



UAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Quimioterapia da malária: perspectivas para o futuro

Pedro Miguel dos Santos Faustino

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos

Cristiano

2016

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

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

Universidade do Algarve, 23 de Setembro de 2016

© 2016 Pedro Miguel dos Santos Faustino

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

Agradecimentos

Dedico este trabalho aos meus pais porque sem o apoio deles não teria sido possível chegar a esta etapa da minha vida. Agradeço especialmente à minha mãe a confiança que depositou em mim ao longo do curso e o seu incentivo constante nos momentos mais críticos. Agradecimento especial ao meu irmão por trabalho de formatação de texto na monografia.

Agradeço aos amigos do curso, principalmente ao Rodrigo, Miguel, Sílvia, Hristina bem como à minha namorada Daniela, por nunca me deixarem desistir ao longo desta jornada na faculdade. Esta tese não seria possível sem o vosso contributo e amizade.

Dedico o meu especial agradecimento à Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano pelo voto de confiança, pelo gosto que me inculuiu nas disciplinas de Química Orgânica e Química Farmacêutica que culminou nesta monografia, pela orientação de excelência que me deu ao longo deste trabalho e pela possibilidade de integrar no grupo de investigação Reatividade Orgânica e Química Medicinal do CCMar – Ualg num breve estágio extracurricular orientado pelo Doutor Pedro Horta e sem o qual seria impossível realizar a parte experimental desta tese.

Agradeço ao Doutor Pedro Horta a total disponibilidade e os ensinamentos que me transmitiu durante o mês que passámos juntos no laboratório e por me ter integrado em parte do seu projecto de doutoramento. O seu contributo foi essencial para enriquecer as minhas experiências pessoais e valorizar o meu trabalho prático.

Resumo

A malária é uma doença tropical cujos agentes causais são parasitas do género *Plasmodium*. A transmissão da doença envolve dois vectores infectados, neste caso mosquitos fêmea do género *Anopheles* e o hospedeiro humano. A malária afecta principalmente países em vias de desenvolvimento, nomeadamente nas regiões da OMS de África, Sudeste da Ásia e Este do Mediterrâneo. Ao comparar o número de casos de malária no mundo, entre 2000 (262 milhões de casos com 839 000 mortes) e 2015 (214 milhões de casos com 438 000 mortes) verificou-se um decréscimo acentuado na mortalidade. Contudo, apesar dos esforços da OMS e de outras organizações terem conduzido a resultados animadores, o objectivo da erradicação da doença ainda não foi atingido. A prevalência da doença é maior no continente africano, onde se observa também um maior índice de mortalidade, especialmente na região subsariana onde as condições ecológicas e sazonais contribuem para uma maior diversidade de vetores *Anopheles* e as condições sanitárias são ainda pouco favoráveis ao controlo da doença.

Entre os métodos de intervenção utilizados atualmente incluem-se o recurso a testes de diagnóstico rápido (RDT), implementados nas regiões endémicas como prática clínica comum para pacientes com suspeitas de malária, e a intensificação do recurso a ACT's como terapêutica de primeira linha no tratamento de infeções causadas por *P. falciparum*, principalmente em grupos suscetíveis como crianças e grávidas. No entanto, ao nível da quimioterapia existe uma crescente preocupação, devida ao aparecimento de estirpes de *P. falciparum* resistentes a fármacos de várias classes (multi drug resistant – MDR), incluindo 4-aminoquinolinas, antagonistas dos folatos, antibióticos e artemisininas, o que ameaça o uso racional de agentes antimaláricos com um equilíbrio entre custo e eficácia.

Perante a emergência de estirpes de *Plasmodium* resistentes, aposta-se em associações de fármacos para reduzir a seleção para resistência. Entre estas, os ACT's tornaram-se os principais fármacos no controlo da doença, pois os derivados de artemisinina apresentam elevadas propriedades antimaláricas, mas também um curto tempo de semi-vida (entre 40 e 60 minutos) o que compromete o seu uso em monoterapia.

Considera-se de extrema importância entender os mecanismos de resistência de estirpes MDR provenientes de polimorfismos em genes como *PfMDR1* (*P. falciparum* multidrug-resistance gene), *PfCRT* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) e *K13 propeller* (bomba de efluxo K13), de modo a investir na identificação de novos alvos de interesse e no desenvolvimento de novos quimiotipos para a profilaxia e terapêutica da malária. Esta temática é abordada nesta monografia.

A eficácia da combinação atovaquona/proguanilo suscitou um elevado interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de compostos que inibam o complexo bc_1 plasmodial e com propriedades farmacológicas melhoradas. Contudo já foram identificadas estirpes resistentes à combinação atovaquona/proguanilo, optando-se por realizar alterações estruturais de modo a melhorar a interação com o alvo, tornando a inibição da cadeia de eletrões mais eficaz. Uma das classes de compostos que mostrou potencial foram as 4-oxoquinolinas 3-éster substituídas em posições 6 e/ou 7. O autor desta monografia realizou um estágio extracurricular, desenvolvido no grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal do CCMar – Universidade do Algarve, no âmbito do qual procedeu à síntese de compostos desta classe. Este trabalho experimental, e a pesquisa bibliográfica que lhe esteve subjacente, constituíram a base para a realização desta tese.

Palavras-chave: 4-oxoquinolinas, citocromo bc_1 , síntese, malária, *PfMDR1*, resistência a fármacos.

