniose são influenciados pela idade, estado nutricional e resposta imunitária do hospedeiro.^[22,23]

A **leishmaniose cutânea** é a forma mais comum e menos grave da doença, onde o hospedeiro apresenta inicialmente um nódulo que cresce gradualmente (em aproximadamente uma semana atinge o seu tamanho final). Posteriormente a crosta cai expondo uma úlcera. Estas lesões geralmente curam espontaneamente e ocorrem tipicamente nos braços, pernas, rosto ou orelhas, deixando cicatrizes desfigurantes para a vida. O diagnóstico pode ser confirmado pela presença de amastigotas na úlcera da pele ou por biopsia. A resposta da leishmaniose cutânea depende de dois fatores: i) a resposta imunitária celular que reflete a imunidade do hospedeiro, e ii) a resposta do tecido que reflete os efeitos do antigénio libertado no hospedeiro.^[21,24,25]

A **leishmaniose mucocutânea** é uma lesão semelhante à leishmaniose cutânea, mas raramente cicatriza espontaneamente. Inicialmente ocorre uma reação celular inflamatória na presença de linfócitos e macrófago. Posteriormente desenvolve-se um nódulo em torno da área afetada que pode progredir para um granuloma epitelióide. Esta doença leva frequentemente à destruição crónica dos tecidos da mucosa da boca e do trato respiratório superior, podendo afetar a função respiratória e dificultar a nutrição. A forma mais grave da leishmaniose mucocutânea ocorre quando a lesão atinge a mucosa nasal onde os amastigotas em proliferação, que se encontram presentes no endotélio vascular, provocam a liquefação da cartilagem. As lesões múltiplas acima da cintura ou a cura retardada da leishmaniose cutânea primária são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da leishmaniose mucocutânea. Esta doença pode manifestar-se desde vários meses a 20 anos ou mais, após uma lesão cutânea. Numa fase final, podem ocorrer mutilações graves com obstrução e destruição do nariz, boca e da laringe. As infeções bacterianas, como a pneumonia, e a desnutrição são uma das principais causas de morte dos pacientes com leishmaniose mucocutânea.

[24,25]

A **leishmaniose visceral**, também conhecida por kala-azar, pode ser endêmica, esporádica ou epidêmica. A maioria das infecções são assintomáticas e muitas vezes curam-se espontaneamente. A hiperplasia retículo-endotelial causada pela infecção da *L. donovani* ou *L. infantum* afeta o baço, o fígado, a mucosa do intestino delgado, a medula óssea e os nódulos linfáticos. Nos casos mais graves provoca febre, mal-estar, tremores ou calafrios, anorexia e anemia devido a redução dos leucócitos e eritrócitos. O período de incubação do parasita varia entre os 10 dias e mais de um ano, o aparecimento da doença é gradual. A linfadenopatia surge principalmente no Sudão, enquanto que, na Índia ocorre frequentemente o escurecimento da pele da face, mãos, pés e abdômen. Em casos extremos da doença é frequente o aparecimento de outras infecções, principalmente a pneumonia, a disenteria e a tuberculose, podendo levar a morte do paciente. A leishmaniose visceral é considerado a forma mais grave de leishmaniose.^[22,24,26]

A **leishmaniose pós-kala-azar cutânea** surge após a cura aparente da leishmaniose visceral, permanecendo assintomático durante meses ou anos. O paciente sofre de uma proliferação progressiva do parasita, originando hipopigmentação ou nódulos em qualquer parte do corpo, que levam frequentemente à descamação da pele e mucosas. Esta doença é muitas vezes confundida com a doença de lepra. A leishmaniose pós-kala-azar cutânea, no Sudão atinge cerca de 50% dos pacientes e pode surgir de 0-6 meses após o aparecimento da leishmaniose visceral, enquanto que na Índia a incidência é de 5-10% e ocorre entre os 6 meses e os 3 anos.^[21,24,25]

Tabela 3 – Diferentes tipos de doenças da leishmaniose, espécies de parasitas e regiões.^[24]

Doença	Espécies	Localização geográfica
Leishmaniose cutânea	<i>L. major</i> e <i>L. tropica</i>	Extremo e médio oriente, Centro oeste, Europa oriental e África.
	<i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. paramensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	Europa central e continente Americano.
Leishmaniose mucocutânea	<i>L. braziliensis</i>	Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela.
Leishmaniose visceral	<i>L. donovani</i>	Índia, Paquistão, China e África.
	<i>L. infantum</i>	Regiões do Mediterrâneo e Brasil.
Leishmaniose pós-kala-azar	<i>L. donovani</i>	Índia e Sudão.

1.2.1 Ciclo de vida do protozoário *leishmânia*

Os parasitas são transmitidos pela picada do mosquito flebótomo fêmea da espécie *Phlebotomus* (em países do extremo e médio Oriente, Europa Central e África) ou da espécie *Lutzomyia* (em países da América Central e do Sul). São organismos dimórficos, ou seja, o seu ciclo de vida divide-se em duas formas morfológicas, sendo elas: i) amastigotas, forma intracelular não-flagelada que se desenvolve dentro do hospedeiro e ii) promastigotas, forma extracelular flagelada que se desenvolve dentro do órgão digestivo do vetor (Figura 6).^[21,27]

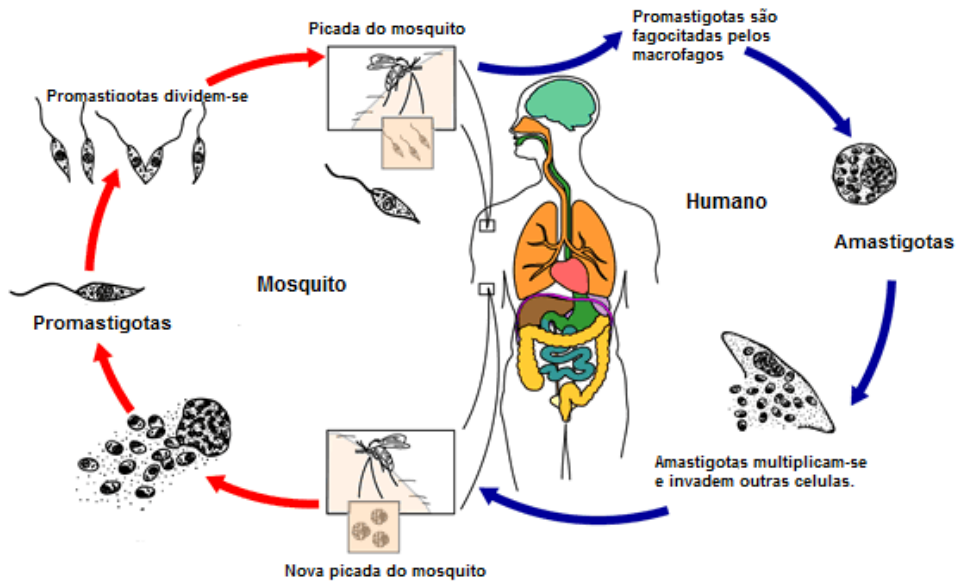
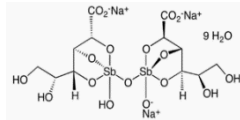


Figura 6 – Ciclo de vida do parasita *Leishmania*, no hospedeiro humano e no mosquito flebótomo fêmea. Adaptado de [28].

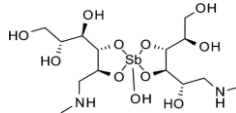
A infecção inicia-se quando os promastigotas entram na pele do hospedeiro através da picada do mosquito infetado. Os promastigotas são fagocitados, dando origem aos amastigotas, que se multiplicam por divisão celular. A replicação contínua dentro dos macrófagos leva a rutura celular, libertando os amastigotas, que invadem novas células fagocitárias. Nesta fase os pacientes começam a sentir os sintomas da doença, que variam consoante o tipo de leishmaniose.^[21,29] Uma pequena proporção dos amastigotas é absorvida na próxima alimentação de sangue do mosquito. Os amastigotas migram para o órgão digestivo do parasita onde se transformam em promastigotas. Finalmente estes migram para a boca do mosquito estando assim preparados para infetar um novo hospedeiro.^[21]

1.2.2 Fármacos usados no tratamento da leishmaniose

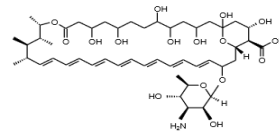
Para as diversas formas de leishmaniose existem várias terapias e as preferências de tratamento de primeira ou de segunda linha, dependem do tipo de doença, espécie de parasitas e a localização geográfica (Figura 7). Durante décadas o antimónio pentavalente foi usado como principal tratamento da leishmaniose. Contudo este fármaco começou a apresentar toxicidade múltipla tornando-se ineficaz devido à resistência do parasita, levando à necessidade de desenvolver novos fármacos.^[24,30]



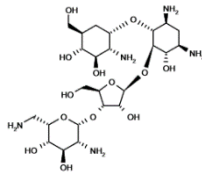
(12) Estibogluconato de Sódio



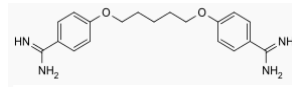
(13) Antimoniato de meglumina



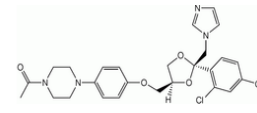
(14) Anfotericina B lipossômica



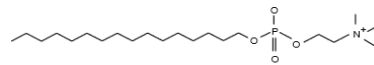
(15) Paromomicina



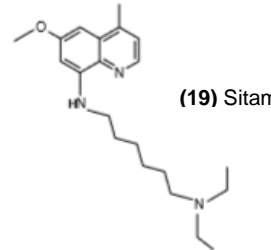
(16) Pentamidina



(17) Cetoconazol



(18) Miltefosina



(19) Sitamaquina

Figura 7 – Fármacos usados no tratamento da leishmaniose. Adaptado de [27].

Tabela 4 – Modo de ação dos fármacos usados contra a leishmaniose, segundo a sua classe

Classe	Fármaco	Mecanismo de ação
Antimónio Pentavalente	Estibogluconato de sódio	Atua na replicação dos amastigotas, influenciando a atividade dos macrófagos.
	Antimónio de meglumina	
Polieno	Anfotericina B desoxicolato	Liga-se à membrana celular do parasita provocando instabilidade membranar.
	Anfotericina B lipossómica	
Aminoglicosídeo	Paromomicina	Atua no bloqueio da síntese das proteínas através da ligação ao rRNA
Antimicrobiano	Pentamidina	Interfere na biossíntese de macromoléculas como ADN, RNA, fosfolípidos e proteínas.
Fosfolípido alquilo	Meltifosina	Mecanismo ainda não totalmente conhecido.
Antifúngico	Cetoconazol Fluconazol Itraconazol	Mecanismo ainda não totalmente conhecido.
8-Aminoquinolina	Sitamaquina	Mecanismo ainda não totalmente conhecido.

o Antimónio pentavalente

O composto mais usado em todas as formas de leishmaniose e principalmente na leishmaniose cutânea é o antimónio pentavalente (Sb), que se encontra disponíveis sob a forma de estibogluconato de sódio **12** (nome comercial: Pentostam) e antimoniato de meglumina **13** (nome comercial: Glucantime ou Glucatim). A administração deste fármaco pode ser por via intravenosa ou intramuscular, podendo ser por perfuração lenta prevenindo os riscos de trombose. Os efeitos secundários do antimónio pentavalente são anorexia, vômitos, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, dor de cabeça e sabor metálico. A cardiotoxicidade e morte súbita são os

efeitos colaterais mais graves, mas mais raros. Os primeiros casos de resistência ao antimônio pentavalente ocorrem na Índia, onde mais de 30% dos pacientes com leishmaniose visceral apresentaram falta de sensibilidade primária. Noutros países como é caso do continente africano, a falta de sensibilidade primária da leishmaniose visceral é rara, e a resistência é atribuída a doses e duração do tratamento inadequados.^[24,32,31]

o Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico usado no tratamento da leishmaniose visceral e mucocutânea. Na leishmaniose pós-kala-azar cutânea só é usada em zonas onde existe resistência aos fármacos antimoniais. Tanto a anfotericina B desoxicolato (nome comercial: Fungizone) e a anfotericina B lipossômica **14** (nome comercial: AmBisome) são semelhantes mas a anfotericina B lipossômica é menos tóxica. Ambos os medicamentos podem ser usados em conjunto com outros fármacos de forma a aumentar a eficácia do tratamento. Os efeitos secundários mais comuns são febres altas, arrepios ou calafrios, dor nos ossos, insuficiência renal e anemia. Os efeitos tóxicos mais graves da anfotericina B desoxicolato são o aparecimento de danos ao nível dos rins e miocardite sendo muitas vezes necessário interromper o tratamento. No caso da nefrotoxicidade é apenas transitória e a trombocitopenia é observada ocasionalmente. O AmBisome parece ter um melhor perfil eficácia / tolerância, mas como é o mais caro, geralmente é inacessível nos países endêmicos.^[24,31]

o Paromomicina

A paromomicina **15** é um antibiótico usado no tratamento da leishmaniose visceral principalmente na Índia, onde a resistência ao antimônio pentavalente é mais elevada. A administração geralmente é feita via intramuscular, mas também pode ser administrada sob a forma tópica para a leishmaniose cutânea. O efeito adverso mais comum é dor no local da injeção. A ototoxicidade e a hepatotoxicidade são efeitos adversos que podem surgir neste tipo de tratamento, mas o seu aparecimento é raro. A paromomicina pode ser usada isolada ou combinada com antimônio, permitindo uma redução da duração do tratamento.^[24,29,31]

- o **Pentamidina**

A pentamidina **16** é um antimicrobiano que pode ser administrado via intramuscular ou preferencialmente por perfusão intravenosa. Este fármaco é instável para a leishmaniose visceral, mas é altamente eficaz no caso da leishmaniose cutânea. Os efeitos secundários deste fármaco são o aparecimento de diabetes, hipoglicemia grave, miocardite e alterações das enzimas hepáticas.^[22,31]

- o **Meltifosina**

Inicialmente a metilfosina **18** foi desenvolvida como anticancerígeno sendo detetado posteriormente o seu potencial contra a leishmaniose. Este fármaco é o único administrado por via oral e deve ser usado em conjunto com a paromomicina. A meltifosina é eficaz no tratamento da leishmaniose visceral e mais recentemente verificou-se a sua eficácia na leishmaniose pós-kala-azar cutânea. Os seus principais efeitos adversos são náuseas, vômitos, diarreia, anorexia e é um agente teratogénico não sendo aconselhável a sua toma por mulheres grávidas. Ocasionalmente podem ser observados efeitos secundários mais graves como insuficiência renal que leva a necessidade de interromper o tratamento.^[22,24,29]

- o **Cetoconazol**

O cetoconazol **17** é um fármaco moderadamente eficaz para a leishmaniose cutânea. O itraconazol têm uma eficácia semelhante, mas é mais tolerável que o cetoconazol. Nem o cetoconazol, nem a itraconazol, tem capacidade de curar a leishmaniose visceral ou a leishmaniose pós-kala-azar cutânea.^[31]

- o **Sitamaquina**

A sitamaquina **19** é um fármaco da classe das 8-aminoquinolinas, para administração oral ainda em fase de desenvolvimento, mas com grande potencial contra a leishmaniose. Este fármaco tem um tempo de meia-vida curto sendo necessário uma toma diária. Neste momento apenas se sabe que não deve ser administrado a indivíduos com deficiência enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), sendo um problema geral desta classe de fármacos.^[29]

1.3 8-Aminoquinolinas

As 8-aminoquinolinas surgiram como uma importante classe promissora para o desenvolvimento de futuros anti-protozoários (antimaláricos e antileishmaniose). A pamaquina **3** foi a primeira 8-aminoquinolina sintetizada nos laboratórios da Bayer, na Alemanha, em 1925, surgindo da modificação estrutural do azul metileno **2**. Foi o primeiro fármaco capaz de prevenir o reaparecimento da malária causada pela *P. vivax* e bloquear a transmissão da doença. A sua pouca eficácia contra a fase esquizontocida e a sua elevada toxicidade causou o seu abandono para fins terapêuticos.^[9,21,33,34]

O composto **3** foi usado como base para o desenvolvimento da primaquina **20** (Figura 8), em 1946 nos Estados Unidos da América. Esta 8-aminoquinolina tem sido utilizada para combater a malária em três frentes diferentes: (i) profilaxia contra todas as espécies da malária; (ii) terapia para prevenir a recaída em pessoas extensivamente expostas ao *P. vivax* ou ao *P. ovale* e (iii) tratamento radical em indivíduos infetados com *P. vivax* e *P. malariae*. Em regiões endêmicas este fármaco é também usado como inibidor da maturação dos gametócitos férteis, bloqueando a transmissão da doença. Outros antimaláricos desta classe como a pentaquina **21** e a isopentaquina **22** surgiram na mesma altura, mas a primaquina apresentou uma maior eficácia e um nível mais baixo de toxicidade.^[9,35]

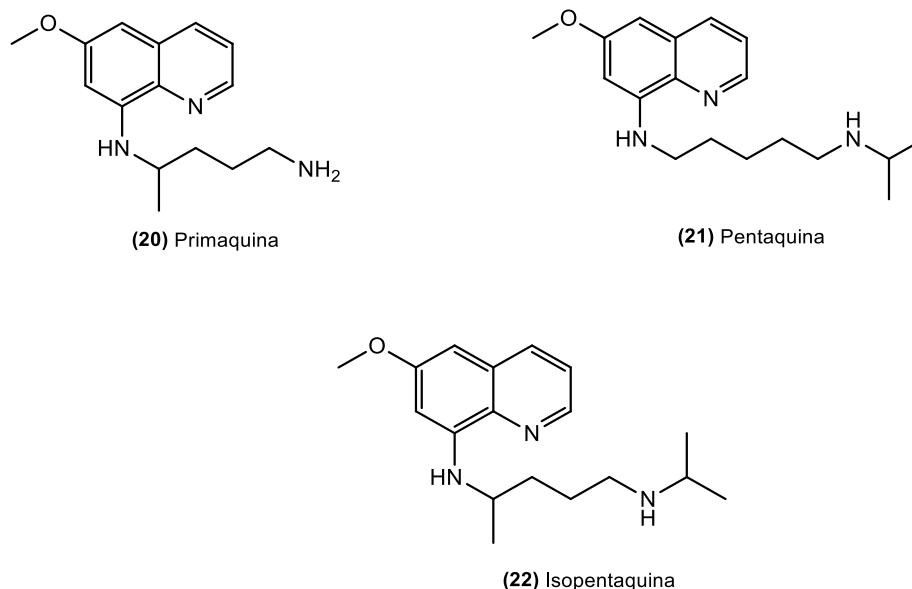


Figura 8 – Estruturas das 8-aminoquinolinas.

O tratamento prolongado (7-14 dias) com o composto **20** é essencial para uma cura total da doença. Isto deve-se à rápida metabolização do fármaco, provocando uma maior acumulação dos seus metabolitos tóxicos, sendo os principais responsáveis pelo efeito hemolítico em indivíduos com deficiência enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). No caso da malária, este fármaco deve ser co-administrado com um esquizontocida sanguíneo, pois não é eficaz contra as formas parasitárias que se encontram no interior dos eritrócitos.^[34,36]

O potencial das 8-aminoquinolinas contra a leishmaniose foi identificado na mesma altura que a primaquina **20** como antimalárico. Desde então tem havido um interesse no desenvolvimento de análogos das 8-aminoquinolinas com atividade contra os parasitas da leishmaniose.^[32]

A resistência dos parasitas da malária à primaquina em determinadas regiões, causada pela espécie *P. vivax*, reforçou a importância de desenvolver tratamentos mais eficazes.^[35]

1.3.1 Mecanismo de ação

Como referido anteriormente, o composto **20** é o único antimalárico ativo contra os gametócitos de todas as espécies, incluindo as que são resistentes a cloroquina, como o *P. falciparum* e contra todas as formas latentes hepáticas responsáveis pelas recidivas da doença, causadas pelas espécies *P. ovale* e *P. vivax*. O mecanismo exato pelo qual o composto **20** elimina as formas latentes hepáticas e os gametócitos é ainda desconhecida, mas o seu modo de ação proposto inclui, **i)** comprometimento da função mitocondrial do parasita que interfere com a função ubiquinona da cadeia respiratória e a **ii)** elevada produção de espécies reativas intracelulares que aumenta o stress oxidativo.^[17,35,37]

Durante a gametogénese ocorrem alterações morfológicas ao nível da mitocôndria do parasita. Sendo que a resistência deste aos fármacos antimaláricos e aos inibidores metabólicos aumenta com a maturação dos gametócitos. A primaquina é o único fármaco capaz de atuar na fase final da gametogénese inibindo o crescimento do parasita na fase onde o desenvolvimento requer mitocôndrias funcionais.^[35,36] O mecanismo de ação das 8-aminoquinolinas pode estar relacionado com a ação das

naftoquinonas como a atovaquona **23** (Figura 9), por inibirem o complexo citocromo bc1 da cadeia respiratória mitocondrial, imitando o substrato natural, ubiquinona, alterando o potencial da membrana mitocondrial.^[24]

Por outro lado a produção de metabolitos da primaquina altamente reativos aumenta o stress oxidativo intracelular do parasita. Esta ação oxidativa baseia-se no ciclo redox da primaquina, onde alguns dos seus metabolitos iniciam a formação de peróxidos de hidrogénio e dos derivados de quinona como principais produtos sob condições fisiológicas. A falta de mecanismos adequados capazes de eliminar a primaquina e os seus metabolitos, bem como a incapacidade de lidar com o stress oxidativo contribui para a baixa resistência do parasita à primaquina.^[35,39,40]

A tafenoquina **24** (Figura 9) é um fármaco derivado da primaquina e da pamaquina, que atuam na fase sanguínea e hepática do parasita. O seu mecanismo de ação na fase sanguínea depende da inibição da polimerização do heme por um mecanismo semelhante às 4-aminoquinolinas. No caso da sua atividade na fase hepática e gametócítica, o composto **24** atua afetando o processo mitocondrial por produção de metabolitos tóxicos.^[17]

No caso da leishmaniose o mecanismo de ação das 8-aminoquinolinas também ainda não está totalmente esclarecido, mas pensa-se que estará relacionado com a capacidade de gerar um ciclo redox dentro dos macrófagos infetados desenvolvendo stress oxidativo. A sitamaquina **19** (Figura 7) provoca alterações morfológicas no parasita, devido a interação hidrofóbica entre o anel aromático do fármaco e a membrana mitocondrial do parasita.^[32,41]

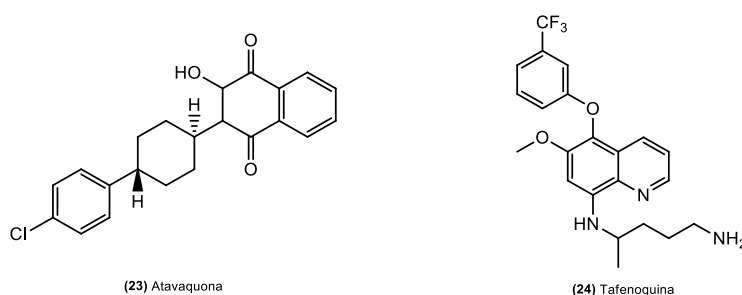


Figura 9 – Estrutura química dos compostos como atovaquona **23** e tafenoquina **24**.

1.3.2 Metabolismo

A eficácia e a toxicidade da primaquina depende da sua biotransformação. A primaquina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, acumulando-se no fígado, cérebro, pulmões e músculo-esquelético. Apenas quantidades vestigiais inalteradas destes compostos foram encontrados na urina, o que leva a crer que praticamente todo o composto é metabolizado. Atualmente sabe-se que o composto **20** interage com várias enzimas CYP, bem com a monoaminooxidases (MAO). Da sua metabolização formam-se vários metabolitos, como as carboxiprimaquina **25**, as espécies N-hidroxiladas **26**, as 6-metoxi-8-aminoquinolinas **27**, as 5-hidroxiprimaquina **28**, as espécies sulfuradas **29**, as estruturas diméricas **30** e **31** e outros metabolitos, (Figura 10).^[35]

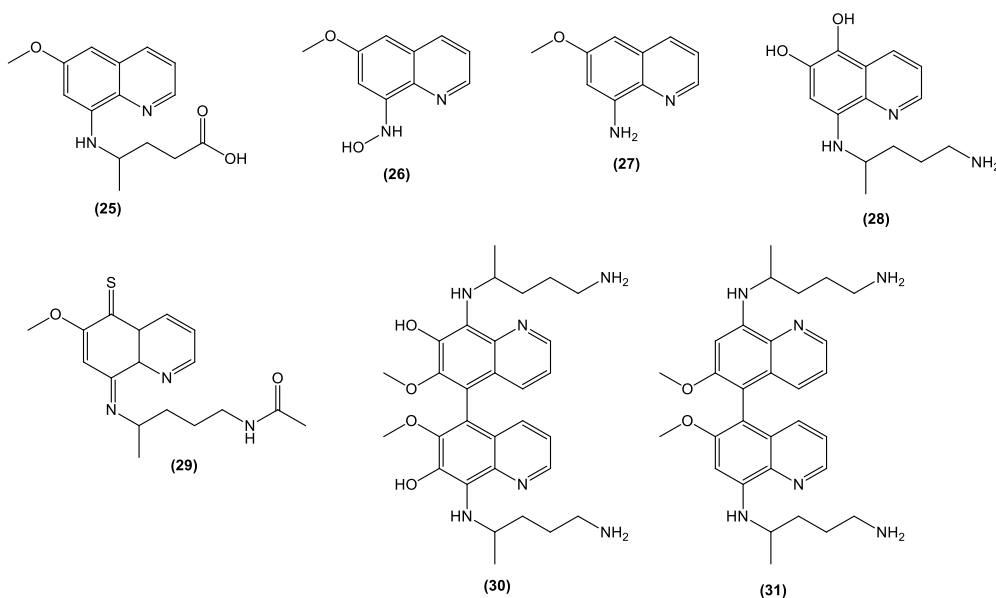


Figura 10 – Estrutura química dos principais metabolitos da primaquina. Adaptado de [35].

A rápida metabolização da primaquina em carboxiprimaquina **25** é catalisada pela MAO, ocorrendo a desaminação do PQ-aldeído. Alternativamente, a PQ-aldeído pode ser convertida a PQ-álcool por um aldeído desidrogenase.^[35]

A carboxiprimaquina é o principal metabolito da primaquina que foi identificado em ratos, macacos e humanos. Este metabolito não é detetado na urina ocorrendo possivelmente metabolização adicional antes da sua excreção. A carboxiprimaquina possui menos atividade esquizontocida que a primaquina, o que indica que o grupo amina primário na cadeia alifática é essencial para a atividade antimalárica. Contrariamente à carboxiprimaquina, as estruturas diméricas e sulfonadas, possuem maior atividade

esquizotocida e gametocítica, respetivamente, em comparação com a primaquina, por conterem na sua estrutura o grupo amina ionizável.^[35]

1.3.3 Toxicidade

A toxicidade das 8-aminoquinolinas está relacionada com a formação dos seus metabolitos ativos, assim como a concentração administrada e tempo de exposição ao fármaco. Estes fármacos podem causar danos oxidativos ao nível dos eritrócitos, levando ao aparecimento da meta-hemoglobina e da anemia hemolítica. Um dos efeitos adversos mais comum é meta-hemoglobinémia, sendo uma condição patológica resultante da acumulação anormal da meta-hemoglobina. Sendo resultado da lenta oxidação do átomo de ferro presente na hemoglobina. O ferro pode existir sob dois estados de oxidação, o Fe^{2+} e o Fe^{3+} , mas apenas o ião Fe^{2+} é capaz de ligar ao oxigénio, fazendo assim o seu transporte até aos tecidos. Neste caso a meta-hemoglobina em condições adversas como, stress oxidativo, deficiência em G6PD ou a influência de xenobióticos, favorece a formação do ião Fe^{3+} . Consequentemente a hemoglobina deixa de ter a capacidade de transportar oxigénio aos tecido do corpo, provocando sérios riscos para a saúde do indivíduo.^[35,42]

Sabe-se que a anemia hemolítica é causada pelo metabolito 5-hidroxiprimaquina **28**, e a sua gravidade está relacionada com a dose administrada e o grau de deficiência em G6PD do individuo. A glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa o passo limitante na redução da glutatona, assim em indivíduos onde a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é baixa, esta limita as defesas contra o dano oxidativo. Tal como a meta-hemoglobinémia, a atividade hemolítica ocorre devido ao stress oxidativo intra-eritrócito, sendo mediada por metabolitos redox-ativos. Segundo, Browman et al., o metabolito **28** não está associado a peroxidação lipídica nem a alteração do fosfatidilserina, apesar de formar espécies reativas de oxigénio (ROS). Na hemoglobina, as ROS, formam radicais altamente ativos que provocam danos na proteína do citoesqueleto, sob a forma de aductos de hemoglobina ligados a dissulfuretos, levando ao rompimento e rápida remoção dos eritrócitos afetados.^[35,43]

Outro efeito secundário associado às 8-aminoquinolinas é o desconforto abdominal, que ocorre quando a primaquina é tomada em jejum. A administração de primaquina em doses de 15mg é tolerável, quando as doses são mais elevadas observam-se algumas queixas. Não são registadas queixas em indivíduos que se tenham alimentado antes de

receberem a dose de fármaco, mesmo em doses elevadas. Por outro lado, observou-se que a ingestão de alimentos aumenta a biodisponibilidade da primaquina, levando eventualmente a uma maior eficácia antimalárica.^[35,44]

1.4 Endoperóxidos

Após as várias tentativas para erradicar a malária, em 1960 a doença reapareceu em grande parte devido ao aparecimento de parasitas resistentes aos fármacos usados, sendo necessário desenvolver novos fármacos capazes de combater as espécies resistentes. Em 1971, surge a descoberta da Qinghaosu (artemisinina **11**) o princípio ativo da *Artemisia annua*, uma planta muito usada na medicina tradicional chinesa, para tratamento de febres altas. A artemisinina é um 1,2,4-trioxano tetracíclico que contém uma ponte de endoperóxido, sendo fundamental para a sua atividade antimalárica. Este composto natural revelou-se ativo contra a fase eritrócita assexuada em todas espécies de parasitas da malária. A utilização da artemisinina tem sido limitada em parte devido ao seu tempo de meia-vida curto e à baixa biodisponibilidade oral. A baixa biodisponibilidade oral pode estar relacionada com o elevado metabolismo de primeira passagem e/ou com a baixa solubilidade no trato gastrointestinal. As limitações da artemisinina são ao nível da química (disponibilidade, pureza e custo), bio-farmacêutica (baixa biodisponibilidade e farmacocinética limitada) e tratamento (não-conformidade com o regime de repetidas recaídas), estas questões limitam o seu potencial terapêutico.^[45,46,47,48,49]

Devido a estas limitações, existiu a necessidade de desenvolver novos peróxidos antimaláricos com vantagens sobre a artemisinina. Surgiu assim a primeira série de derivados semi-sintéticos da artemisinina, como a di-hidroartemisinina **32**, artemeter **33** e artesunato **34** (Figura 11). Estes compostos foram sintetizados para melhorar a solubilidade e a atividade farmacológica do composto natural.^[45,46,47]

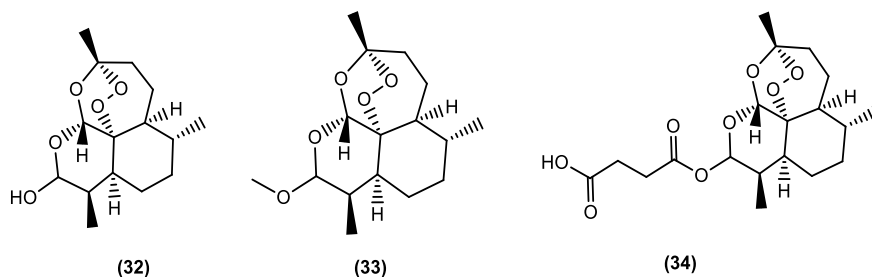


Figura 11 – Derivados semi-sintéticos da artemisinina, di-hidroartemisinina (DHA) **(32)**, artemeter **(33)** e artesunato **(34)**.

Estudos revelaram que o composto **32** é duas vezes mais ativo em comparação com a artemisinina, apesar de ter uma baixa disponibilidade oral e possuir uma elevada

Conclui-se que substituintes volumosos na posição 1 e 10 no composto **39** fazem diminuir a sua atividade antimalárica. Estudos recentes demonstram que a substituição de um ciclo-hexano por um derivado do adamantano **40** possui uma notável atividade antimalárica. Paula et al., observaram que se o derivado **40** tivesse um grupo amina ligado ao anel ciclo-hexano, a ligação tetraoxano – heme é favorecida, o que pode explicar a sua alta atividade antimalárica.^[50]

1.4.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da artemisinina ainda não está completamente esclarecido, mas pensa-se que um dos principais alvos é a interrupção do processo de formação da hemozoína. Sabe-se que a atividade antimalárica destes compostos depende, da sua ativação pelo Fe^{2+} , através da clivagem da ponte endoperóxida e posterior alquilação de vários alvos intracelulares do parasita, levando a sua morte (Figura 14).^[47,51,52]

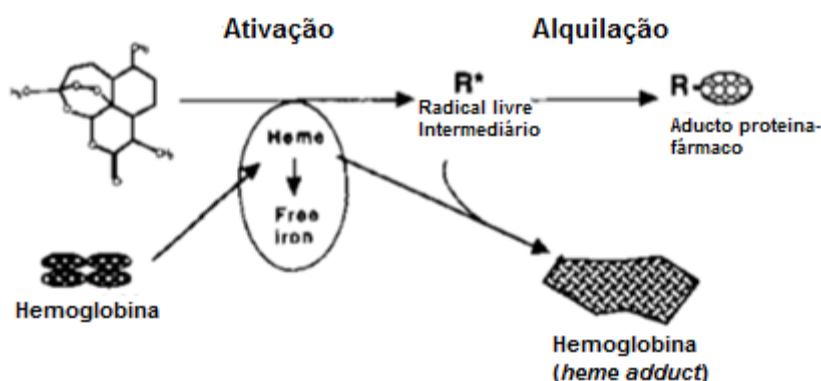


Figura 14 - Representação esquemática do modo de atuação dos compostos endoperóxidos.

Adaptado de [53].