Abstract

Malaria is a tropical disease caused by parasites from the *Plasmodium* genus. Disease transmission involves two infected vectors: female mosquitoes from the *Anopheles* genus and the human host. Malaria affects mainly under-developed countries, mostly in Africa, Southeast Asia and East Mediterranean. By comparing numbers of malaria cases across the world between 2000 (262 million cases with 839 000 deaths) and 2015 (214 million cases with 438 000 deaths) a marked decrease in mortality is evident. However, even though the efforts from WHO and other regions have led these positive results, malaria eradication remains an unfulfilled objective. Malaria's prevalence is greater in Africa, where the disease is responsible for the greatest mortality index, especially in the sub-Saharan region. Ecologic and seasonal conditions contribute for a greater *Anopheles* vector diversity and the sanitary conditions are unfavorable to control the disease in this part of the globe.

Some of the intervention methods used nowadays are: intensification of the use of artemisinin combination therapies (ACT's) as a first line treatment in *P. falciparum* infections, mainly in children and pregnant women and other susceptible groups; the use of rapid diagnosis tests (RDT), which are being implemented in endemic regions as a common clinical practice in patients with malaria symptoms. However, there's a growing concern in chemotherapy over the spread of *P. falciparum* multi drug resistant strains (MDR), which threaten the rational use of several antimalarial agents (4-aminoquinolines, folate antagonists, antibiotics and even artemisinines) in a cost-effective way.

To circumvent the problems caused by selection of resistance, drug associations started being used, like ACT's which became the frontline drugs in malaria control. Artemisinins possess high antimalarial potency but bear a short half-life time (40 to 60 minutes), rendering monotherapy a poor option.

Understanding drug resistance mechanisms from MDR strains that come from polymorphisms in genes like *PfMDR1* (*P. falciparum* multidrug-resistance gene), *PfCRT* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) and *K13 propeller* (K13 efflux pump) is a priority. In parallel, the identification of new therapeutic targets as well as of new chemotypes for prophylaxis and malaria chemotherapy are topics of intense research.

The success demonstrated by the association of atovaquone and proguanil has led to an increased interest by the scientific community in developing compounds that inhibit the complex bc_1 , with improved pharmacological properties. However the fast development of resistant strains to the atovaquone/proguanil combination boosted the need for further research towards the development of efficient inhibitors of the electron transporter chain. To this aim the 4-oxoquinoline 3-ester chemotype bearing substitutes in positions 6 and/or 7 showed potential. The author of this monograph has performed an extracurricular internship in the research group of Reatividade Orgânica e Química Medicinal do CCMar – Universidade do Algarve, where he carried out the synthesis of such compounds. This experimental work as well as the bibliographic research underlying it, formed a basis for the development of this thesis.

Key words: 4-oxoquinolines, cytochrome bc_1 , synthesis, malaria, *PfMDR1*, drug resistance.

Conteúdo

Resumo.....	iv
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Capítulo I: Introdução.....	1
1.1 Malária	1
1.2 Breve história e epidemiologia da Malária	2
1.3 Ciclo de vida e morfologia de Plasmodium sp.	3
1.4 Controlo e Prevenção da malária	6
1.5 Métodos de diagnóstico.....	10
1.6 Quimioprofilaxia.....	12
1.7 Tratamento da malária.....	14
Capítulo II: Quimioterapia e resistências	16
2.1 Antimaláricos de base quinolínica	16
2.2 Antagonistas dos folatos	20
2.3 Antibióticos	22
2.4 Inibidores da cadeia respiratória	24
2.5 Artemisininas.....	26
Capítulo III: Inibidores do complexo bc ₁ plasmodial com atividade antimalárica.....	29
3.1. O alvo terapêutico – citocromo bc ₁	29
3.2. Desenho e síntese de 4-oxoquinolinas com potencial na inibição do complexo bc ₁ plasmodial	31
3.3. Síntese de 4-oxoquinolinas 3-éster (quinolonas).....	35
3.3.1. Abordagem sintética e discussão dos resultados	35
3.3.2. Procedimentos de síntese detalhados	44
3.3.3. Considerações finais.....	50
Capítulo IV: Conclusão	50
Referências Bibliográficas	52

Índice de figuras

Figura I- 1 Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i> , no vetor e no hospedeiro humano	5
Figura I- 2.: Representação a 2D das estruturas moleculares da permetrina e deltametrina.	9
Figura I- 3 Representação a 2D da estrutura molecular do DEET.	9
Figura II- 1: Representação a 2D da estrutura molecular da quinina.	19
Figura II- 2: Representação a 2D das estruturas moleculares dos fármacos cloroquina, primaquina, amodiaquina e mefloquina.	19
Figura II- 3: Representação a 2D das estruturas moleculares da halofantrina e lumefantrina.	20
Figura II- 4: Representação a 2D das estruturas moleculares dos fármacos pirimetamina, proguanilo, cloroproguanilo e sulfadoxina.	22
Figura II- 5: Representação a 2D da estrutura molecular da dapsona.	22
Figura II- 6: Representação a 2D das estruturas moleculares dos antibióticos doxiciclina e clindamicina.	24
Figura II- 7: Representação a 2D da estrutura molecular da atovaquona.	26
Figura II- 8: Representação a 2D das estruturas moleculares dos derivados de artemisinina.	29
Figura III- 1: (a) Representação da estrutura da atovaquona (1) e interações responsáveis pela ligação da ATQ ao sítio Q ₀ bc ₁ , no modelo de levedura. (b) Representação de estrutura do sítio Q ₀ com energia minimizada. O citocromo b está representado em estrutura de laço, a laranja (com componentes ef e cd1 do Q ₀ indicados) e a proteína Rieske representada a verde. As pontes de hidrogénio estabelecidas com o ligando ATQ His-181 (Rieske) e Glu-272 (cyt b) estão representadas em tracejado e a molécula de água em ponte está representada como uma esfera azul.	31
Figura III- 2: Representação das estruturas moleculares dos compostos ELQ-300, ELQ-400 e ELQ-271.	33
Figura III- 3: Representação da estrutura molecular do composto endoquina, o composto modelo para o quimiotipo dos ELQ (endochin like quinolones).	34
Figura III- 4: Representação da estrutura molecular do composto HDQ.	34
Figura III- 5: Representação estrutural a 2D do modelo de 4-oxoquinolina 3-éster considerado no projeto laboratorial.	35
Figura III- 6: Esquema geral de síntese de 4-oxoquinolonas.	36
Figura III- 7: Esquema representativo da síntese do composto PH03.	36
Figura III- 8: Esquema representativo da síntese do composto PH57.	38
Figura III- 9: Esquema representativo da síntese do composto PH59.	39
Figura III- 10: Esquema representativo da síntese do composto PH60.	39
Figura III- 11: Esquema representativo da síntese do composto PH61.	40
Figura III- 12: Esquema representativo da síntese do composto PH62.	41
Figura III- 13: Esquema representativo da síntese do composto PH58.	42
Figura III- 14: Esquema representativo da síntese do composto PH63.	43
Figura III- 15: Esquema representativo da síntese do composto PH64.	43