À semelhança do que acontece com a artemisinina, acredita-se que o mecanismo de ação dos tetraoxanos ocorre através da ativação do $\text{Fe}(\text{II})$ presente na heme, formando espécies radicais tóxicos para o parasita. A cisão inicial da ligação peroxidica do tetraoxano resulta da coordenação do $\text{Fe}(\text{II})$ com o oxigénio que possui um menor impedimento estereoquímico. Desta cisão surge a formação de um radical centrado no átomo de oxigénio que sofre um rearranjo originando um radical centrado no átomo de carbono. Para este processo foram propostas duas vias (Figura 15).^[48,54]

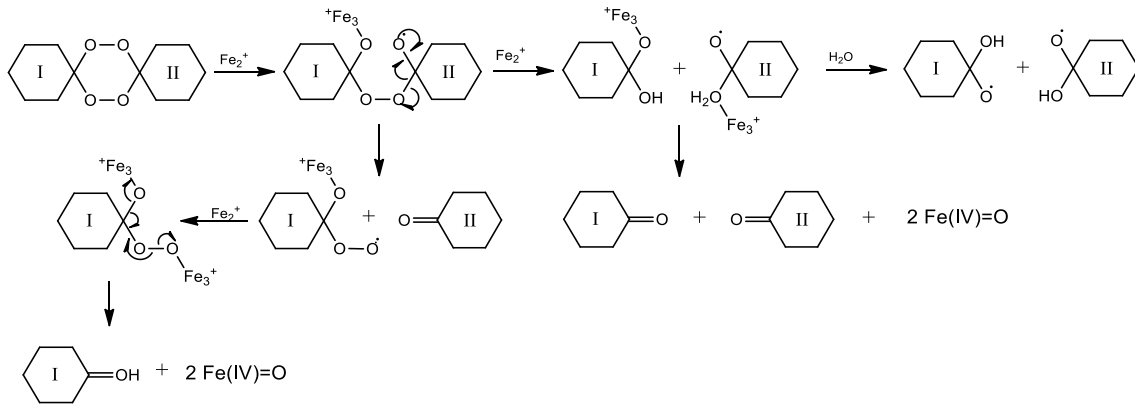


Figura 15 – Mecanismo proposto para a reação de Fe (II) com o tetraoxano. Adaptado de [48,50,52]

Os radicais livres formados da ativação dos fármacos inibem os principais processos metabólicos, tais como glicose, ácido nucleico e síntese de proteínas, provocando a morte do parasita. Os radicais RO \cdot são capazes de provocar hiperperoxidação membranar dos eritrócitos, vacúolo alimentar bem como atacar outras biomoléculas vitais.^[47,48,51,55]

1.4.2 Toxicidade

In vitro, a artemisinina e os seus derivados são tóxicos para as células neurais através de um mecanismo semelhante ao mecanismo usado contra a malária. No entanto, quando administrados estes fármacos raramente possuem efeitos adversos, podendo ser também administrados em mulheres grávidas. Ocorreram casos de neurotoxicidade em pacientes em que foram administradas doses muito elevadas.^[55]

1.5 Compostos híbridos

Atualmente, a terapia de combinação à base de artemisinina (ACT) é recomendada pela OMS para o tratamento da malária. No entanto, o custo dessas combinações ainda é um problema. O atual desafio é desenvolver novos fármacos acessíveis e capazes de evitar o aparecimento de estirpes resistentes, tanto para a doença da malária como para a leishmaniose. Recentemente através do design racional de fármacos, desenvolveram-se compostos híbridos com diferentes modos de ação capazes de combater as estirpes multirresistentes e melhorar a aceitação por parte do paciente.^[56,57]

Um composto híbrido é definido como uma entidade química que contém pelo menos dois farmacóforos unidos através de uma ligação covalente que podem ter funções biológicas diferentes. Os farmacóforos podem estar diretamente, ligados por uma ligação covalente estável (amina ou amida), ou através de uma ligação que pode incluir uma função específica (unidade de solubilização) para melhorar a biodisponibilidade do composto final. O modo de atuação dos compostos híbridos pode dividir-se em três formas diferentes: **i)** ambos os farmacóforos da molécula híbrida interagem com o mesmo alvo terapêutico; **ii)** os farmacóforos das moléculas híbridas atuam de forma independente nos seus respectivos alvos terapêuticos; **iii)** ambos os farmacóforos das moléculas híbridas atuam ao mesmo tempo cada um no seu respectivo alvo terapêutico. Estudos já realizados em alguns fármacos híbridos demonstram que estes têm uma boa capacidade antimalárica e baixa toxicidade.^[56,58,59,60]

O *linker* é uma estrutura necessária para que o composto híbrido possa ser o mais simples possível, pois o composto é estruturalmente maior do que os fármacos originais. Por isso, dependendo do tipo de ligação os compostos híbridos podem ser classificados da seguinte forma^[56,58]:

- o **Híbrido conjugado** – estrutura molecular que possui os farmacóforos separados por um grupo ligante que não se encontra presente nos fármacos individuais.
- o **Híbrido conjugado clivável** – estrutura molecular que possui um ligando que é metabolizado para libertar os dois fármacos que atuam de forma independente cada alvo de ação.
- o **Híbridos parcialmente fundidos** – estrutura molecular onde os ligantes possuem um tamanho tão reduzido que os farmacóforos se tocam.
- o **Híbridos fundidos** – estruturas moleculares onde os farmacóforos se encontram fundidos tirando partido comum das estruturas iniciais, tornando-se moléculas mais pequenas e mais simples.

A aplicação do conceito de compostos híbridos tanto para a malária como para a leishmaniose é um desafio devido: **i)** à complexidade do ciclo de vida do parasita, **ii)** o incompleto esclarecimento da biologia do parasita, e **iii)** ao número de alvos terapêuticos válidos em todo o ciclo de vida, que é reduzido.^[56]

A quinazolinona é um composto natural muito utilizado, devido à sua vasta gama de atividades biológicas, incluído antitumoral, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, antifúngico antimalárico, entre outros. No estudo realizado por Sharma, et al^[61], foram descobertos três compostos híbridos com um elevado potencial contra os amastigotas da leishmânia (Compostos **41**, Figura 16). No que diz respeito a malária e segundo o estudo realizado por Oliveira et al^[52], o composto híbrido de tetraoxano-pirimidina nitrilo apresenta uma elevada atividade contra a fase hepática e sanguínea do parasita da malária (Composto **42**, Figura 16).

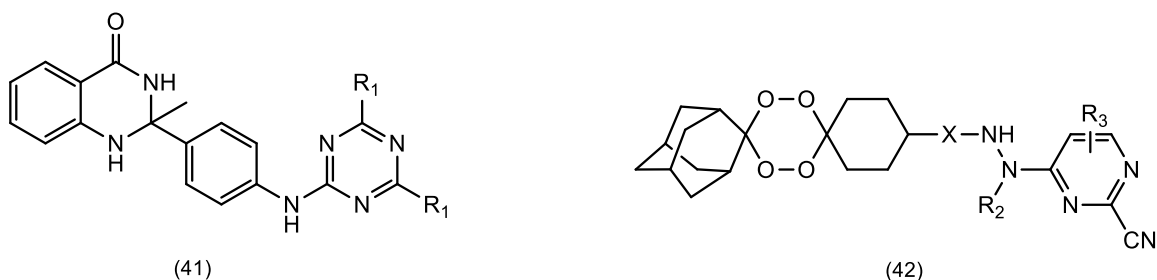


Figura 16 – Compostos híbridos ativos contra a fase intracelular da leishmaniose (**41**) e ativo contra a fase hepática e sanguínea da malária (**42**).

1.6 Âmbito da tese

De forma a evitar o aparecimento de espécies resistentes aos fármacos, a OMS recomenda a utilização de terapias combinadas para a doença da malária e leishmaniose. De uma maneira geral os fármacos em uso clínico apresentam problemas relacionados com o custo, dificuldade de administração, toxicidade elevada e resistência aos fármacos, sendo apenas ativos na sua maioria contra uma ou duas fases do ciclo de vida do parasita. Atualmente, o grande desafio é desenvolver novos fármacos acessíveis capazes de impedir o aparecimento de estirpes resistentes e com elevado potencial contra a doença.^[56,57]

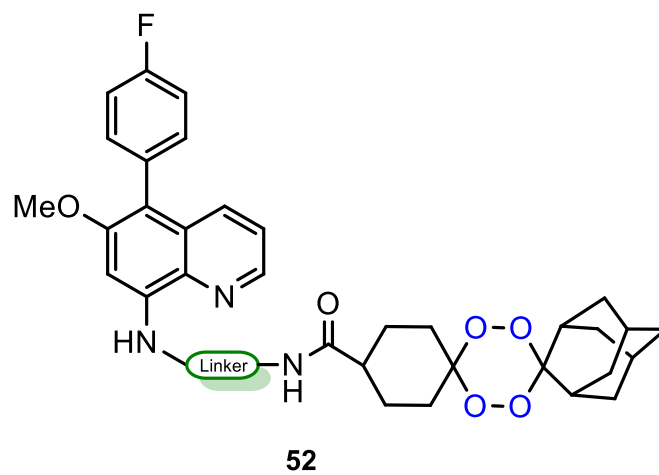
Os compostos híbridos, como referido anteriormente, são entidades químicas capazes de atuar em diferentes alvos terapêuticos ou em diferentes locais de ação no mesmo alvo terapêutico, sendo ferramentas perfeitas para enfrentar este desafio. No caso da malária os compostos híbridos são desenvolvidos para atuarem não só nas formas parasitárias responsáveis pela infeção dos eritrócitos como atuarem de igual modo sobre as formas infecciosas dos hepatócitos.^[60]

A primaquina (**20**, Figura 8) é um esquizontocida tecidular, capaz de eliminar todas as formas hepáticas do *Plasmodium* e o único capaz de atuar contra os hipnozoítos das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando as recaídas. Para além disso possui uma elevada atividade gametocitocida, atuando nas formas sexuadas do parasita impedindo a transmissão da infeção ao mosquito vetor. No parasita da *Leishmania* a primaquina provoca stress oxidativo dentro dos macrófagos infetados, causando alterações na morfologia do parasita, evitando a sua replicação.^[32,60]

Os tetraoxanos (**40**, Figura 13) são potentes esquizontocidas sanguíneos totalmente sintéticos derivados da artemisinina. Para além de atuarem contra as formas sanguíneas do *Plasmodium*, estes fármacos impedem o desenvolvimento dos gametócitos, no bloqueio da transmissão da doença. Porém este agente antimalárico não é ativo nas formas hepáticas do ciclo de vida do parasita.^[54,60]

Assim sendo, o objetivo deste trabalho prende-se com o desenvolvimento de novas moléculas híbridas (**52**) constituídas pelos farmacóforos 8-aminoquinolina e 1,2,4,5-tetraoxano, variando o comprimento do *linker* entre eles. De modo a serem ativos, respetivamente, quer na fase hepática e sanguínea, quer na fase intarcelular dos ciclos infecciosos da malária e leishmaniose, mas também bloqueadores da metabolização da 8-aminoquinolina.

Depois de obtidos os compostos estudou-se a sua estabilidade enzimática em microsomas de fígado de rato em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C). Finalmente foi realizado um screening biológico de modo a determinar a atividade dos compostos na malária e na leishmaniose.



Capítulo 2

Síntese e caracterização dos compostos híbridos

Foram sintetizados novos compostos híbridos baseados nos farmacóforos 1,2,4,5-tetraoxano e 8-aminoquinolina, com o objetivo de atuarem na fase sanguínea e hepática no ciclo de vida do parasita da malária. Alterou-se o comprimento da cadeia lateral entre os dois farmacóforos, mantendo o substituinte 5-(4-fluorofenilo) na 8-aminoquinolina, para que se pudesse estudar a influência do tamanho da cadeia no que diz respeito a sua atividade e estabilidade.

A retrossíntese dos compostos híbridos **52a-c** é apresentada na Figura 17, bem como o esquema reacional e os intermediários envolvidos no processo na Figura 18.

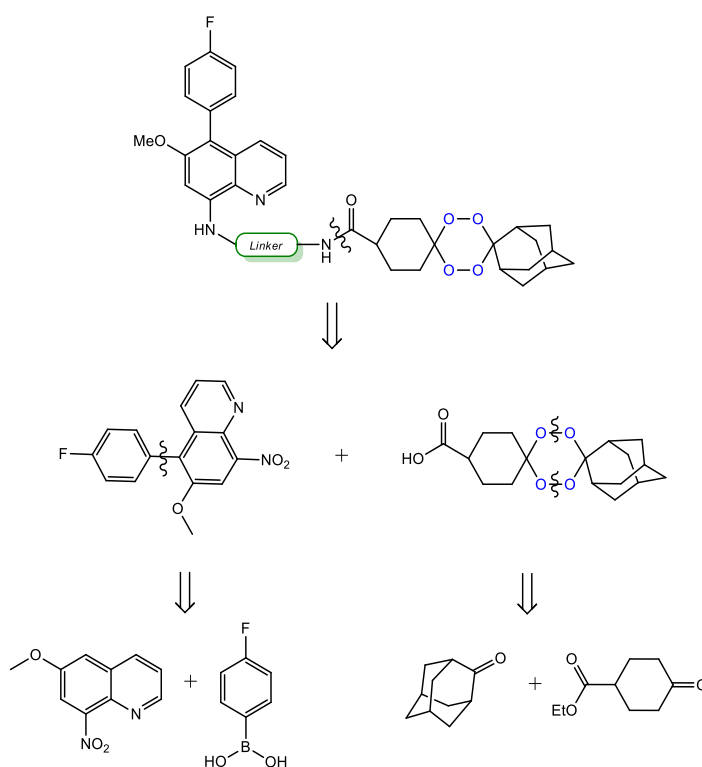


Figura 17 – Retrossíntese dos compostos híbridos tetraoxano-8-aminoquinolina com variação da cadeia lateral.

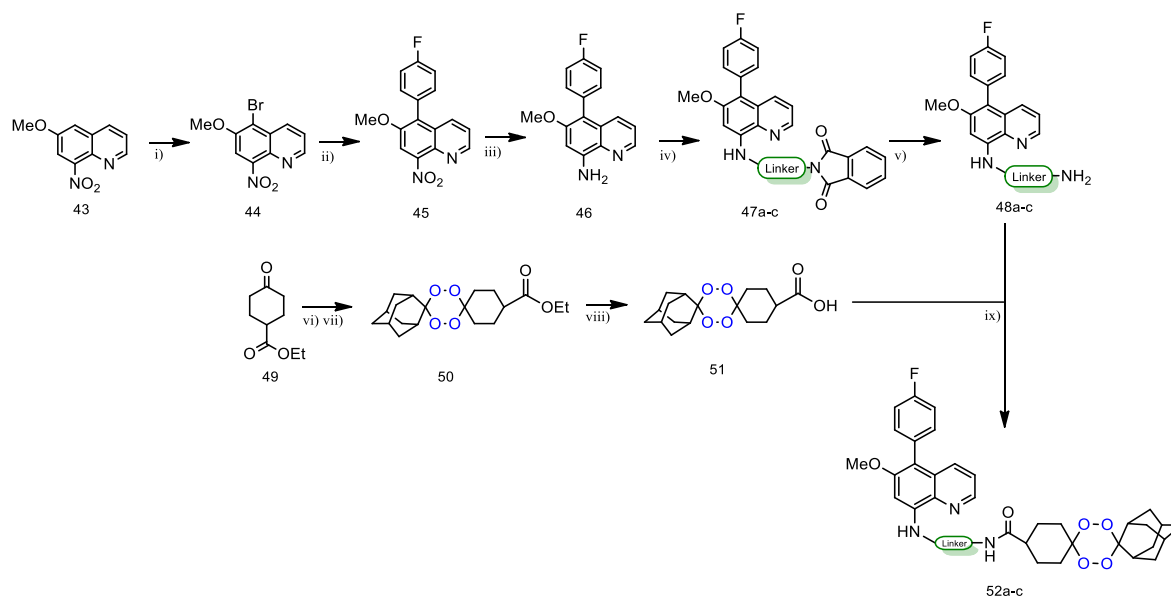


Figura 18 – Síntese dos compostos híbridos. Condições: i) Br_2 , Fe, CaCO_3 , H_2O , CHCl_3 , refluxo; ii) PPh_3 , TBAB, Na_2CO_3 (3M), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Ácido 4-fluorofenil borônico, Dimetoxietano, refluxo; iii) SnCl_2 , Sn, HCl 37%, 0°C ; iv) Et_3N , ftalimida, 120°C ; v) EtOH, $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; refluxo; vi) HCO_2H , ACN, H_2O_2 50%; vii) Re_2O_7 , DCM, 2-Adamantanona, t.a; viii) NaOH 10M, MeOH, 80°C ; ix) Et_3N , DCM, TBTU.

2.1 Síntese do derivado bromado

A halogenação de compostos aromáticos desativados envolve frequentemente condições reacionais severas. Sendo a halogenação eletrofílica aromática e a reação de *Sandmeyer/Balz–Schieman*, os métodos mais utilizados para introduzir átomos de halogênio no núcleo aromático.^[62] Neste trabalho para introduzir um átomo de bromo na posição 5 do composto 6-metoxi-8-nitroquinolina **43**, foi utilizado o processo descrito por Werble et al.^[63], onde se utilizou FeBr_3 como catalisador (Figura 19).

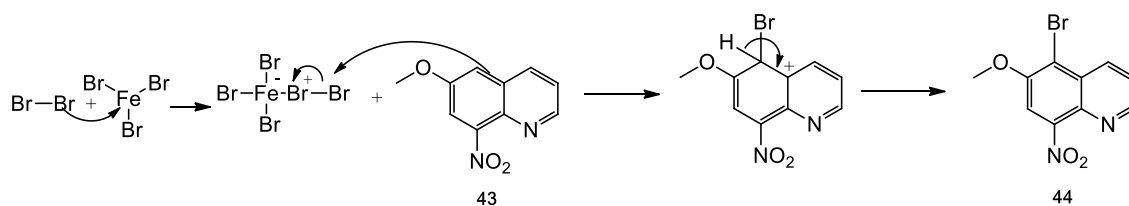


Figura 19: Mecanismo de reação para a síntese do composto **44**.

O composto **44** foi obtido com um rendimento de 63% e a sua caracterização foi efetuada por ponto de fusão, ^1H RMN (Figura 20).

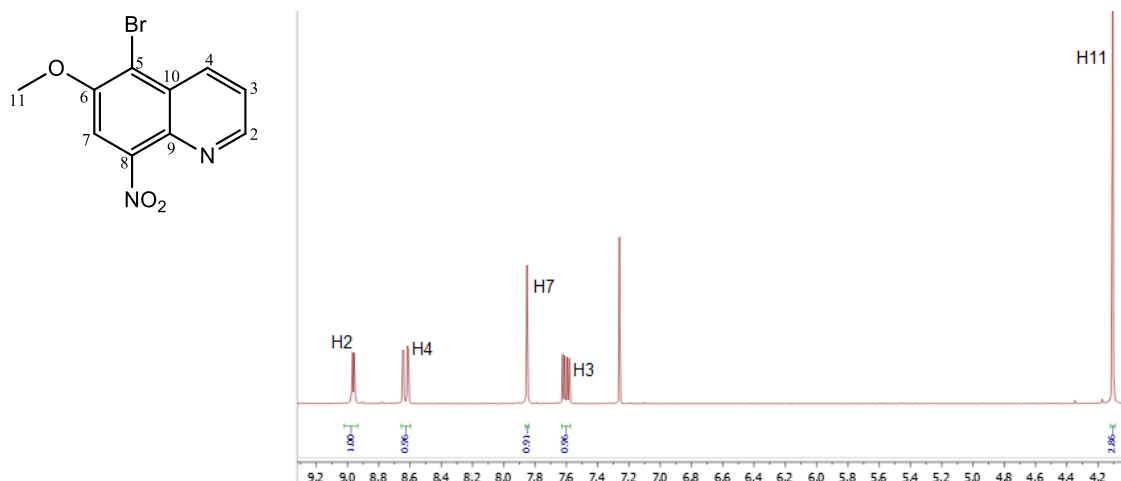


Figura 20: Espectro de ^1H RMN do composto **44**.

Através da análise do espectro de ^1H RMN do composto **44** (Figura 20) podem-se observar cinco sinais correspondentes a cinco tipos de prótons. Na posição C2 encontra-se o próton mais desblindado (8.96ppm) devido à proximidade do átomo de azoto que altera o seu comportamento magnético. O sinal deste próton corresponde a um duplo duplete com constantes de acoplamento $J = 4.1\text{Hz}$ e $J = 1.6\text{Hz}$, devido ao acoplamento em *orto* com o próton C3 e em *meta* com o próton em C4, respetivamente. Assim se verifica que a constante de acoplamento em orto é inferior ao descrito na literatura^[39] ($J = 6\text{-}10\text{Hz}$) devido a influência do átomo de azoto. Os prótons da posição C3 (7.60ppm) e C4 (8.63ppm) correspondem a dois duplos dupletos por estarem acoplados entre si ($J = 8.8\text{Hz}$) e com o próton na posição C2 ($J = 4.1\text{Hz}$ e $J = 1.6\text{Hz}$ respetivamente). O próton da posição C7 apresenta-se com um singuleto (7.85ppm) devido às posições C6 e C8 não possuírem hidrogénios. Por último pode-se observar que os 3 prótons na posição C11 estão mais blindados (4.11ppm) e apresentam-se como um singuleto.

2.2 Síntese do 5-(fluorfenilo)-6-metoxi-8-nitroquinolina

A reação de acoplamento de um haleto de arilo e um grupo de arilo catalisado por um complexo de paládio e fosfinas chama-se reação de Suzuki – Miyaura.^[64]

O ciclo catalítico da reação de Suzuki envolve três processos; i) adição oxidativa, ii) transmetalção e iii) eliminação redutiva com obtenção final de um composto biarilo e a regeneração da espécie reativa de paládio (Figura 21). A adição oxidativa e eliminação redutiva são processos fundamentalmente comuns às reações de acoplamento, no entanto a transmetalção pensa-se que depende essencialmente das condições da reação.^[65,66]

Para se obter o composto **45** realizou-se um acoplamento do composto **44** com ácido 4-fluorofenil borónico utilizando a reação de Suzuki descrita por Shiraki et al.^[68]

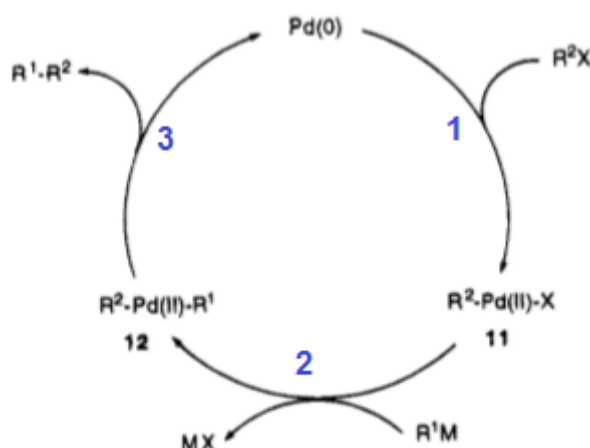


Figura 21 – Ciclo catalítico da reação de Suzuki. Mecanismo geral para a síntese do composto. X= Br, XM= ácido flourofenil borónico R1= fluorofenil. **1**- Adição oxidativa; **2**- Transmetalção; **3**- Eliminação redutiva.

O composto **45**, após purificação por cromatografia em coluna, foi obtido com um rendimento de 61% e a sua caracterização foi efetuada por ponto de fusão e ¹H RMN (Figura 22).

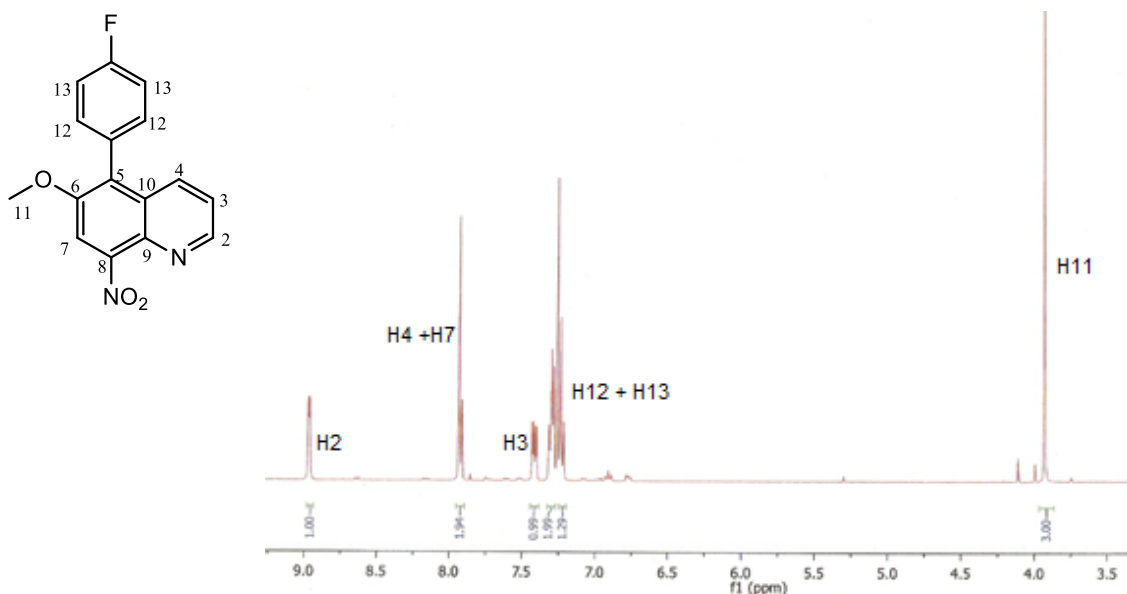


Figura 22 - Espectro de ^1H RMN do composto 45.

Através do espectro de ^1H RMN observa-se que a introdução de um substituinte arilo na posição 5 do anel quinolínico altera o comportamento magnético dos prótons das posições C3, C4, C7 e C11. Verifica-se que os prótons das posições C4, C3 e C11 ficam mais blindados, enquanto que o próton da posição C7 fica mais desblindado, devendo-se ao efeito de ressonância do átomo de flúor do anel benzênico introduzido. O sinal dos prótons C4 e C7 apresentam-se como um multiplete (7.91ppm). Os sinais dos prótons do arilo introduzido (C12 e C13) surgem a 7,26ppm. O próton em C12 aparece mais desblindado (em relação aos prótons do arilo introduzido), apresentando-se como um duplete de dupletos, pois acopla com os prótons C4 ($J = 8,3$ Hz) e com os prótons em C13 ($J = 5,9$ Hz).

2.3 Síntese do derivado amina

Existem várias maneiras de reduzir o grupo nitro, sendo os métodos mais utilizados a hidrogenação catalítica ou o uso de metais como ferro, zinco, estanho ou sais metálicos como SnCl_2 em soluções ácidas.^[69] A técnica usada neste trabalho para obter o composto 46 baseia-se na transferência eletrônica de um ião estanho para o grupo nitro, formando um radical livre que em meio ácido é protonado, ocorrendo de uma forma geral a redução de seis electrões (Figura 23). O método utilizado para reduzir o grupo nitro encontra-se descrito por *Portela et al.*^[68]

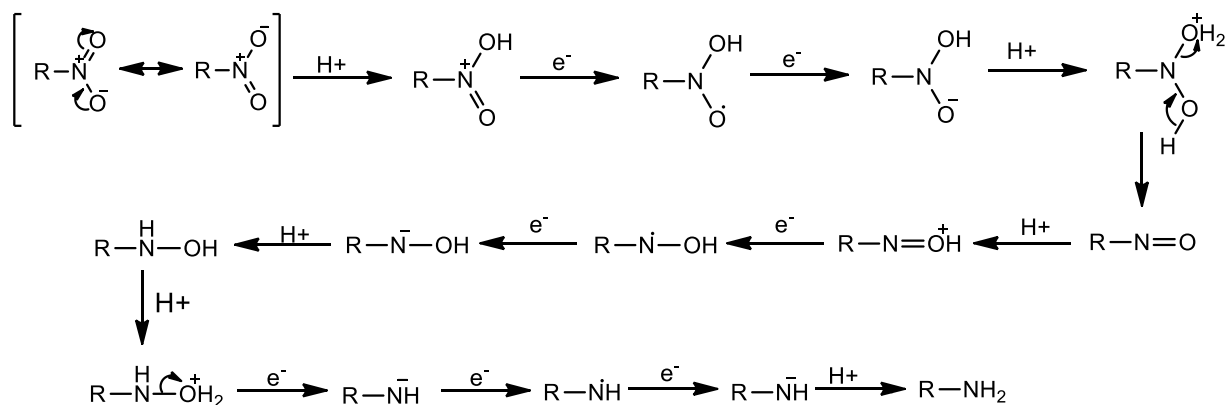


Figura 23 – Reação do grupo nitro a amina.

Após purificação por cromatografia em coluna do composto **46** obteve-se um rendimento de 93% e a sua caracterização foi efetuada por ^1H RMN (Figura 24).

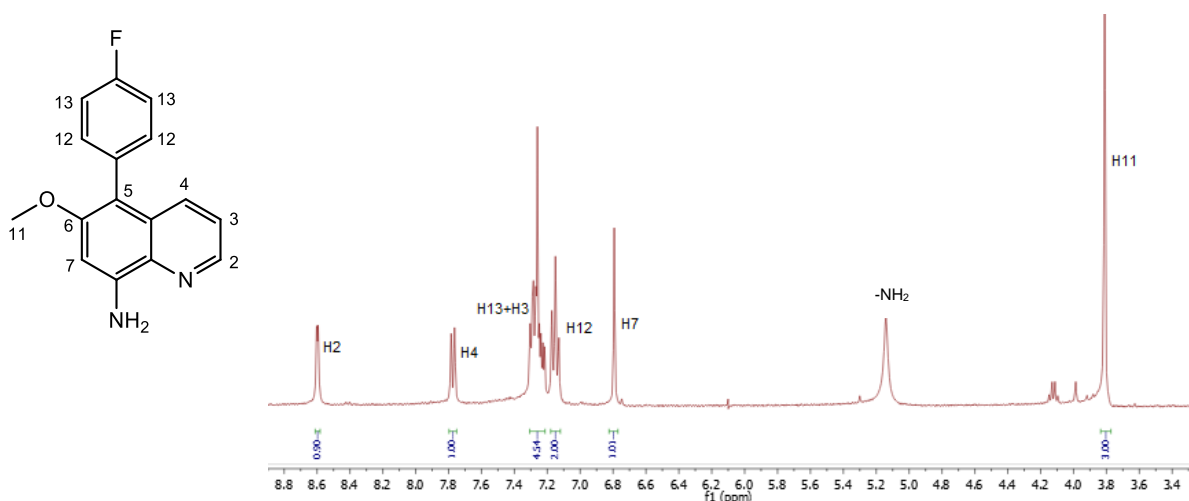


Figura 24 - Espectro de ^1H RMN do composto **46**.

Através do espectro de ^1H RMN observa-se que a redução do grupo nitro provocou alterações no comportamento magnético de todos os prótons, ficando mais blindados. Os prótons das posições C3, C7, C12 e C13 apresentam um desvio mais significativo. O próton na posição C3 (7,27ppm) apresenta-se mais blindado devido ao efeito do grupo arilo introduzido anteriormente. O próton em C7 fica mais blindado devido ao efeito electrodador do grupo amina, apresentando um desvio químico para campos mais

baixos. Ainda é possível identificar os prótons do grupo amina que aparecem a 5,14 ppm. Este sinal é um singuleto largo, característico das aminas aromáticas.

2.4 Proteção da cadeia lateral alquílica

Na obtenção de aminas primárias a partir da síntese de Gabriel estão envolvidos dois passos: **i)** síntese de ftalimidas *N*-substituídas a partir de haloalcano e **ii)** a síntese de aminas primárias a partir de ftalimidas *N*-substituídas.^[70]

Na síntese de ftalimidas *N*-substituída, a ftalimida por ser muito ácida inicialmente é convertida no sal de potássio usando hidróxido de potássio (Figura 25).

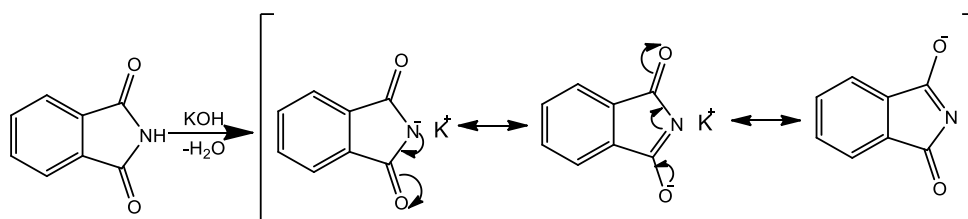


Figura 25 – Reação da conversão da ftalimida no respectivo sal de potássio.

Posteriormente o íon ftalimida, sendo um nucleófilo forte, reage com um haleto de alquila através de um mecanismo S_N2 para formar uma ftalimida *N*-substituída (Figura 26).

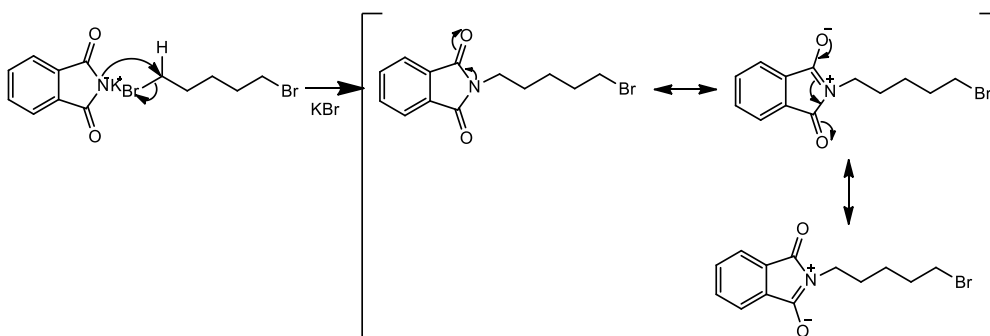


Figura 26 – Mecanismo proposto para a síntese do composto 53.

O método utilizado para realizar a proteção da cadeia lateral alquílica, encontra-se descrito por *Werble et al.*^[63]

O composto **53** foi obtido com um rendimento de 90% e a sua caracterização foi efetuada por ¹H RMN (Figura 27).

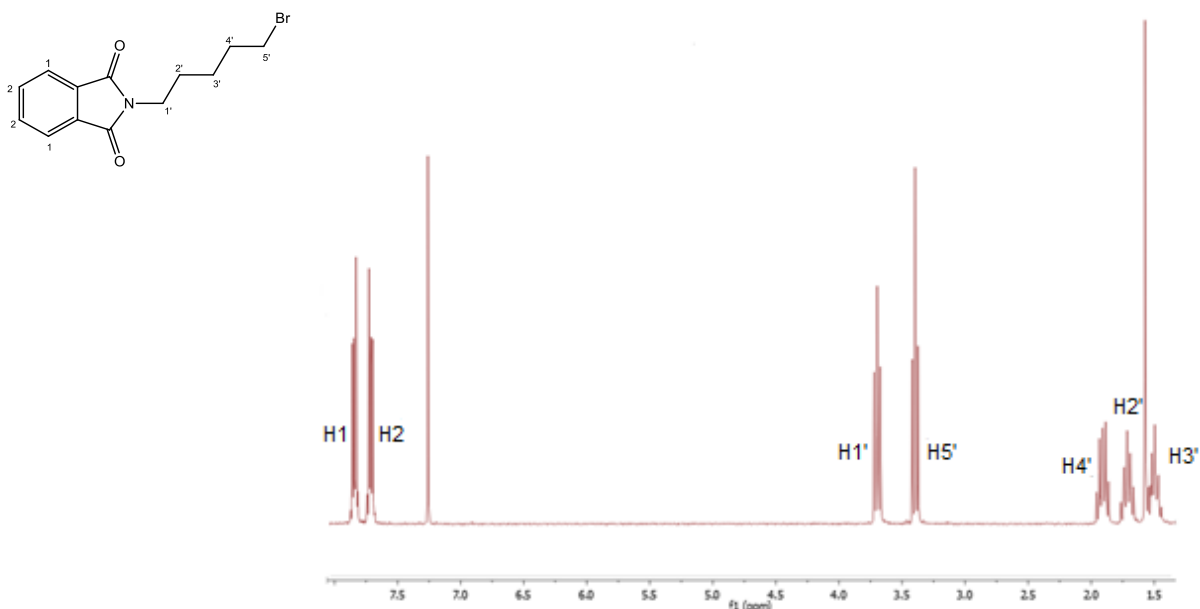


Figura 27 – Espetro de ¹H RMN do composto **53**.

Ao analisar o espectro de ¹H RMN do composto **53** podem-se observar sete sinais diferentes. Na zona dos aromáticos, encontram-se dois sinais correspondentes aos prótons em C1 e C2 a 7.84 e 7.71ppm respetivamente. O próton C1 aparece mais desblindado devido à influência dos grupos carbonilo, apresentando-se como um duplo duplete com constante de acoplamento de $J = 5.5\text{Hz}$ e $J = 3.0\text{Hz}$. A campo mais alto observam-se os prótons C1' (3.70ppm) e C5' (3.40ppm) que se encontram mais desblindados comparativamente aos restantes prótons da cadeia linear, devido à proximidade dos grupos carbonilo e do bromo. Estes apresentam-se como tripletos com constante de acoplamento de $J = 7.2\text{Hz}$ e $J = 6.8\text{Hz}$ respetivamente. Os prótons C2' (1.71ppm) e C4' (1.91ppm) apresentam-se como multipletos devido as interações com os seus vizinhos. Os prótons C3' apresenta-se também como multipletos, sendo o mais blindado surgindo a 1,51ppm.