Anexo 1a- 1	57
Anexo 1a- 2	57
Anexo 1a- 3	58
Anexo 1b- 1	58
Anexo 1c- 1	59
Anexo 2a- 1	60
Anexo 2a- 2	61
Anexo 2a- 3	61
Anexo 2b- 1	62
Anexo 3a- 1	63
Anexo 3a- 2	64
Anexo 3a- 3	64
Anexo 3a- 4	65
Anexo 3a- 5	65
Anexo 3a- 6	66
Anexo 3a- 7	66
Anexo 3a- 8	67
Anexo 3a- 9	67
Anexo 3a- 10	68
Anexo 3a- 11	68
Anexo 3b- 1	69

Lista de abreviaturas

A – Aminoácido alanina

ACT – Terapia de combinação baseada em artemisininas (Artemisinin Combination Therapy)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATQ - Atovaquona

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

CQ – Cloroquina

CRT – Cloroquine resistance transporter

CTE – Cadeia transportadora de electrões

CYP2C8 – Citocromo P4502C8

DCM – Diclorometano

DEEMM – Dietil etoximetilenomalonato

DEET – N,N-dietil-3-metilbenzamida

DHA – Dihidroartemisinina

DHFR – Dihidrofolato reductase

DHODH – Enzima dihidro-orotato desidrogenase

DHPS – Dihidropteroato sintase

E – Aminoácido ácido glutâmico

ELQ – Endochin like quinolone

F – Aminoácido fenilalanina

FIND – Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores

G – Aminoácido glicina

GI – Gastrointestinal

HDQ – Hidroxi-2-dodecil-4-(1H)-quinolona

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

I – Aminoácido isoleucina

INR – Tempo de protrombina

K – Aminoácido lisina, quando associado a números

L – Aminoácido leucina

LMF – Lumefantrina

MFQ - Mefloquina

MS – Espectroscopia de massa

N – Aminoácido asparagina

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

o.n. – Durante a noite (overnight)

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

p.e – Ponto de ebulição

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

PfCRT – *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

PfMDR1 – *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

PPQ – Piperaquina

P. vivax – *Plasmodium vivax*

Q₀ – Sítio de oxidação do ubiquinol

Q_i – Sítio de redução da ubiquinona

R – Aminoácido arginina

RDT – Testes rápidos de diagnóstico (rapid diagnosis tests)

RMN – Ressonância magnética nuclear

ROS – Radicais reactivos de oxigénio

S – Aminoácido serina

SAR – Relação estrutura actividade

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Polimorfismo de nucleótido único (single nucleotide polymorphism)

SP – Sulfadoxima-pirimetamina

T – Aminoácido treonina se associado a polimorfismos

TLC – Cromatografia de camada fina

THF – Tetrahidrofurano

V – Aminoácido valina

Y – Aminoácido tirosina

Capítulo I: Introdução

1.1 Malária

A malária é uma doença tropical infecciosa que afeta principalmente países em vias de desenvolvimento, cujos agentes causais são parasitas do género *Plasmodium*. A transmissão da doença faz-se pela picada de mosquitos fêmea do género *Anopheles* infetados, em hospedeiros humanos não imunes. Segundo o Relatório Mundial da Malária de 2015, da Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é endémica em 96 países e causou cerca de 839 mil mortes em 2015. Destaca-se um decréscimo na mortalidade em crianças com menos de 5 anos, tendo a doença causado cerca de 723 mil mortes no ano 2000 e apenas cerca de 306 mil no ano 2015, principalmente em África. Contudo, a malária ameaça ainda cerca de 3,2 biliões de pessoas. [2] Apesar de a população exposta ao parasita ter diminuído no último século, o número de pessoas em risco de contrair a doença aumentou de 0,8 milhões em 1900 para 3,2 biliões em 2015, como consequência directa do aumento da população em regiões endémicas. Assim, a malária é ainda um dos maiores problemas de saúde no mundo, em termos de morbilidade e mortalidade.

Existem 5 espécies de *Plasmodium* com capacidade para infetar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e ainda *Plasmodium knowlesi*. Esta última estirpe era conhecida por causar malária em primatas nos países do sudeste asiático, mas recentemente foi também identificada como causadora de malária em humanos. Contudo as duas espécies infetantes mais relevantes do ponto de vista clínico são o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium vivax*, sendo o *P. falciparum* responsável pela maioria das mortes por malária. [1] A distribuição de espécies patogénicas de *Plasmodium* indica a prevalência de *P. falciparum* em África enquanto que o *P. vivax* se sobrepõe ao *P. falciparum* na América do Sul. Em regiões tropicais de África pode existir co-infeção por *P. falciparum* e *P. malariae*, bem como infeções por *P. ovale*, encontrando-se este disperso nesta área do globo. Por sua vez o *P. knowlesi* parece estar confinado a florestas do sudeste asiático.

Relativamente à sintomatologia em indivíduos não imunes, os primeiros sintomas de malária surgem sensivelmente 7 dias após a picada por um mosquito infetado. Estes são normalmente febre, cefaleias, calafrios, tremores, vómitos e mal-

estar, podendo resultar em complicações graves tais como anemia, insuficiência renal e malária cerebral. Se não tratadas nas primeiras 24 horas, as infecções por *P. falciparum* progridem para um quadro clínico severo, geralmente com consequências fatais. [1]

1.2 Breve história e epidemiologia da Malária

Sabe-se que a malária é conhecida desde a antiguidade, pois existem descrições da doença gravadas em diversos papiros egípcios. O Papiro de Ebers (3550 AC) menciona febres e esplenomegalia, referindo o uso de óleo de árvores balmítes como repelente de mosquitos. Hieróglifos presentes em paredes de templos egípcios descreviam uma febre intermitente após as cheias do Nilo. Os gregos construíram cidades nas planícies, que foram devastadas pela doença. Em consequência, os gregos e romanos de posses passavam o verão em terrenos mais elevados, para escapar aos mosquitos e às febres inexplicáveis. A Inglaterra medieval presenciou inúmeros cruzados a debaterem-se e a sucumbirem, ao encontrarem a doença. Quando os europeus importaram escravos para o continente, estes vieram contaminados, o que aumentou o foco da doença, com consequências devastadoras. Ao longo da História estabeleceu-se a ligação entre as febres e os pântanos, logo especulou-se que a malária era contraída pela inalação do mau ar proveniente destes, ou *mal aria*. Os peritos especulam se a malária era endógena do Hemisfério Oeste antes da colonização espanhola na América, uma vez que parece pouco provável que as civilizações Maia e Olmec tenham prosperado em ambientes com um elevado foco de malária. E apesar de os conquistadores espanhóis não terem registo de febres nos anos iniciais da invasão, as regiões de Guaiacuil e Veracruz, onde estes aportaram, ficaram afetadas por crises agudas de paludismo. Os registos históricos e evidências actuais indicam que a malária causa mais mortes do que a guerra.

Até o final séc. XIX, não se realizou progresso em relação à etiologia da doença, no entanto em 1847 Meckel foi o primeiro a observar pigmentos de hemozoína no sangue e baço de um cadáver. Durante os 30 anos seguintes, cientistas e médicos pesquisaram diligentemente a causa e o modo de transmissão da doença, mas na altura a maior parte da investigação estava orientada pelo pressuposto da existência de um organismo infeccioso inoculado por água ou ar contaminado. No Norte de África,

Charles Laveran, um médico de exército francês, decidiu investigar mais profundamente o pigmento malárico, não apenas livre, no plasma, mas também no interior dos leucócitos e eritrócitos. Na sequência disso acabou por verificar que à medida que o pigmento aumentava no citoplasma dos eritrócitos estes tornavam-se mais pálidos, prova que refutava a teoria de que a malária era de facto uma bactéria (*Bacillus malariae*). Também visualizou a formação de gâmetas masculinos por exflagelação, o que confirmava a natureza protozoária do agente infetante. No entanto a comunidade científica não aceitou a hipótese proposta por Laveran, que só anos mais tarde, em 1885, viria a ser reconhecida, quando Camillo Golgi diferenciou entre espécies de *Plasmodium* e demonstrou a sincronia do parasita em relação aos paroxismos. [3]

Não é uma tarefa simples estimar o impacto global da malária, particularmente em países subdesenvolvidos, onde a recolha e publicação de informação tem qualidade e fiabilidade duvidosas. Nos países endémicos, em que a prevalência é elevada, a malária tende a ser subdiagnosticada, pois os sintomas de malária crónica podem ser confundidos com outras patologias mais comuns. Por outro lado, pode também ocorrer diagnóstico excessivo, uma vez que inúmeros diagnósticos de malária não são confirmados por microscopia ou testes de diagnóstico rápido (RDT), os métodos recomendados pela OMS como confirmação ao diagnóstico. Outro problema é a falta de população em denominador, o que torna complicado prever a verdadeira incidência da doença. A informação presente nos World Malaria Reports da OMS apenas estima a incidência e a mortalidade, no entanto são bons marcadores para avaliar o cumprimento dos programas de controlo da malária e estimar o impacto nos sistemas de saúde. [4]

1.3 Ciclo de vida e morfologia de *Plasmodium* sp.

O ciclo de vida de *Plasmodium* sp., representado esquematicamente na figura I-1, envolve dois hospedeiros: um invertebrado (mosquito fêmea *Anopheles* sp.) e um vertebrado (répteis, mamíferos ou aves). O invertebrado é o hospedeiro definitivo, visto que a reprodução sexuada ocorre no mesmo. A reprodução assexuada ocorre nos tecidos do vertebrado, que é o hospedeiro intermediário. *Plasmodium* sp.

provavelmente derivaram de um coccídio ancestral cujo reprodução sexuada e assexuada sucediam no mesmo hospedeiro, presumivelmente um vertebrado. [3]

Pode dividir-se o ciclo de vida de *Plasmodium* em três fases: a fase sexuada **(C)**, conhecida como o ciclo esporogónico, que decorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), e duas fases assexuadas que decorrem no hospedeiro humano: o ciclo exoeritrocítico **(A)** que ocorre no fígado, e o ciclo eritrocítico **(B)**, em que o parasita se desenvolve no interior dos eritrócitos. [5]

A transmissão da malária ocorre quando a fêmea de mosquito *Anopheles*, durante uma refeição sanguínea, inocula no hospedeiro saliva contendo esporozoítos, a forma infecciosa do parasita (1). Após a sua injeção na corrente sanguínea, os esporozoítos alojam-se no parênquima do fígado ou de outros órgãos internos, de acordo com a espécie de *Plasmodium* infectante. Por meio de uma proteína membrana do esporozoíto (proteína do circum-esporozoíto) estabelece-se a ligação aos receptores no domínio basolateral do hepatócito. O esporozoíto tem na sua constituição orgânicas cujos conteúdos, função e biogénese as tornam análogas aos grânulos lisossomais encontrados em células de mamíferos, com o objetivo de facilitar a sua penetração nas células do hospedeiro.