2.5 Acoplamento da cadeia lateral à 8-aminoquinolina

Para sintetizar os compostos **47a-c** procedeu-se ao acoplamento do composto **46** com diferentes cadeias laterais (Figura 28) de acordo com o método descrito por Jain et al.^[69]

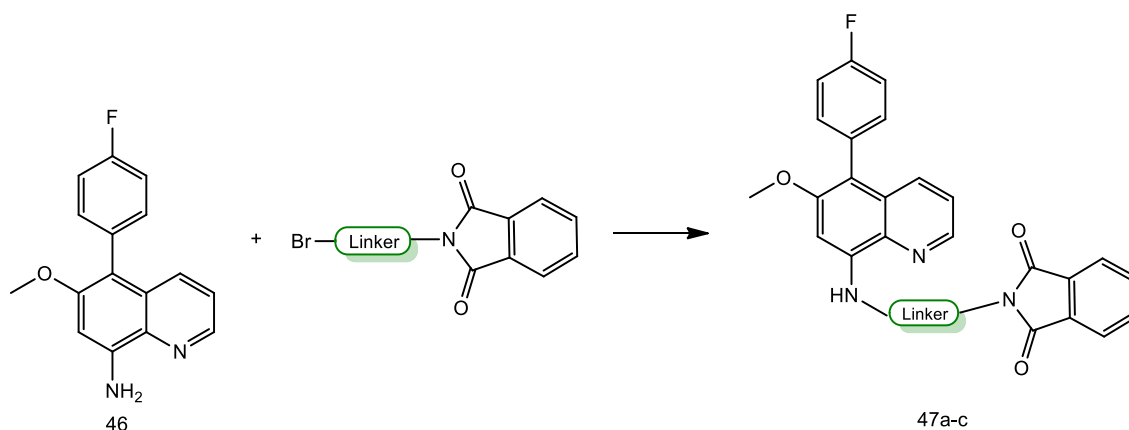


Figura 28 – Esquema reacional do acoplamento da cadeia lateral para obtenção dos compostos **47a-c**.

O composto **46** atua como nucleófilo reagindo com a ftalimida *N*-substituída (com diferentes *linker*) através de um mecanismo S_N2 para dar origem aos compostos **47a-c** (Figura 29).

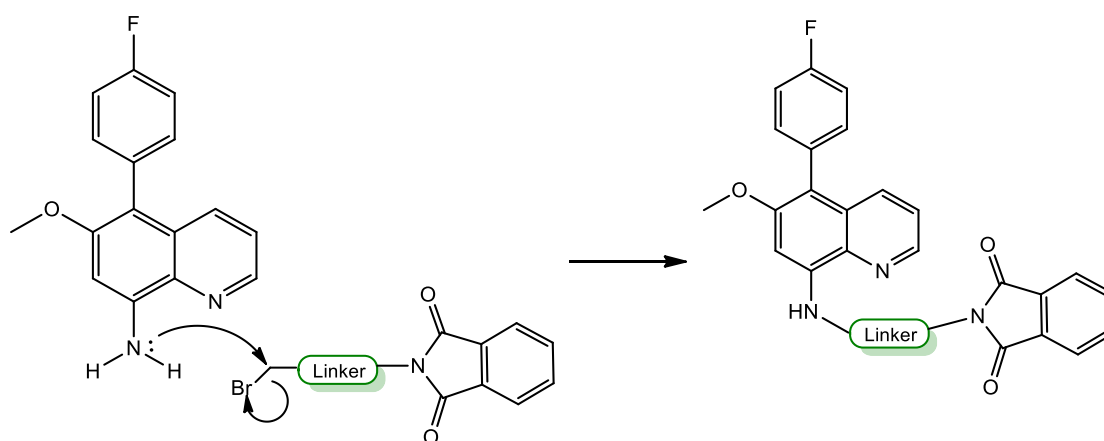


Figura 29 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção dos compostos **47a-c**.

Após purificação dos compostos **47a-c** por cromatografia em coluna, obtiveram-se os seguintes rendimentos descritos na Tabela 5. A caracterização dos diversos compostos foi efetuada por ^1H RMN, apresentando-se como exemplo o espectro do composto **47a** (Figura 30). A análise dos espectros de ^1H RMN encontra-se resumida na Tabela 6.

Tabela 5 – Rendimento das reações de acoplamento da cadeia lateral ao derivado 8-aminoquinolina

Compostos	Linker (n)	Rendimentos
49a	3	91%
49b	4	84%
49c	5	80%

n= número de carbonos da cadeia lateral

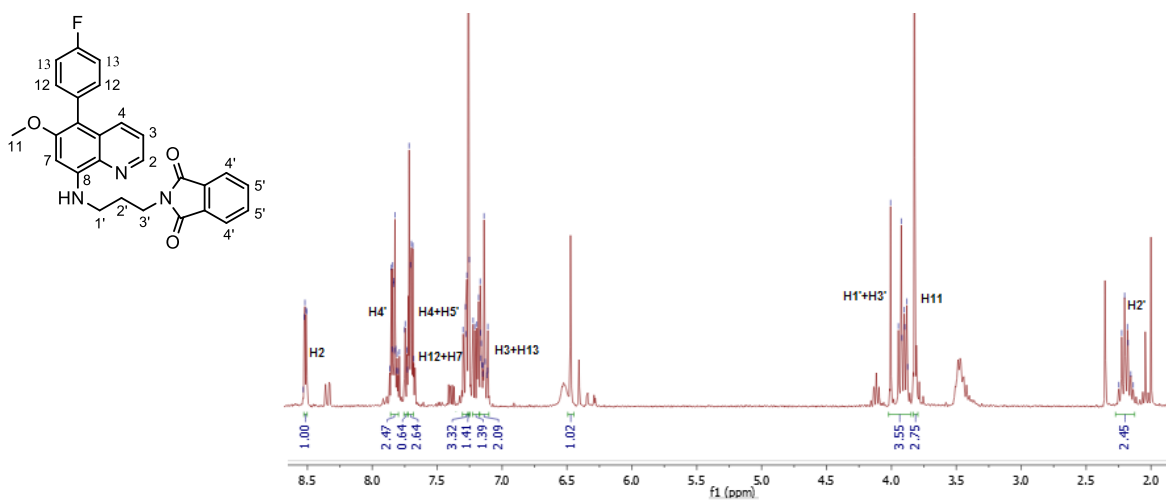


Figura 30 – Espectro de ^1H RMN do composto **47a**.

Ao observar o espectro de ^1H RMN do composto **47a** verifica-se que ao introduzir a cadeia lateral linear não altera significativamente o comportamento magnético dos prótons.

Tabela 6 – Desvio químico dos prótons dos compostos 47a-c.

Composto	Estrutura	δ (ppm)	H	Tipo de sinal	J (Hz)
47a		8,51	2	Duplo duplete	4,1;1,6
		7,83	4'	Multiplete	-
		7,70	5'	Multiplete	-
			4		
		726	12	Multiplete	-
			7		
		7,20	3	Duplo duplete	8,6;4,1
		7,14	13	Multiplete	-
		3,93	1'	Multiplete	-
3'					
3,82	11	Singuleto	-		
2,19	2'	Multiplete	-		
47b		8,59	2	Duplo duplete	4,2-1,7
		8,08	7	Singuleto	-
		7,95	5'	Duplo duplete	8,3; 1,7
			4		
		7,77	6'	Multiplete	-
			4		
		7,32	3	Duplo duplete	8,3;4,2
		7,13	12	Multiplete	-
		6,93	13	Multiplete	-
		3,88	11	Singuleto	-
		3,41	1'	Duplete	6,1
3,34	4'	Duplete	8,4		
	3'				
2,05	2'	Multiplete	-		
	2'				
47c		8,52	2	Multiplete	-
		8,37	4	Duplo duplete	8,6;1,6
		7,84	6'	Multiplete	-
			7'		
		7,70	12	Multiplete	-
			13		
		7,41	3	Duplo duplete	8,6; 4,2
		6,40	7	Singuleto	-
		4,02	11	Singuleto	-
		3,73	5'	Multiplete	-
			1'		
1,61	4'	Multiplete	-		
	2'				
1,42	3'	Multiplete	-		

2.6 Reação de desproteção da amina primária

O segundo passo da síntese de Gabriel é a síntese de aminas primárias que resultam da desproteção dos compostos **47**. Esta desproteção pode ser realizada tanto por hidrólise como catálise ácido-base ou hidrazinólise (método de Ing-Manske).^[70] Neste trabalho o método utilizado encontra-se descrito por Jain et al^[69], onde a ftalimida *N*-substituída reage com a hidrazina em etanol, sob refluxo, obtendo-se o composto **48a-c** e ftalimida 1,4-diona (Figura 31).

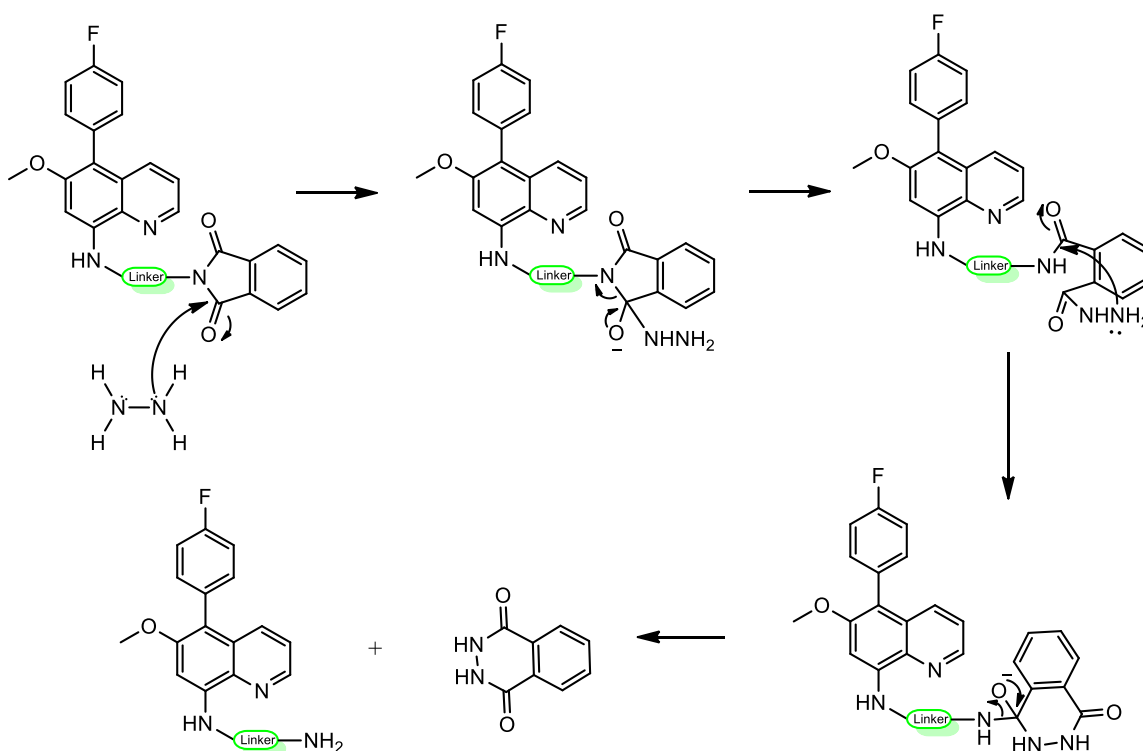


Figura 31 – Mecanismo proposto para a síntese do composto **48a-c**.

Os compostos **48a-c** foram obtidos com rendimentos descritos na Tabela 7. A caracterização destes compostos foi efetuada por ^1H RMN, uma vez que os espectros são semelhantes entre si, apresenta-se como exemplo espectro do composto **48a** (Figura 32). A análise dos restantes espectros encontra-se resumida na Tabela 8.

Tabela 7 – Rendimentos das reações de desproteção dos compostos **48a-c**.

Compostos	Linker (n)	Rendimentos
48a	3	91%
48b	4	82%
48c	5	73%

n= número de carbonos da cadeia lateral

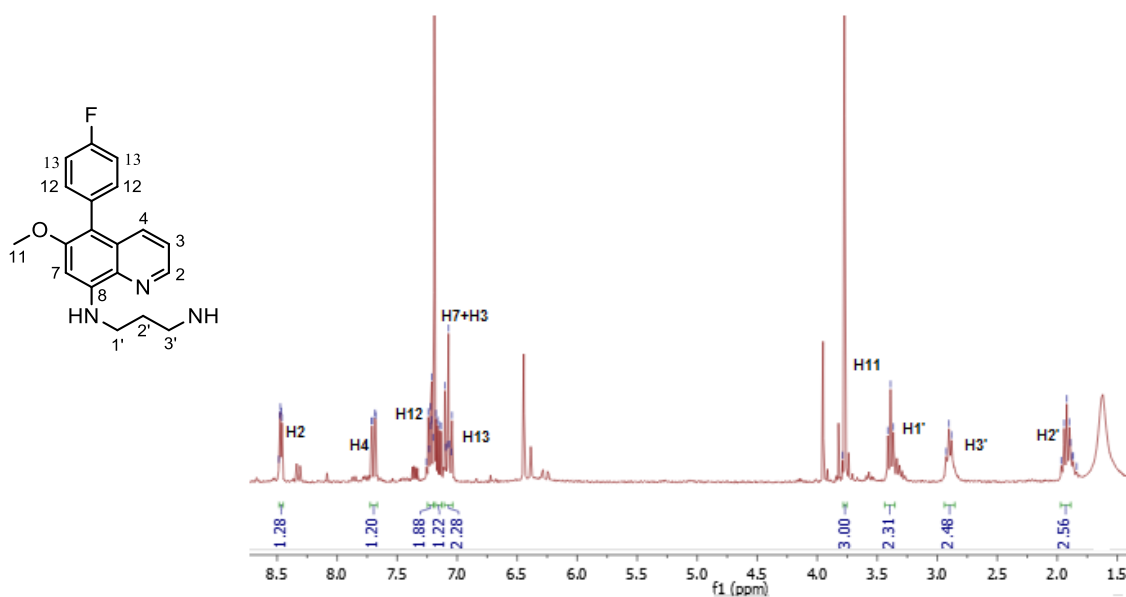
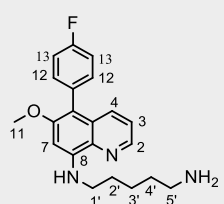

Figura 32 – Espetro de ^1H RMN do composto **48a**.

Tabela 8 – Desvio químico dos prótons dos compostos **48a** e **48c**.

Composto	Estrutura	δ (ppm)	H	Tipo de sinal	J (Hz)
48a		8,47	2	Duplo dupletos	4,1;1,6
		7,70	4	Duplo dupletos	8,6;1,6
		7,25-7,20	12	Multipletos	-
		7,18-7,13	7 3	Multipletos	-
		7,11-7,04	13	Multipletos	-
		3,77	11	Singuleto	-
		3,39	1'	Tripleto	6,8

48c		2,90	3'	Tripleto	6,8
		1,97-1,88	2'	Multiplete	-
		8,52	2	Duplo duplete	4,2;1,3
		8,37	4	Duplo duplete	8,6;1,6
		7,84	12 7	Multiplete	-
		7,70	13	Multiplete	-
		7,41	3	Duplo duplete	8,6;4,2
		4,02	11	Singuleto	-
		3,72	5' 1'	Multiplete	-
		3,31	4' 2'	Multiplete	-
		1,24	3'	Duplete	-

2.7 Síntese dos compostos híbridos

Os tetraoxanos são compostos estáveis em condições básicas, ácidas e também na presença de agentes redutores.

O método utilizado na síntese do tetraoxano com função ácido carboxílico encontra-se descrito por O'Neill et al^[71], onde primeiramente se oxida o composto carbonílico por catálise ácida com H₂O₂, e posteriormente realiza-se a ciclização do dihidroperóxido intermediário (Figura 33).

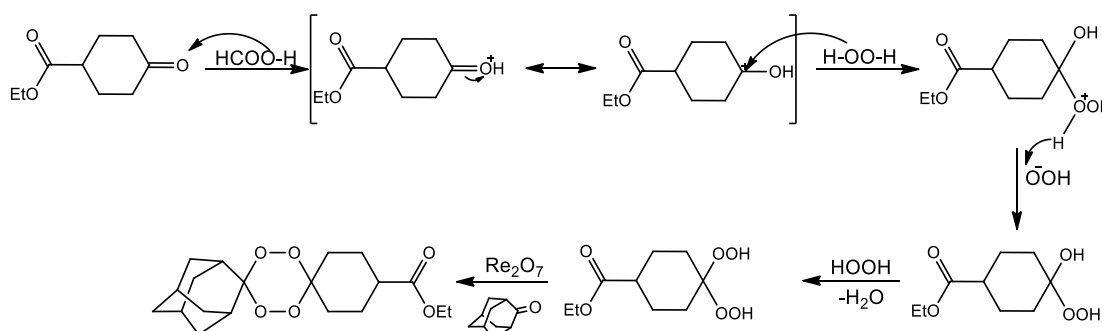


Figura 33 – Mecanismo proposto para a catálise ácida e posterior ciclização para obter o composto 50.

De forma a obter-se o composto tetraoxano com função ácido carboxílico, neste trabalho recorreu-se a uma hidrólise básica do grupo éster de acordo com o procedimento que

se encontra descrito no Capítulo 5. Neste trabalho a hidrólise básica é realizada a altas temperaturas e na presença de uma base forte como NaOH.

Para sintetizar os compostos híbridos é necessário acoplar os intermediários **48a-c** e **51** (Figura 34) utilizando como agente de acoplamento o TBTU.

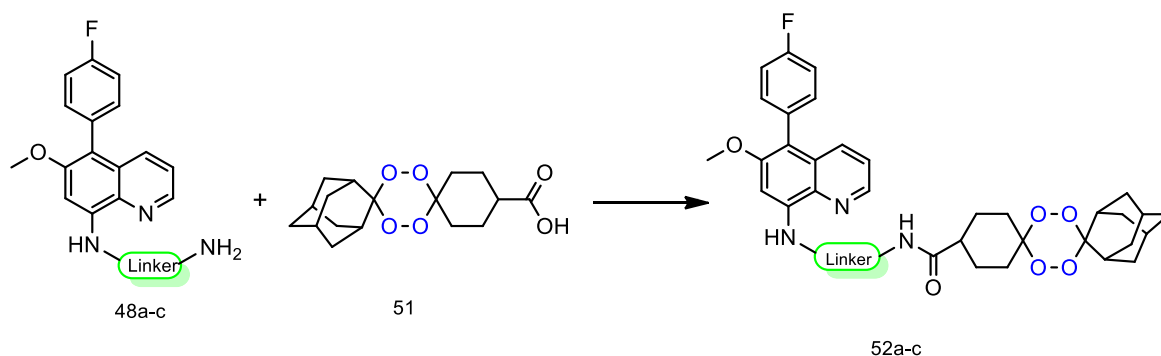


Figura 34 – Esquema reacional dos intermediários envolvidos na síntese dos compostos híbridos.

Os compostos híbridos **52** foram obtidos com rendimentos descritos na Tabela 9. A caracterização de cada composto foi efetuada por ^1H e ^{13}C RMN, COSY, HMBC e HMQC. A pureza dos compostos foi avaliada por HPLC. Como os espectros são semelhantes entre si, a Figura 35 apresenta como exemplo o espectro do composto **52a**. Os restantes espectros encontram-se resumidos na Tabela 10.

Tabela 9 – Rendimentos das sínteses dos compostos **52a-c**.

Compostos	Linker (n)	Rendimentos
52a	3	25%
52b	4	53%
52c	5	63%

n= número de carbonos da cadeia lateral

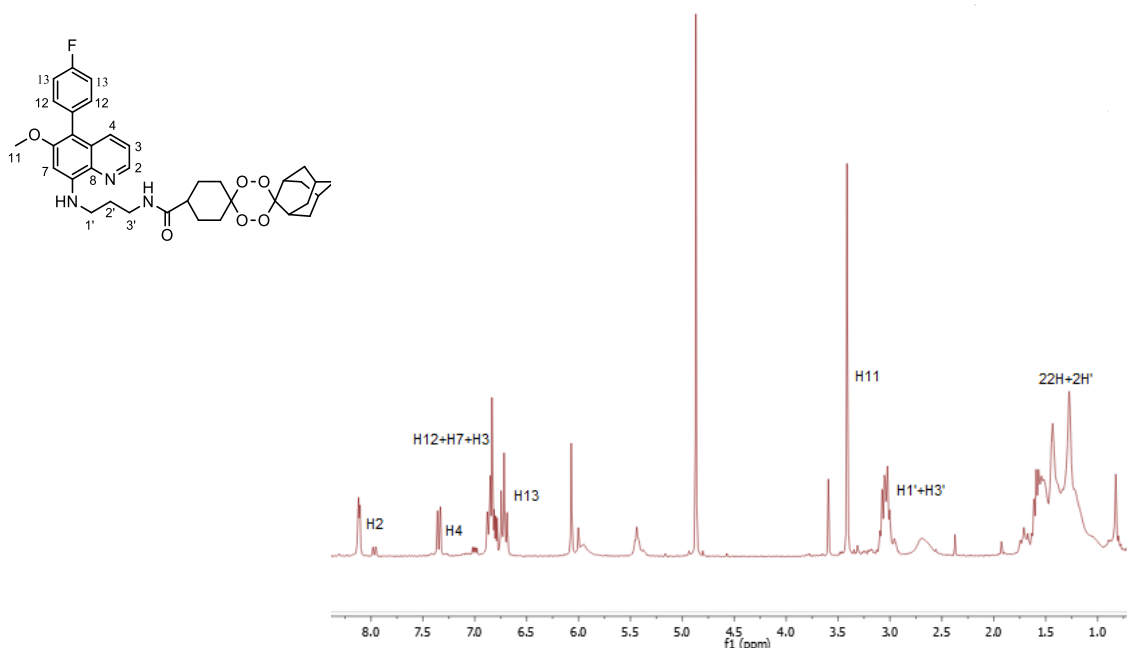

 Figura 35 – Espectro de ^1H RMN do composto 52a.

Tabela 10 – Desvio químico dos prótons dos compostos 52a-c.

Composto	Estrutura	δ (ppm)	H	Tipo de sinal	J (Hz)
52a		8,11	2	Duplo duplete	4,0;1,5
		7,35	4	Duplo duplete	8,6;1,6
		6,84	12	Multiplete	-
			7		
			3		
		6,72	13	Multiplete	-
		3,41	11	Singuleto	-
		3,05	1'	Multiplete	-
			3'		
		1,48	2'	Multiplete	-
Ad*					
5,40	NH (amida)	-	-		
2,70	NH (arom)	-	-		
52b		8,54	2	Duplo duplete	4,1;1,6
		7,77	4	Duplo duplete	8,6;1,6
		7,27	7	Multiplete	-
			12		
		7,23	3	Duplo duplete	8,6;4,1
		7,14	13	Multiplete	-
		3,84	11	Singuleto	-
		3,37	1'	Multiplete	-
			4'		
1,80	2'	Multiplete	-		
	3'				

52c			Ad*		
		6,40	NH (arom)	-	-
		5,60	NH (amida)	-	-
		8,54	2	Multiplete	-
		8,39	4	Duplo duplete	8,6;1,6
		7,26	12	Multiplete	-
			3		
		6,38	13	Multiplete	-
			7		
		4,03	11	Singuleto	-
		3,86	1'	Multiplete	-
			5'		
		1,70	2'	Multiplete	-
			4'		
3'					
Ad					
6,20	NH (amida)	-	-		
5,49	NH (arom)	-	-		

Ad- Adamantano

Capítulo 3

Estabilidade e Atividade dos compostos híbridos

3.1 Ensaios de estabilidade dos compostos híbridos

Muitos dos candidatos a fármacos falham nos ensaios clínicos devido as suas fracas propriedades farmacocinéticas. Estas propriedades como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) são parâmetros cruciais para o sucesso clínico dos novos fármacos. Sendo importante que a determinação *in vitro* destas propriedades seja realizada numa fase inicial no processo de desenvolvimento da descoberta de novos fármacos de modo a minimizar o tempo, custos e evitar a complexidade associada ao estudo *in vivo*. A absorção e o metabolismo são as propriedades mais importantes, onde a absorção está associada à taxa e extensão de transporte do fármaco a partir do lúmen gastro – intestinal para o sangue. A estabilidade metabólica desempenha um importante papel na biodisponibilidade do fármaco.^[72]

Após a síntese dos compostos **52** procedeu-se ao estudo de estabilidade metabólica em homogenato de fígado de rato monitorizada por HPLC. Este estudo foi realizado em condições de pseudo-primeira ordem, onde se determinaram as constantes de velocidade de reação (k_{obs}) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

O sistema de HPLC encontra-se acoplado a um detetor com lâmpada UV-Vis, logo apenas os compostos aromáticos são detetados. Para determinar o comprimento de onda mais adequado aos compostos em estudo traçou-se um espectro de UV-Vis para cada composto, onde se obteve os seguintes máximos de absorção: **52a** – 267,5; **52b** – 264,5; **52c** – 265nm. Como os máximos de absorção são semelhantes para todos os compostos usou-se um comprimento de onda médio de 265nm.

O eluente e o tipo de coluna são fatores determinantes na migração dos compostos ao longo da coluna e conseqüentemente do seu tempo de retenção. Para avaliar qual o melhor eluente a utilizar nos compostos em estudo, procedeu-se a alteração da proporção entre a fase aquosa e fase orgânica, concluindo-se que quanto maior a percentagem de fase aquosa, maior é o tempo de retenção. Os compostos em estudo possuem estruturas ionizáveis, como aminas e amidas, que podem apresentar variações no tempo de retenção entre injeções. Para evitar estas situações, pode-se adicionar um ácido forte à fase aquosa. Para este trabalho em particular utilizou-se ácido fórmico.

Neste trabalho foi usado metanol como fase orgânica e como fase aquosa uma mistura de água desionizada e ácido fórmico (0,01%) na proporção 90:10. Para os vários

compostos obtiveram-se os seguintes tempos de retenção presentes na Tabela 11. No sistema de HPLC foi usada uma coluna de fase reversa em sistema isocrático e fluxo constante de 1 mL/min.

Tabela 11 – Tempo de retenção dos compostos híbridos.

Composto	Linker (n)	Tempo de retenção (t _r) (min)
52a	3C	4,79
52b	4C	4,99
52c	5C	4,87

n= número de carbonos da cadeia lateral

Antes de se iniciar os estudos de estabilidade metabólica foi necessário realizar um teste específico, de acordo com as indicações do fornecedor. Para monitorizar a capacidade de metabolização dos microsomas de fígado de rato, através da conversão enzimática do *p*-nitrofenol em *p*-nitrocatecol pelo CYP2E1.^[73]

Seguidamente, deu-se início ao estudo de estabilidade dos compostos **52a-c** onde é possível observar o desaparecimento do pico correspondente ao composto em estudo e o aparecimento gradual de um pico com tempo de retenção inferior, que pode corresponder à formação de metabolitos (Figura 36).

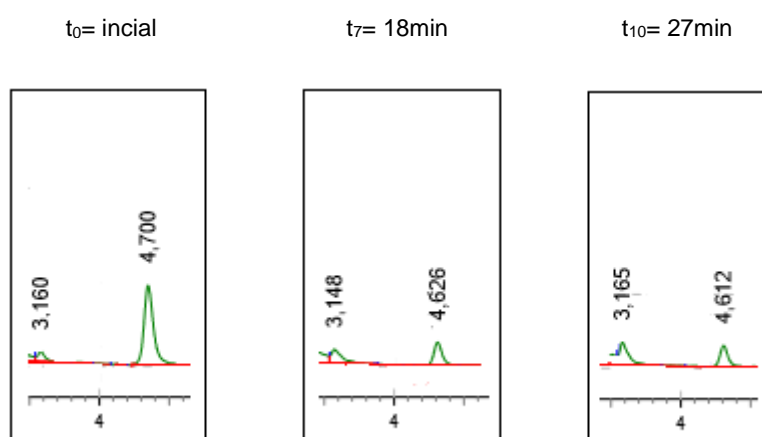


Figura 36 – Cromatogramas do composto **52a** obtido durante o estudo de estabilidade em homogenato de fígado de rato.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) dos compostos **52** foram determinadas a partir do gráfico $\ln(\text{área})$ em função do tempo (Figura 37). Em seguida, os tempos de meia-vida dos compostos em estudo foram obtidos a partir da equação 1.

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

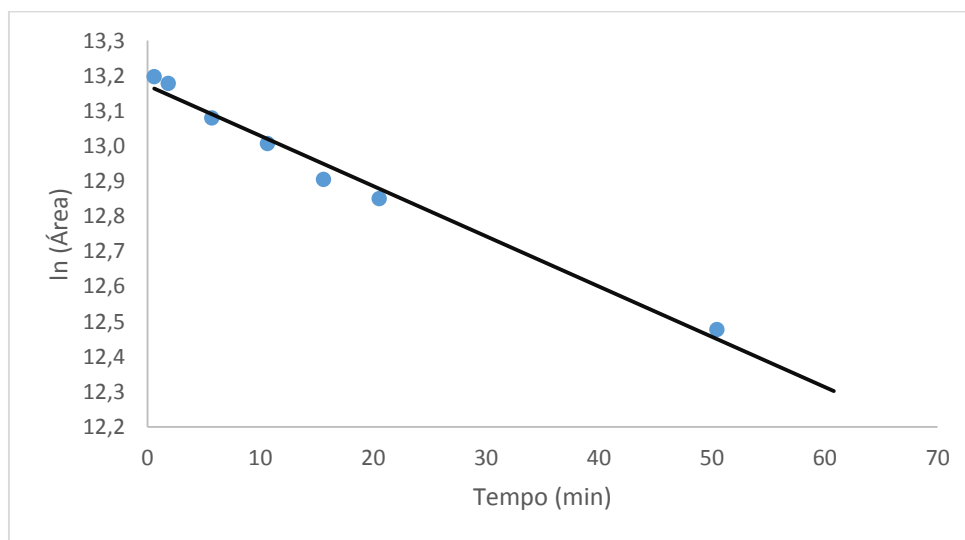


Figura 37 – Gráfico da correlação entre o $\ln(\text{área})$ em função do tempo do estudo de estabilidade do composto híbrido **52a**.

A constante de velocidade é dada pelo declive da reta. Os valores do tempo de meia-vida e constante de velocidade encontram-se resumidos na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores das constantes de velocidade e tempo de meia-vida dos compostos híbridos, determinado com base nos resultados obtidos no estudo de estabilidade.

Composto	Linker (n) ^a	Constante de velocidade	Tempo de meia-vida
		k_{obs} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
52a	3	$1,98 \times 10^{-2}$	35
52b	4	$4,79 \times 10^{-2}$	15
52c	5	$2,76 \times 10^{-2}$	25
54	–CH(CH ₃)(CH ₂) ₃ –	-	40 ^b
55	–CH(CH ₃)(CH ₂) ₃ –	-	10 ^c

a) n= número de carbonos da cadeia lateral

b) Valor não publicado.

c) Valor retirado de [74]

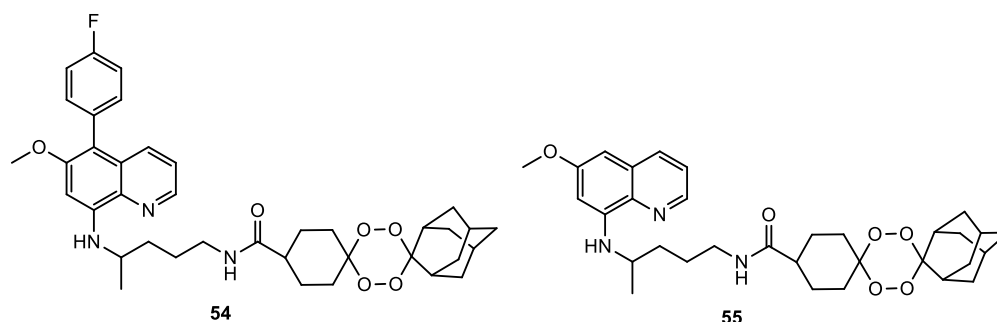


Figura 38 – Estrutura química do composto híbridos **54** e **55**.

Comparando os resultados obtidos no estudo de estabilidade, observa-se que a alteração do *linker* entre os dois farmacóforos reduz a estabilidade dos compostos híbridos em comparação com o composto **54** (Figura 38) de cadeia ramificada. Observa-se também que a substituição na posição 5 do anel quinolinico aumenta a estabilidade dos compostos, comparando com o composto **55** não substituído. Dos compostos em estudo, verifica-se que o composto **52b** é mais rapidamente metabolizado, demorando apenas 15 minutos para a sua concentração inicial se reduzir a metade. Contrariamente, o composto que demora mais a ser metabolizado é o composto **52a**. Assim, pode-se concluir que a instabilidade dos compostos em estudo estará relacionada com *N*-hidroxilação do carbono α .

O aumento gradual do pico em 3,16 minutos (Figura 31) pode resultar da metabolização dos compostos híbridos, podendo-se formar um ou mais metabolitos. Estes metabolitos podem ser identificados por espectrometria de massa. Contudo, analisando a estrutura dos compostos é possível prever quais as posições mais suscetíveis de metabolização (Figura 39).^[35]

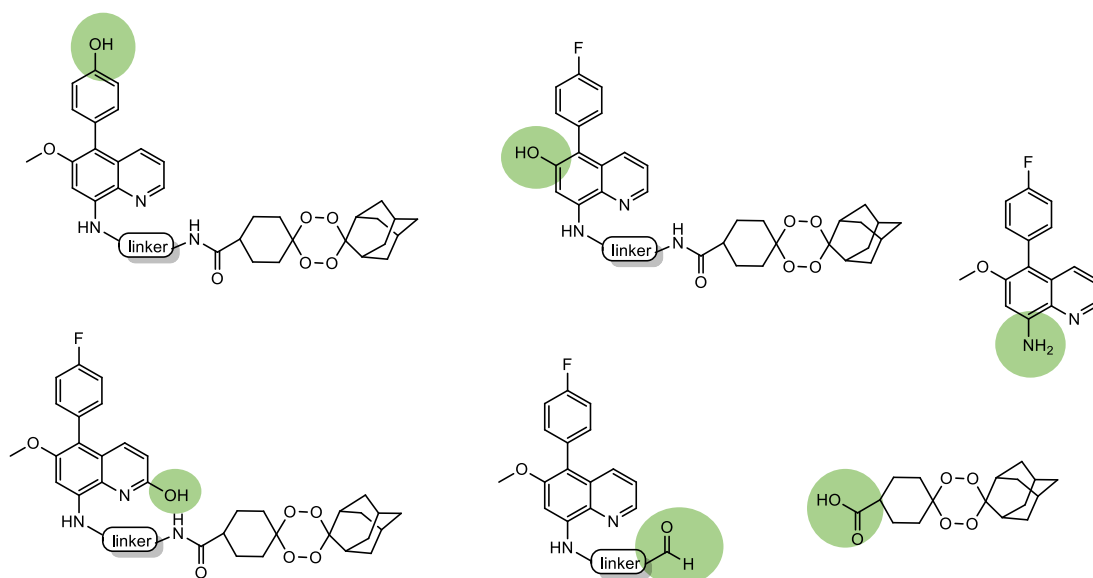


Figura 39 – Estrutura de alguns possíveis metabolitos dos compostos híbridos resultantes do estudo de estabilidade. Adaptado de [35].

3.2 Estudos biológicos dos compostos híbridos na fase sanguínea da malária

A avaliação da atividade dos compostos híbridos **52a-c** contra a fase sanguínea de estirpes de *Plasmodium falciparum* W2, resistentes à cloroquina foi efetuado na Universidade da Califórnia, em São Francisco, de acordo com o procedimento descrito por Coterón et al.^[75] Os resultados obtidos a partir deste estudo determinam qual a concentração de fármaco que inibe 50% do crescimento do parasita nas células (IC₅₀) e encontram-se resumidos na Tabela 13.

Tabela 13 – Atividade esquizonticida sanguínea dos compostos híbridos em estudo e da artemisinina (resultados obtidos da média de pelo menos três ensaios experimentais).