Após a entrada no hepatócito os esporozoítos sofrem uma série de replicações por reprodução assexuada (esquizogonia) durante 1 a 2 semanas (2), diferenciando-se em merozoítos, criando células multinucleadas denominadas esquizontes (3). Algumas espécies de *Plasmodium* produzem também hipnozoítos que permanecem dormentes nos hepatócitos por longos períodos de tempo e provocam recidivas da doença. Após a saída dos merozoítos por lise do hepatócito (4) estes são libertados para a corrente sanguínea e começam o ciclo eritrocítico, com a invasão dos eritrócitos (5), diferenciam-se novamente em trofozoítos, que se alimentam da hemoglobina presente até finalizarem o estágio de crescimento vegetativo e se desenvolverem em esquizontes com merozoítos diferenciados. De seguida, os eritrócitos infetados morrem por lise (6), libertando entre desperdícios metabólicos do parasita, como a hemozoina, novos merozoítos que podem invadir outros eritrócitos, perpetuando o ciclo eritrocítico.

Alguns eritrócitos infetados quebram o ciclo de reprodução assexuada, pois os merozoítos presentes nestes desenvolvem-se para as formas sexuadas do parasita: gametócitos masculino (microgametócito) e feminino (macrogametócito) (7). O mosquito fêmea *Anopheles* ingere-os durante uma refeição sanguínea no hospedeiro humano (8), no lúmen intestinal do mosquito os eritrócitos sofrem lise e libertam os gametócitos, que se convertem em gâmetas, as formas sexuais maduras de *Plasmodium* sp. O microgâmeta e o macrogâmeta fundem-se (9), levando à formação de um zigoto diplóide que se desenvolve numa forma haplóide e móvel, o oocineto (10), e penetra a parede intestinal para produzir um oocisto. O crescimento e divisão dos oocistos leva ao desenvolvimento de milhares de esporozoítos (11) (forma haplóide). Ao fim de 8 a 15 dias os oocistos quebram e os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito (12), onde se preparam para serem inoculados no hospedeiro humano e reiniciar o ciclo celular. [6]

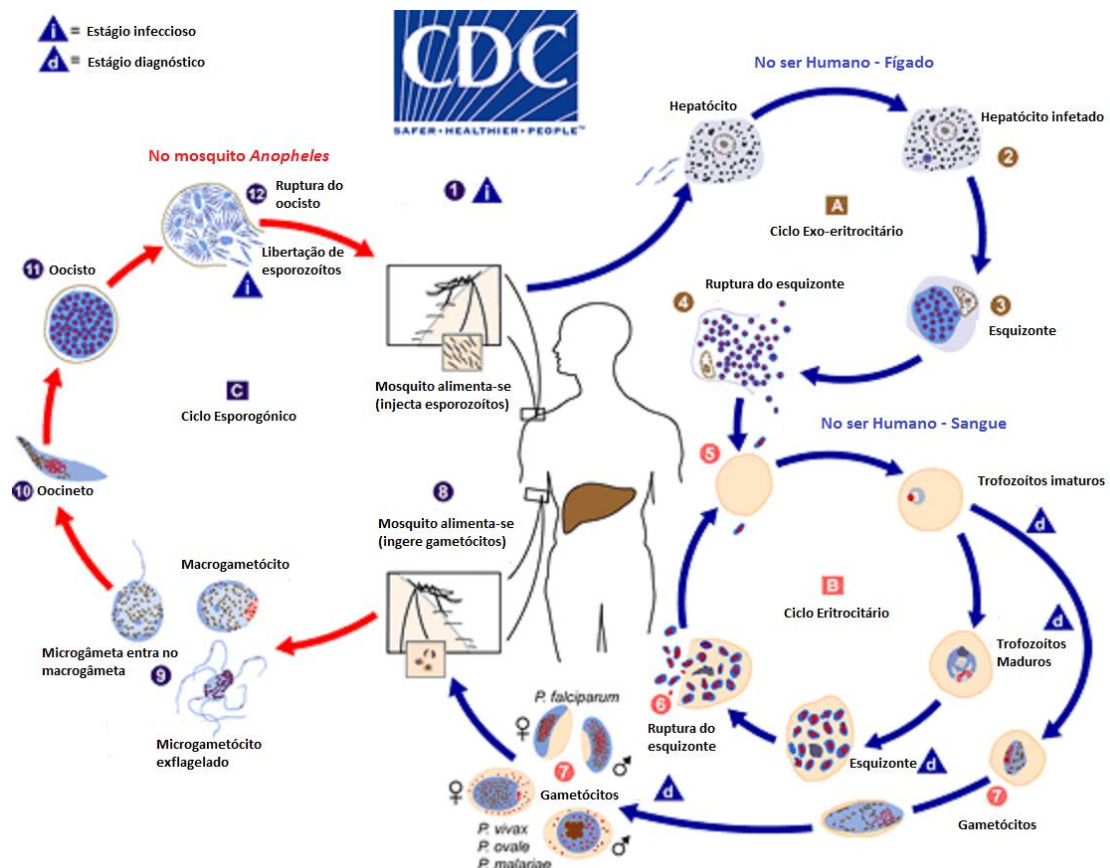


Figura I- 1 Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium* sp., no vetor e no hospedeiro humano