Composto	Linker	IC ₅₀ (nM) ^a ± SD ^b	Peso molecular	Clog P ^c
52a	3C	15,44 ± 3,0	619,73	6,98
52b	4C	15,12 ± 4,6	633,76	7,25
52c	5C	16,59 ± 2,6	647,79	7,76
ART	-	8,2 ^d	282,00	2,90

a) IC₅₀ determinado contra a estirpes de *Plasmodium falciparum* W2 resistentes à cloroquina.

- b) Desvio Padrão
- c) Valor calculado do logaritmo do coeficiente de partição entre o 1-octanol e água, determinado através do software molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). Os valores de logP medem a lipofilia dos compostos híbridos em estudo (valores mais altos atribuídos aos compostos lipofílicos).
- d) Valor retirado de [74].

Tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que no geral os compostos híbridos possuem uma boa atividade inibitória do desenvolvimento do parasita na fase sanguínea, comparando com a artemisinina. O composto mais ativo para a estirpe *P. falciparum* é o composto **52b**, sendo o que possui um IC₅₀ mais baixo. O composto **52c** é o menos ativo da biblioteca de compostos apresentando um IC₅₀ mais elevado. Em relação à lipofilia, os compostos em estudo são mais lipofílicos que a artemisinina, onde se destaca o composto **52c**.

3.3 Estudos biológicos dos compostos híbridos na fase hepática da malária

Avaliação da atividade dos compostos híbridos contra a fase hepática do parasita da malária foi realizado no Instituto de Medicina Nuclear, em Lisboa. Para determinar o IC₅₀ dos compostos em estudo na fase hepática, foi realizado um screening variando a sua concentração entre 0,1 e 10 µM, em células do hepatoma humano (Figura 40 e Tabela 14).

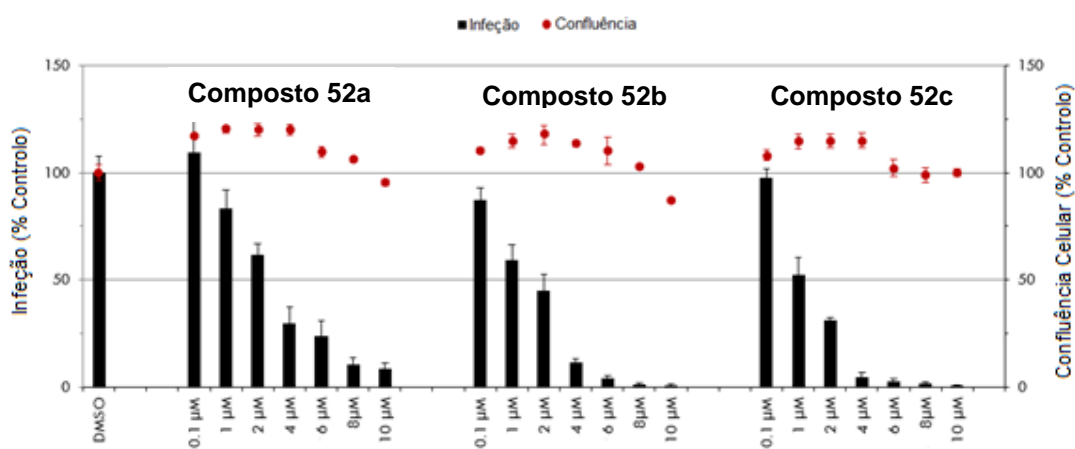


Figura 40- Atividade dos compostos em estudo como esquizontocidas tecidulares sobre o parasita da malária.

Tabela 14 – IC₅₀ da fase hepática dos compostos híbridos em estudo.

Compostos	52a	52b	52c	PQ ^a
IC ₅₀ (μ M) ^a \pm SD ^b	2,615 \pm 0,075	1,113 \pm 0,397	1,64 \pm 0,151	7,50

a) Valor obtido de [74].

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que à medida que aumenta a concentração dos compostos híbridos nas células do hepatoma humano, aumenta a atividade antimalárica na fase hepática. Em geral, a baixas concentrações, entre 0,1 e 1 μ M os compostos apresentam uma baixa capacidade antimalárica. Em concentrações elevadas (6 a 10 μ M) dos compostos **52b** e **52c** a percentagem de células infetadas é praticamente nula, apresentando boa atividade ao nível hepático e prevenindo a replicação intracelular dos esporozoítos.

Em relação à toxicidade, nenhum composto em estudo parece nocivo para as células do hepatoma humano, apresentando uma confluência em geral próxima dos 100%.

3.4 Estudo biológico dos compostos híbridos na leishmaniose

Até ao momento da entrega desta dissertação os estudos biológicos contra a leishmaniose ainda não se encontram concluídos.

Capítulo 4

Conclusão

Com base nos resultados descritos no capítulo 2, conclui-se que é possível realizar a síntese, purificação e caracterização completa dos compostos híbridos baseados nos farmacóforos 8-aminoquinolina e tetraoxano, variando o comprimento do *linker* entre eles. A estrutura dos compostos híbridos desenvolvidos foi confirmada por técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), espectroscopia RMN unidimensional (^1H RMN, ^{13}C RMN) e bidimensionais (COSY, HMBC e HMQC), permitindo identificar os prótons característicos das estruturas da quinolina, do tetraoxano e da variação da cadeia lateral.

Dos estudos realizados em meio biológico, descritos no capítulo 3, que permitiu avaliar a estabilidade dos compostos híbridos sintetizados, conclui-se que os compostos são rapidamente metabolizados pelos microsomas de fígado de rato com tempos de meia-vida entre os 15 e 35 minutos. A instabilidade pode estar relacionada com a formação de metabolitos resultantes da hidroxilação do citocromo P450 na posição *para* e no carbono α da amina. Assim, a substituição do *linker* por uma cadeia ramificada aumenta a estabilidade dos compostos, comparativamente com a cadeia linear (dados não publicados).

Dos estudos de atividade realizados, conclui-se que os compostos sintetizados são bons candidatos a compostos híbridos antimaláricos, por apresentarem atividade contra as estirpes testadas tanto na fase hepática como sanguínea. Com base nos resultados obtidos no estudo biológico na fase sanguínea revelam que os híbridos sintetizados possuem uma capacidade inibitória semelhante à artemisinina. Ao nível hepático, os estudos realizados revelam que os compostos híbridos apresentam uma boa atividade (na ordem dos nanomolares), com ausência de toxicidade celular significativa. Em concentrações mais elevadas os compostos mais ativos são **52b** e os **52c** onde as células infetadas são praticamente nulas.

Assim, conclui-se que o composto híbrido mais ativo tanto na fase hepática como na fase sanguínea é o que apresenta um *linker* com quatro carbonos **52b**, sendo também o mais instável.

Capítulo 5

Procedimento

experimental

5.1 Reagentes e solventes

5.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados durante a parte experimental deste trabalho foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alfa Aesar e Merck.

A trietilamina (Sigma-Aldrich) foi destilada de hidróxido de potássio em lentilhas e armazenada em frascos escuros.

O tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4, 0,5M) foi preparado a partir de 68,045g de fosfato de potássio (Sigma-Aldrich) dissolvido num litro de água desionizada, sendo o pH acertado com NaOH 0,5M.

Os microssomas de fígado de rato foram fornecidos BD Gentest™.

5.1.2 Solventes

Na síntese de todos os compostos foram usados solventes de grau analítico (p.a) e destilados à pressão atmosférica.

O éter etílico (Et₂O) foi previamente seco em refluxo na presença de fio de sódio e benzofenona (Merck), usada como indicador de humidade.

O diclorometano (CH₂Cl₂), metanol (MeOH), acetato de etilo (AcEt) e hexano foram destilados de cloreto de cálcio anidro.

Nos estudos de estabilidade por HPLC, utilizaram-se solventes Lichrosolv® fornecidos pela Merck e água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, que foi recolhida com uma resistividade 18mΩ.cm⁻¹.

Os solventes deuterados usados em RMN, como o cloroformio (CDCl₃) e metanol (MeOD), foram fornecidos pela Merck, com um grau de pureza superior a 95%.

5.2 Cromatografia

Todas as colunas de cromatografia usadas na purificação dos compostos foram preparadas com sílica gel 60M de granulometria 0,040-0,063mm fornecidos pela Merck. As cromatografias em camada fina (TLC) foram realizadas em placas de sílica-gel Merck Kieselgel F₂₅₄, de espessura 0,25mm, e reveladas usando uma câmara CAMAG de UV, com um comprimento de onda de 254nm ou usando p-anisaldeído como revelador.

5.3 Equipamentos

Os pontos de fusão foram determinados numa câmara da Kofler Bock Monoscop M.

Os espectros de infravermelho (IV) foram determinados num espectrofotômetro Nicolet Impact 400 FTIR sob a forma de filme em células de cloreto de sódio ou sob a forma de pastilhas de brometo de potássio.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN) e de carbono (¹³C-RMN) foram traçados num espectrofotômetro Bruker 300 (¹H 300 MHz; ¹³C 100MHz). Os valores de desvio químico (δ) são apresentados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) estão em Hz.

Os espectros de UV-Vis dos compostos foram realizados num espectrofotômetro UV-VIS de feixe duplo Shimadzu UV-2100PC acoplado a um sistema de aquecimento termostatado da Shimadzu CPS-260.

Os estudos de estabilidade foram realizados num sistema de HPLC com um detetor espectrofotométrico de UV-VIS Shimadzu, acoplado a uma bomba Lachrom Merck-Hitachi L-7100, com um injetor Rheodyne de 20 μ L e uma coluna Merck Lichrocart® RP-18, 250x4mm, com partículas de 5 μ m. Durante os ensaios de estabilidade foi usado uma centrífuga SIGMA 112 (13000rpm), um vortex Genie™ Modelo K-550-GE Scientific Industries, Inc., e um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado.

Para a leitura de pH das soluções foi utilizado um potenciômetro micro pH 2002 Crison.

5.4 Procedimentos de síntese e caracterização dos compostos

5.4.1 Composto 44: 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina

A uma solução de 6-metoxi-8-nitroquinolina (1g; 4,9mmol) em clorofórmio (5mL), adicionou-se carbonato de cálcio (374mg; 3,74mmol), limalhas de ferro (24mg; 0.43mmol), água (1mL) e bromo (1mL). Deixou-se a suspensão em refluxo (68°C) durante 24h, posteriormente deixou-se em agitação durante 1h à temperatura ambiente. Para remover o excesso de bromo, a mistura reacional foi tratada com bissulfito de sódio a 5%. Finalmente foram realizadas extrações com acetato de etilo (3 x 40mL), a fase orgânica daí resultante foi lavada com uma solução de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. Depois de evaporado todo o solvente a baixa pressão, obteve-se um sólido amarelo.

- Rendimento: 63%
- Ponto de fusão 208°C - 210°C.
- ¹H RMN (300Hz, CDCl₃): 8.96 (dd, J=4.1, 1.6Hz, 1H), 8.63 (dd, J=4.1, 1.6Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.60 (dd, J=8.8, 4.1Hz, 1H), 4.11 (s,3H).

5.4.2 Composto 45: 5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-nitroquinolina

Numa solução em agitação de 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina (0.707mmol; 1eq) em dimetoxietano seco (6mL) adicionou-se acetato de paládio (II) (0.053mmol), trifenilfosfina (0.110mmol), brometo de tetrabutilamónio (0.149mmol), ácido 4-fluorofenil borónio (0.777mmol; 1.1eq) e uma solução de carbonato de sódio 3M (480µL). Deixou-se a mistura reacional em refluxo (85°C) durante 47h. Ao fim de 23h fez-se uma recarga de brometo de tetrabutilamónio (0.119mmol). A reação foi controlada por TLC. Quando a reação terminou a mistura reacional foi filtrada a vácuo com celite para que todo o catalisador ficasse retido e fizeram-se extrações com acetato de etilo (3 x 40mL). As fases orgânicas obtidas foram lavadas com uma solução de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão baixa. Após purificação do composto por cromatografia em coluna com sílica e utilizando como eluente uma mistura de hexano/diclorometano (6:4), obteve-se um composto sólido amarelado.

- Rendimento: 61%
- Ponto de fusão: 250°C - 252°C

- ^1H RMN (300Hz, CDCl_3): 8.93 (dd, $J=4.0, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.94 – 7.88 (m, 2H), 7.40 (dd, $J=8.7, 4.1\text{Hz}$, 1H), 7.30 (dd, $J=8.3, 5.9\text{Hz}$, 2H), 7.22 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 3.92 (s, 3H).

5.4.3 Composto 46: 5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina

A uma mistura de 5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-nitroquinolina (0.193mmol) em ácido clorídrico 37% (1mL) com agitação a 0°C , adicionou-se cloreto de estanho (II) (0.772mmol) e estanho (0.05mmol). Ao final de 1h verificou-se por TLC que a reação já tinha terminado, adicionou-se seguidamente uma solução de NaOH a 8M até se obter um pH superior a 10. Em seguida a mistura reacional foi diluída em água e realizaram-se sucessivas extrações com acetato de etilo (3x 40mL). As fases orgânicas obtidas foram lavadas com uma solução de cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro. Depois de evaporado todo o solvente, obteve-se um óleo alaranjado.

- Rendimento: 88%
- ^1H RMN δ (300Hz, CDCl_3): 8.61 (dd, $J = 5.6, 1.4\text{ Hz}$, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 3H), 7.16 (t, $J = 8.7\text{ Hz}$, 2H), 6.83 (s, 1H), 3.83 (s, 3H).

5.4.4 Composto 53: 5-bromo-1-pentanofthalimida

Inicialmente deixou-se em refluxo (90°C) uma solução de ftalimida (3.35mmol) em etanol (10mL). Ao fim de 1h de reação adicionou-se uma solução de hidróxido de potássio (1mL) deixando em agitação durante 30min à temperatura ambiente. Seguidamente filtrou-se a vácuo a mistura reacional, às frações alcoólicas daí resultantes foi adicionada ftalimida (3.35mmol) repetindo-se o processo. Ambas as frações sólidas resultantes deste processo foram lavadas com acetona de forma a remover o excesso de ftalimida. Depois de seco obteve-se 80.5mg de ftalimida de potássio.

No passo seguinte, à mistura de ftalimida de potássio (0.334mmol) em acetona (312.5 μL), adicionou-se dibromopentanto (0.334mmol; 1eq), ficando em refluxo (60°C) durante 12h. Depois de arrefecida a mistura reacional à temperatura ambiente, fez-se uma filtração a vácuo lavando com acetona. Finalmente após evaporação do solvente a baixa pressão, obteve-se um óleo transparente.

- Rendimento: 73%
- ¹H RMN (300 Hz, CDCl₃): 7.84 (dd, J=5.5, 3.0Hz, 2H), 7.71 (dd, J=5.4,3.1Hz, 2H), 3.70 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.40 (t, J=6.8, 2H), 1.96-1.86 (m, 2H), 1.77-1.65 (m, 2H), 1.59-1.43 (m, 2H).

5.4.5 Composto 47: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-alquil-isoindolina-1,3-diona

A uma solução do composto 8-aminoquinolina (0.186mmol) em trietilamina (1.5eq), juntou-se um composto com cadeia alquílica protegida com ftalimida (1.5eq.). Deixou-se em refluxo (120°C) em atmosfera inerte de azoto durante cerca de 22h. A mistura reacional foi sujeita a uma filtração a vácuo para que fosse removido todo o composto alquilico que não reagiu. Posteriormente adicionou-se uma solução de NaOH a 2M até se obter um pH superior a 10. Finalmente realizaram-se sucessivas extrações com acetato de etilo (3x 40mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro.

5.4.5.1 Composto 47a: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-isoindolina-1,3-diona

- Óleo amarelo
- Rendimento: 91%
- ¹H RMN (300Hz, CDCl₃): 8.51 (dd, J=4.1, 1.6Hz, 1H), 7.87-7.78 (m, 2H), 7.76-7.65 (m, 3H), 7.30-7.25 (m, 3H), 7.20 (dd, J=8.6, 4.1Hz, 1H), 7.14 (m, 2H), 3.93 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 2.19 (m, 2H).

5.4.5.2 Composto 47b: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-isoindolina-1,3-diona

- Óleo amarelo
- Rendimento: 84%

- ¹H RMN (300Hz CDCl₃): 8.59 (dd, J=4.1, 1.7Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.95 (dd, J=8.3, 1.7Hz, 1H), 7.87-7.68 (m, 4H), 7.32 (dd, J=8.3, 4.2Hz, 1H), 7.18-7.09 (m, 2H), 6.97-6.89 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.41 (d, J=6.1Hz, 2H), 3.34 (d, J=8.4Hz, 2H), 2.07-2.03 (m, 4H).

5.4.5.3 Composto 47c: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-isoindolina-1,3-diona

- Óleo amarelo
- Rendimento: 80%
- ¹H RMN (300Hz, CDCl₃): 8.53-8.50 (m, 1H), 8.37 (dd, J=8.6, 1.6Hz, 1H), 7.86-7.80 (m, 4H), 7.73-7.68 (m, 4H), 7.41 (dd, J=8.6, 4.2Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.77-3.68 (m, 4H), 1.62-1.60 (m, 4H), 1.42 (m, 2H).

5.4.6 Composto 48: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolinil)-alquil-1,3-diamina

A uma solução do composto (48mg) em etanol 95% (1,57mL) adicionou-se hidrazina (20eq, 2.11mmol), deixando-se reagir em refluxo (80°C) em atmosfera inerte. Ao fim de 12h a reação terminou, deixando-se arrefecer à temperatura ambiente. Em seguida removeu-se todo o solvente em baixa pressão. Finalmente adicionou-se uma pequena quantidade de água para se separar a fase orgânica com auxílio de acetato de etilo (3x 40mL). A fase orgânica foi lavada com cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro.

5.4.6.1 Composto 48a: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-1,3-diamina

- Óleo amarelo
- Rendimento: 91%

- ^1H RMN (300Hz, CDCl_3): 8.47 (dd, $J= 4.1, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.70 (dd, $J= 8.6, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 7.018-7.13 (m, 2H), 7.11-7.04 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.39 (t, $J= 6.8\text{Hz}$, 2H), 2.90 (t, $J= 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.97-1.88 (m, 2H).

5.4.6.2 Composto 48b: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-1,3-diamina

- Óleo amarelado
- Rendimento: 82%

5.4.6.3 Composto 48c: 2-(5-(4-fluorfenilo)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-1,3-diamina

- Óleo amarelo
- Rendimento: 73%
- ^1H RMN (300Hz, CDCl_3): 8.52 (dd, $J=4.2, 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.37 (dd, $J=8.6, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.88-7.81 (m, 3H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.41 (dd, $J=8.6, 4.2\text{Hz}$, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.80-3.66 (m, 4H), 3.37-3.23 (m, 4H), 1.24 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 2H)

5.4.7 Composto 51: Tetraoxano com função ácido

A uma solução de 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo (2.88mmol) em ACN (3.08mL) em agitação e a uma temperatura de 0°C , adicionou-se ácido fórmico (2.07mL) e peróxido de hidrogénio 50% (1.06mL). A reação foi controlada por TLC, ao fim de 1h15min a reação terminou. À mistura reacional adicionou-se um pouco de água. Sendo a fase aquosa extraída com DCM, e posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O composto obtido foi adicionado a uma solução de 2-adamantanona (650mg) em DCM seco (2.8mL) e óxido de rénio (28.6mg) em agitação e a uma temperatura de 0°C . Após 2h30min a mistura reacional foi filtrada a vácuo com sílica, para que fosse removido todo o catalisador. O composto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica e usando com eluente acetato de etilo/hexano (2:8). Obteve-se um composto sólido branco.

A uma mistura de $\text{MeO}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1) adicionou-se tetraoxano éster (650mg) e uma solução de NaOH 10M (9.2mmol) em agitação a uma temperatura de 80°C . Ao fim de 1h a

reação terminou, sendo a mistura reacional diluída com água, sendo a fase orgânica foi extraída com éter. À fase aquosa resultante adicionou-se HCl 1M até pH 2, extraíndo novamente com éter. As fases orgânicas foram lavadas com uma solução de cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro.

- Sólido branco
- Rendimento: 83%
- ^1H RMN (300Hz, CDCl_3): 3,17 (s, 1H), 2,94 (s, 1H), 2,49 (s, 1H), 2,03 – 1,61 (m, 24H).

5.4.8 Composto 52: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-alquil-1,3-diamina tetraoxano

A uma solução de tetraoxano ácido (0.1g) em DMC seco (7mL) adicionou-se TEA (0.05g) e TBTU (0.099g). Permanecendo em agitação sob atmosfera inerte a uma temperatura de 0°C durante 1h. Em seguida adicionou-se a PQ (0.31mmol), TEA (0.33mol) e DCM (obtido anteriormente) (2mL). Ao fim de 30min removeu-se o banho de gelo, deixando a reação decorrer à temperatura ambiente. Após 13h deu-se a reação por terminada, diluindo a mistura reacional com acetato de etilo e extraiu-se com uma solução de bicarbonato de sódio (30mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo. Finalmente todas as fases orgânicas foram lavadas com uma solução de bicarbonato de sódio e cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro. Após a purificação por cromatografia em coluna de sílica com um eluente hexano/acetato de etilo (4:6) obteve-se um óleo amarelado.

5.4.8.1 Composto 52a: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-propil-1,3-diamina tetraoxano

- Óleo amarelo
- Rendimento: 25%
- ^1H RMN (300Hz, MeOD): 8.11 (dd, $J= 4.0, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.35 (dd, $J=8.6, 1.6\text{Hz}$, 1H), 6.89-6.78 (m, 4H), 6.77-6.66 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.10-2.99 (m, 4H), 1.65-1.19 (m, 24H).

- IV: ν_{max} = 3300, 2900, 1678, 1455, 1060, 997 cm^{-1}

5.4.8.2 Composto 52b: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-butil-1,3-diamina tetraoxano

- Óleo amarelo
- Rendimento: 53%
- ^1H RMN (300Hz, MeOD): 8.54 (dd, $J=4.1, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.77 (dd, $J=8.6, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.32-7.26 (m, 3H), 7.23 (dd, $J=8.6, 4.1\text{Hz}$, 1H), 7.18-7.11 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.44-3.31 (m, 4H), 1.99-1.66 (m, 26H).
- IV: ν_{max} = 3290, 1668, 1460, 1055, 998 cm^{-1}

5.4.8.3 Compostos 52c: 2-(5-(4-fluorfenil)-6-metoxi-8-aminoquinolina)-pentil-1,3-diamina tetraoxano

- Óleo amarelo
- Rendimento: 63%
- ^1H RMN (300Hz, MeOD): 8.60-8.52 (m, 1H), 8.39 (dd, $J= 8.6, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.46-7.46 (m, 3H), 6.54-6.25 (m, 3H), 4.03 (s, 3H), 3.95-3.77 (m, 4H), 2.06-1.47 (m, 28H)
- IV: ν_{max} = 3300, 2900, 1658, 1450, 1060, 998 cm^{-1}

5.5 Estabilidade dos compostos híbridos em microssomas de fígado de rato

O estudo de estabilidade dos compostos híbridos foi realizado por HPLC, utilizando um método por amostragem, onde foram recolhidas alíquotas ao longo do tempo que foram posteriormente analisadas. O comprimento de onda utilizado para este estudo foi de 265nm, escolhido pela determinação da absorção máxima por espectroscopia de UV-

VIS. Os microssomas de fígado de rato obtido comercialmente, foram conservados à temperatura de -20°C .

Para a realização do ensaio pipetou-se $20\mu\text{L}$ de concentrado de homogenato, $570\mu\text{L}$ de água desionizada, $160\mu\text{L}$ de tampão fosfato (0.5M e $\text{pH } 7.4$) e $8\mu\text{L}$ do composto híbrido em estudo numa concentração de 10mM (em acetonitrilo) para um eppendorf. A mistura reacional foi homogeneizada e depois colocada num banho de água a 37°C por cerca de 5min . Posteriormente adicionou-se ao eppendorf $40\mu\text{L}$ da solução A (26mM NAPH^+ ; 66mM 6-fosfato-D-glucose; 66mM cloreto de magnésio) e $8\mu\text{L}$ da solução B (6-fosfato de glucose desidrogenase (40U/ml) em 5mM de citrato de sódio), dando início à reação metabólica. Recolheram-se alíquotas com um volume de $60\mu\text{L}$ da mistura reacional para eppendorfs com $60\mu\text{L}$ de acetonitrilo para terminar a reação metabólica, em determinados intervalos de tempo. A mistura foi homogeneizada no vórtex e centrifugada (10000rpm por cerca de 10min). Finalmente injetou-se $20\mu\text{L}$ do sobrenadante no aparelho de HPLC para análise. O eluente utilizado foi uma mistura de metanol e água (0.01% de ácido fórmico) numa razão de $9:1$. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Capítulo 6

Bibliografía

- [1] Conteh L, Engels T, Molyneux D. Socioeconomic aspects of neglected tropical disease. *Lancet*. **2010**. 375:239-47.
- [2] Upadhayaya R, Dixit S, Foldesi A, Chattopadhyaya J. New antiprotozoal agents: their synthesis and biological evaluations. *Bioorg Med Chem Lett*. **2013**. 23:2750-8.
- [3] WHO. 2014. World Malaria Report 2014.
- [4] Olaleye T, Brannigan J, Roberts S, Leatherbarrow R, Wilkinson A, Tate E. Peptidomimetic inhibitor of N-myristoyltransferase from human malaria and leishmaniasis parasites. *Org Biomol Chem*. **2014**. 12:8132-7.
- [5] WHO. 2015. Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases.
- [6] Murray H, Berman J, Davies C, Saravia N. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. **2005**. 366:5161-77.
- [7] Chappuis F, Sundar S, Hailu, Ghalib H, Rijal S, Peelin R, Alvar J, Boleart. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature*. **2007**. 5:873-82.
- [8] Siu E, Ploss A. Modeling malaria in humanized mice: opportunities and challenges. *Ann N Y Acad Sci*. **2015**. 1342:29-36.
- [9] Cowman A, Crabb B. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. **2006**. 124: 755-766.
- [10] Dhanawat M, Das N, Nagarwal R, Shirvastava S. Antimalarial drug development: Past to present scenario. *Rev Med Chem*. **2009**. 9:1447-1469.
- [11] Prudêncio M, Rodriguez A, Mota M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature*. **2006**. 4:849-856.
- [12] Su X, Hauton K, Welleems T. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **2007**. 8:497-506.
- [13] Ridley R. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. **2002**. 415:686-693.
- [14] Egan T. Haemozoin formation. *Mol Bio Para*. **2008**. 157:127-136.
- [15] Francis S, Sullivan D, Goldberg D. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*. **1997**. 51:97-123.

- [16] Bohle D, Dinnebier R, Madsen S, Stephens P. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malaria late trophozoite by x-ray diffraction. *J Biol Chem.* **1997.** 272: 713-716.
- [17] Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New antimalarial drugs. *Med Chem.* **2003.** 42:5274-5293.
- [18] Chhwatt L. Classification of antimalarial drugs in relation to different stage in the life-cycle of the parasite: Commentary on diagram. *World Health Organ.* **1955.** 27:287-290.
- [19] Rosenthal P. Protease of malarial parasite: New targets of chemotherapy. *Emerg Infect Dis.* **1998** 4:49-55.
- [20] Sahu N, Sahu D. Novel molecular target for antimalarial drug development. *Chem Biol Drug Des.* **2008.** 71:287-97.
- [21] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghailb H, Rijal S, Peeling R, Alvar J. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature.* **2007.** 5:873-882.
- [22] Murray H, Berman J, Davies C, Saraiva N. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* **2005.** 366:1561-1573.
- [23] David C, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermo Ther.* **2009.** 22:491-502.
- [24] Mc Gwire B, Satoskar A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* **2014.** 107:7-14.
- [25] Goto H, Lindoso J. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am.* **2012.** 26:293-307.
- [26] Rodrigues V, Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* **2016.** 9:118.
- [27] Olliaro P, Lazdins J, Guhl F. Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Emerg Drugs.* **2002.** 7:61-67.
- [28] www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/
- [29] Handaman E, Bullen D. Interaction of leishmania with the most macrophage. *Trends Parasitol.* **2002.** 18:147-4922.
- [30] Singh N, Kumar M, Singh R. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific J Trop Med.* **2012.** 485-497.

- [31] Davidson R. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs*. **1998**. 56:1009-1018.
- [32] Tekwani B, Walker L. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis*. **2006**. 16:623-631.
- [33] Kaur K, Jain M, Reddy R, Jain R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *E J Med Chem*. **2010**. 45:325-3264.
- [34] Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance for new agents. *Pharmacol Ther*. **1998**. 79:55-87.
- [35] Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *E J Med Chem*. **2009**. 44:937-953.
- [36] Kevin J, Hoffman L. Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis*. **2004**. 39:1336-1345.
- [37] Davanço M, Aguiar A, Santos L, Padilha E, Campos M, Andrade C, Fonseca L, et al. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of new primaquine produg. *PLOS one*. **2014**. 9:1-10.
- [38] Lang-Unnasch N, Murphy D. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annu Rev Microbiol*. **1998**; 52:561-90.
- [39] Olliaro P. Mode of action and mechenisms of resistance for antimalarial drug. *Pharmacol Ther*. **2001**. 89:207-219.
- [40] La-Scalea M, Menezes C, Matsutami G, Polli M, Serrano, Ferreira E. Molecular modeling of the voltammetric oxidation at a glassy carbon electrode of the antimalarial drug primaquine and its produgs succinylprimaquine and maleyprimaquine. *Electrachim Acta*. **2006**. 51:5103-5111.
- [41] Imbert L, Cojean S, Libong D, Chaminade P, Loiseau P. Sitamaquine-risistance in *Leishmania donovani* affects drus accumulation and lipid metabolism. *Biomed Pharmacother*. **2014**. 68:893-897.
- [42] Haymond S, Cariappa R, Eby S, Scott M. Laboratory assessment of oxigenation in methemoglobinemia. *Clinl Chem*. **2005**. 21:434-444.
- [43] Bowman Z, Morrow J, Jollow D, McMillan D. Primaquine-Induced hemolytic anemia: Role of membrane lipid peroxidation ond cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther*. **2005**. 314: 838-845.

- [44] Ashley E, Recht J, White N. Primaquine: the risks and the benefits. *Malaria Journal*. **2014**. 13:418.
- [45] Yadav N, Sharma C, Awasthi S. Diversification in the synthesis of antimalarial trioxane and tetraoxane analogs. *RSC Adv*. **2014**. 4:5469-5498.
- [46] Kumar N, Singh R, Rawat D. Tetraoxanes: synthetic and medicinal chemistry perspective. *Med Res*. **2012**. 32:581-610.
- [47] Antoine T, Fisher N, Amewu R, O'Neill P, Ward S, Biagini A. Rapid kill of malaria parasite by artemisinin and semi-synthetic endoperoxid involves ROS-dependent depolarization of the membrane potential. *J Antimicrob Chemother*. **2014**. 69:1005-1016.
- [48] Opsenica D, Soloja B. Antimalarial peroxides. *J Serb Chem Soc*. **2009**. 74:115-1193.
- [49] Vennerstrom J, Ager A, Andersen S, Grace J, Wongpanich V, Angerhofer C, Hu Joanna, Wesche D. Assessment of the antimalarial potential of tetraoxae WR 148999. *Ann J Trop Med Hyg*. **2000**. 62:573-578.
- [50] Paula M, Valle M, Pliego J. Electron affinity and dipole moment of 1,2,4,5-tetraoxanes antimalarials and correlation with activity against *Plasmodium falciparum*. *Med Chem Res*. **2014**. 23:5197-5203.
- [51] O'Neill P, Barton V, Ward S. The molecular mechanism of action artemisinin – the debate continues. *Molecules*. **2010**. 15:1705-1721.
- [52] Oliveira R, Guedes R, Meireles P, Albuquerque I, Gonçalves L. Tetraoxane – pyrimidine nitrile hybrids as dual stage antimalarial. *J Med Chem*. **2014**. 57:4916-4923.
- [53] Meshnick S. The mode of action of antimalarial endoperoxides. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **1998**. 88:31-32.
- [54] Opsenica I, Terzić N, Opsenica D, Angelovski G, Lehnig M, Eilbracht P, et al. tetraoxane antimalarials and their reaction Fe(II). *J Med Chem*. **2006**. 49:3790-3799.
- [55] Meshnick S. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Para*. **2002**. 32:1655-1660.
- [56] Muregi F, Ishih A. Next – generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Dev Res*. **2010**. 71:20-32.
- [57] Cavalli A, Bolognesi M. Neglected tropical diseases: Multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Typanosoma* and *Leishmania*. *J Med Chem*. **2009**. 52:7339-7359.

- [58] Meunier B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality?. *Acc Chem Res.* **2008.** 41:69-7.
- [59] Vandekerckhove S, D'hooghe M. Quinoline – based antimalarial hybrid compound. *Bio Med Chem.* **2015.** 23:5098-5119.
- [60] Oliveira R, Miranda D, Magalhães J, Capela R, Perry M, O'Neill P, Moreira R, Lopes F. From hybrid compounds to targeted drug delivery in antimalarial therapy. *Bio Med Chem.* **2015.** 23:5120-5130.
- [61] Sharma M, Chauhan K, Shivahare R, Vishwakarma P, Suthar M, Sharma A, Gupta S, et al. Discovery of a new class of natural product-inspired quinazolinone hybrid as potent antileishmanial agent. *J Med Chem.* **2013.** 56:4374-4392.
- [62] Waghmare A, Bose P, Pat H. Direct nuclear halogenation of deactivated aryl and N-heteroaryl amines. *Derm Pharma Chem.* **2010.** 2:212-241.
- [63] Elderfield R, Mertel H, Mitch R, Wempfen I, Werble E. Synthesis of primaquine and certain of its analogs. *J Am Chem Soc.* 1955. 77:4816-4819.
- [64] Miyaura N, Suzuki A. Palladium – catalyzed cross - coupling reaction of organoboron compounds. *Chem Rev.* **1995.** 95:2457-2483.
- [65] Zhou Y, Li J, Zhao L, Jiang H. An unusual de-nitro reduction of 2-substituted-4-nitroquinolines. *Tetrahedron Lett.* **2006.** 47:8511-8514.
- [66] Pehlian L, Metay E, Laval S, Dayoub W, Demonchaux P, Mignani G. et al. Iron-catalyzed selective reduction of nitro compounds to amines. *Tetrahedron Lett.* **2010.** 51:1939-41.
- [67] Shirak H, Kozar M, Melendez V, Hudson T, Ohrt C, Magill A, Lin A. Antimalarial Activity of novel 5-aryl-8-aminoquinoline derivatives. *J Med Chem.* **2011.** 54:131-142.
- [68] Portela M, Moreira R, Valente E, Constantino L, Iley J, Pinto J, Rosa R, Cravo P, Rosário V. 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. *Pharma Res.* 1999. 16:949-955.
- [69] Jain M, Vangapandu S, Sachdeva S, Jain R. Synthesis and blood-schizontocidal antimalarial activities of 2-substituted/2,5-disubstituted-8-quinolinamines and some of their amino acid conjugates. *Bio Med Chem.* **2004.** 12:1003-1010.

- [70] Ariffin A, Khan M, Lan L, May F, Yun C. Suggested improved method for the Ing-Manske and related reaction for the second step of Gabriel synthesis of amines. *Synth Commun.* **2004.** 34:4439-4445.
- [71] O'Neill P, Amewu R, Nixon G, ElGarah F, Mungthin M, Chadwick J, Shone A, et al. 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.* **2010.** 49:5693-5697.
- [72] Mondal B, Mazumder U, Mondal N, Banerjee S. Optimization of rat liver microsomal stability assay using HPLC. *J Bio Sci.* **2008.** 8:111-1114.
- [73] 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.
- [74] Miranda D, Capela R, Albuquerque I, Meireles P, Paiva I, Nogueira F, Amewu R, Gut J, Rosenthal P, Oliveira R, Mota M, Moreira M, et al. Novel endoperoxide-based transmission-blocking antimalarials with liver- and blood-schizontocidal activities. *ACS Med Chem Lett.* **2014.** 5:108-112.
- [75] Coteron, J.M. et al (2011). Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *J Med Chem.* 2011. 54:5540–556.