1.4 Controlo e Prevenção da malária

A prevenção da malária incide em duas vertentes: protecção contra mordeduras de mosquitos fêmea *Anopheles sp.* e profilaxia com terapêutica antimalárica. No entanto, os profissionais de saúde pública recomendam que crianças e grávidas evitem viajar para áreas endémicas. Apesar de estarem disponíveis vacinas e quimioterapia profilática como meios de prevenção da doença, os profissionais de saúde devem sempre aconselhar aos pacientes medidas de protecção contra mosquitos, se viajarem para regiões endémicas. [7]

Entre algumas medidas de protecção recomendam-se: evitar surtos, ou seja, evitar focos de transmissão da doença. Para tal, o viajante deve informar-se com profissionais de saúde sobre os padrões de transmissão e as regiões mais afetadas; estar informado dos picos de exposição aos vetores, no caso da malária, durante as alturas de crepúsculo (nascer e pôr do sol), e de preferência evitá-los ou proteger a pele com repelente de insectos contendo dietiltoluamida (DEET) ou picaradina, e vestuário apropriado; idealmente, dormir em espaços fechados, protegidos com redes à prova de mosquitos em portas e janelas ou, se tal não for possível cobrir as camas com redes mosquiteiras impregnadas de permetrina; recorrer ao uso de roupas tratadas com permetrina nas 24 a 48 horas anteriores, para permitir que sequem. [8]

As piretrinas são inseticidas naturais produzidos pelas flores de crisântemo e que podem ser isolados num extracto de piretro. São geralmente utilizadas como produtos inseticidas para controlo de pragas em habitações. Podem obter-se outros piretróides a partir destes compostos, por semissíntese, tais como a permetrina e a deltametrina (Figura I-2), que apesar de apresentarem uma estrutura molecular semelhante às piretrinas são mais tóxicos para artrópodes e mamíferos. Contudo, por terem um maior tempo de permanência no ambiente, são mais indicados para pulverização residual de interiores (PRI). O mecanismo de ação dos piretróides está relacionado com a hiperexcitação nervosa, que desencadeia tremores e, posteriormente, paralisia nos insetos. Tal atinge-se por bloqueio ao nível da bomba Na^+/K^+ ATPase, o que impede que o sódio volte para o espaço intracelular e mantém a membrana em potencial de acção, levando ao estímulo neuromuscular e por fim à paralisia total do inseto. A toxicidade sistémica dos piretróides nos mamíferos, atingida por via inalatória e absorção cutânea, é baixa. Contudo, alguns piretróides podem

causar marcada neurotoxicidade. Apesar da baixa absorção, a principal razão para a baixa toxicidade dos piretróides é a sua rápida biodegradação por enzimas hepáticas de mamíferos, seguida de rápida eliminação renal dos metabolitos. Existem propostas de diversos mecanismos de toxicidade analisados em sistemas *in vitro*, nomeadamente: a concentrações de 10^{-10} M ocorre libertação de noradrenalina provocada por alteração dos canais de sódio e cloro; a concentrações de 10^{-7} M ocorre despolarização da membrana e apoptose celular. [9] [10] [11]

A N,N-dietil-3-metilbenzamida, com estrutura molecular representada na Figura I-3, é um composto usado como repelente de insetos, que causa irritação nos olhos e membranas mucosas mas não na pele exposta. Todas as formulações de DEET registadas para aplicação direta na pele contêm concentrações que variam entre 4 e 100%. É um composto relativamente seguro, se usado conforme as recomendações do produto, tendo uma duração de ação de 1 a 3 horas para concentrações de 20%, de até 6 horas para concentrações de 30% e de até 12 horas para concentrações de 50%. Os efeitos tóxicos manifestam-se no SNC. O mecanismo de ação de DEET não foi ainda elucidado, no entanto testes *in vitro* confirmaram que possui atividade como inibidor de acetilcolinesterase. Os sintomas de toxicidade devidos ao DEET podem manifestar-se a diferentes níveis, nomeadamente: pode surgir urticária ou irritação cutânea associada a rubor, uma sintomatologia comum que desaparece com a lavagem do produto da pele; no entanto podem também surgir sintomas mais severos, que incluem erupção cutânea, queimaduras e cicatrizes permanentes, normalmente mais habituais em pessoas que usam repelentes contendo elevadas quantidades de DEET e por longos períodos de tempo; nos olhos, os sintomas são semelhantes aos da pele, ou seja, rubor e irritação com sensação de ardor, que devem ser ultrapassados com abundante lavagem com água. Contudo os sintomas mais graves são os sistémicos, que surgem por ingestão e ocorrem a nível gástrico, cardiovascular e do sistema nervoso central (SNC). É relevante acrescentar que o DEET, aplicado a concentrações inferiores a 20%, sofre uma perda de efeito repelente aquando da reaplicação regular, a cada 2 horas, de protetor solar. Para maior segurança deve recorrer-se a produtos com concentrações superiores a 33% de DEET pois verifica-se que estes não perdem eficácia por uso concomitante de protetor solar. Logo, deve-se

aconselhar aos viajantes o uso de produtos que contenham protetor solar e repelente de insetos, tendo em conta que o repelente pode perder efeito se apenas se renovar a proteção solar. [12] [13] [14]

Outra importante medida na prevenção de malária para viajantes que decidam visitar regiões endêmicas é a quimioprofilaxia. Os protocolos de quimioprofilaxia recomendam a toma de medicamentos antes, durante e após o período da viagem, pois ao iniciar-se a administração antes da viagem garante-se que o fármaco esteja a circular na corrente sanguínea antes da potencial exposição ao agente causal. Na escolha do regime de quimioprofilaxia, o profissional de saúde deve ter em consideração vários fatores, nomeadamente se a pessoa vai viajar para uma parte do mundo em que existe malária e se nessa região estão reportados casos de resistência a certos antimaláricos. [15]

A resistência do *P. falciparum* à cloroquina está confirmada em todas as regiões em que esta estirpe é prevalente, com a exceção das Caraíbas, América Central a Oeste do Canal do Panamá e em alguns países do Médio Oriente. A resistência a sulfadoxina/pirimetamina está difundida na bacia do rio Amazonas, na América do Sul, em grande parte do sudeste asiático, e noutras regiões do continente asiático, bem como em grandes áreas do continente africano. Relativamente à mefloquina, a resistência foi confirmada nas fronteiras da Tailândia com Burma (Myanmar) e com o Camboja, nas províncias orientais do Camboja, nos estados ocidentais de Burma e na fronteira entre Burma e a China, bem como no sudoeste do Vietname. A resistência de *P. vivax* à cloroquina está confirmada na Papua Nova Guiné e na Indonésia. Abordar-se-ão de seguida, mais em detalhe, as opções para quimioprofilaxia da malária bem como o seu tratamento. [16]

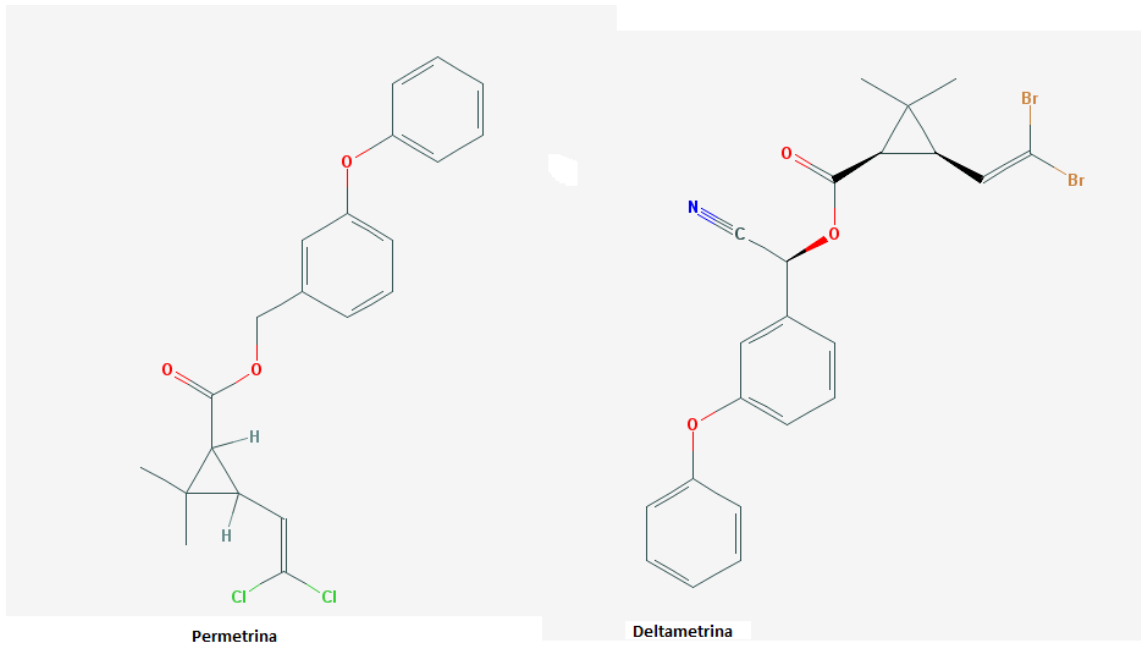


Figura I- 2.: Representação a 2D das estruturas moleculares da permetrina e deltametrina.

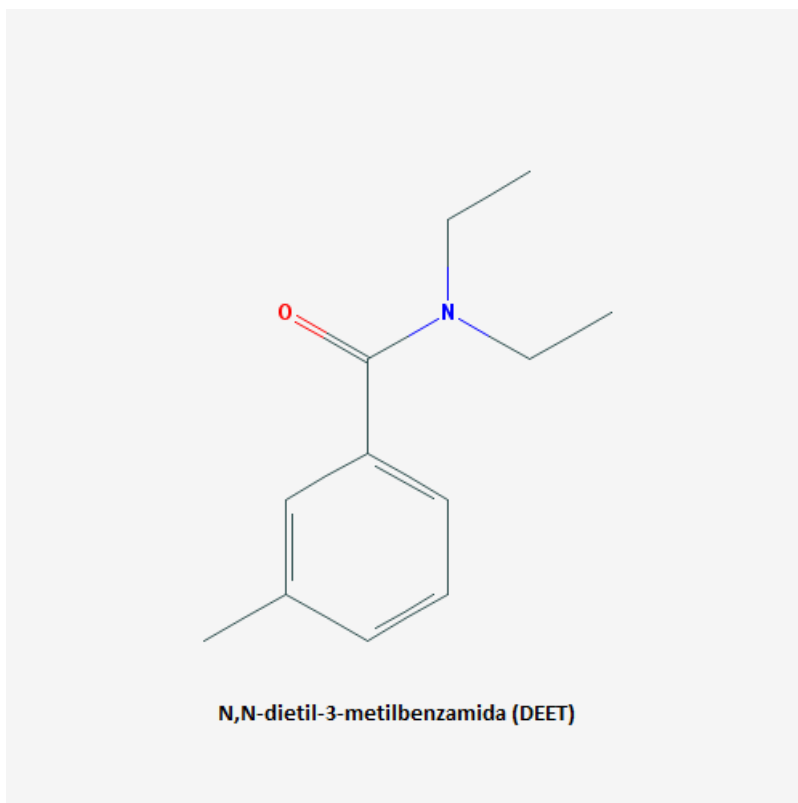


Figura I- 3 Representação a 2D da estrutura molecular do DEET.

1.5 Métodos de diagnóstico

Por recomendação da OMS, deve realizar-se sempre o diagnóstico de malária, através de testes rápidos de diagnóstico (RDT's) ou microscopia ótica, antes de iniciar o tratamento. A este nível, os RDT's são mais simples de executar e interpretar, produzem resultados imediatos, necessitam de operadores com treino limitado e permitem um diagnóstico a nível comunitário, sendo por conseguinte mais práticos do que a microscopia ótica na deteção e controlo da doença nas regiões endémicas.

Os RDT's detetam antigénios específicos produzidos pelo parasita que estão presentes no sangue de organismos infetados. Existe uma grande variedade de RDT's, sendo que alguns detetam uma única espécie (*P. falciparum* ou *P. vivax*), outros detetam várias espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) e alguns ainda distinguem entre as infeções causadas por *P. falciparum* e as causadas por outra espécie. O sangue obtido para o teste é de origem capilar, através de punção de um dedo, e os resultados estão disponíveis após 15 a 30 minutos.

Recentemente, a prática de RDT's têm sido fortemente implementada ao longo do globo. De acordo com o relatório World Malaria Report 2015 da OMS, as vendas de RDT's atingiram valores acima dos 300 milhões. Destes, 62% foram testes específicos para *P. falciparum* e 38% foram testes de combinação. A maioria dos testes foram utilizados em África, visto ser a região mais afetada por malária.

De forma a apoiar o esforço dos ministérios da saúde de países endémicos, algumas associações subordinadas à ONU, tais como a OMS, a Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores (FIND) e o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC's) estabeleceram um esquema de avaliação dos RDT's, pré e pós compra, de modo a garantir e manter o controlo de qualidade dos resultados. Este serviço é complementado por instituições de saúde pública e de investigação nos países endémicos. Como resultado das avaliações periódicas à performance dos RDT's, a sua qualidade tem melhorado bastante. [17]

A microscopia permite a identificação de várias espécies de parasitas, como o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, e também permite identificar o parasita em várias fases, inclusive os gametócitos. Permite ainda a quantificação da densidade do parasita no organismo para monitorização da resposta à terapêutica. Por esta razão é o método de escolha na investigação de falhas no tratamento para a malária. Recorre

à coloração de Giemsa e o diagnóstico necessita de examinação do filme fino e espesso do mesmo paciente. [18]

A microscopia ótica é o método padrão com o qual todos os outros métodos de diagnóstico são comparados. Contudo, apesar de continuar a ser o principal método de diagnóstico, em grandes hospitais e clínicas a qualidade do diagnóstico é muitas vezes inadequada para garantir uma boa sensibilidade e especificidade para a malária, o que compromete a otimização dos recursos e tem consequências negativas ao nível da saúde dos doentes. Um serviço de microscopia aceitável deve ser económico e produzir resultados precisos e suficientemente rápidos para terem um impacto direto no tratamento, sendo por isso essencial a implementação de um programa de controlo de qualidade. [19]

Apesar dos esforços a nível do controlo e prevenção da malária terem causado uma redução substancial no número de casos de malária na América Central, continuam a ocorrer transmissões de baixo nível de *P. vivax* e *P. falciparum*. Nas Honduras, o *P. vivax* é responsável pela maioria dos casos de malária, sendo o *P. falciparum* responsável por 10 a 15% dos casos. A microscopia é o método de diagnóstico mais usado nestes casos. Os RDT's foram recentemente introduzidos, contudo o seu uso está limitado a estudos de vigilância, excepto em áreas remotas, em que se recorre aos RDT's para diagnóstico clínico de rotina, com confirmação obrigatória por microscopia.

Apesar de ser o método de referência e apresentar uma sensibilidade e especificidade adequadas, bem como a possibilidade de quantificar a parasitémia, a microscopia ótica pode falhar na deteção de infeções cruzadas, principalmente quando uma das espécies está presente em baixos níveis. Como tal, em alguns laboratórios de referência tem-se recorrido a testes moleculares como ferramentas complementares de diagnóstico. Os esforços para a eliminação de malária nas regiões de baixa transmissão, como a América Central, aumentaram a necessidade da introdução destes métodos moleculares, cuja elevada sensibilidade permite deteção de níveis subclínicos de parasitémia em portadores assintomáticos. [20]

1.6 Quimioprofilaxia

De entre as opções terapêuticas disponíveis para a quimioprofilaxia da malária destaca-se a combinação de atovaquona com proguanilo, Malarone™, uma combinação fixa de antimaláricos em que a toma deve ser iniciada 1 a 2 dias antes da viagem para a região de risco e deve ser continuada diariamente, sempre à mesma hora, durante a estadia e até 7 dias após a mesma. A terapêutica é bem tolerada e os seus efeitos secundários são raros, contudo por vezes são reportados sintomas como dor abdominal, náusea, vômitos e dores de cabeça; esta terapia está contra-indicada durante a gravidez, em crianças com peso inferior a 5Kg e em pacientes com a função renal comprometida, com uma *clearance* da creatinina inferior a 30 mL/min. O proguanilo pode aumentar a biodisponibilidade de a varfarina, por um mecanismo não clarificado, e conseqüentemente o seu efeito, logo é aconselhável o ajuste da dose ou a monitorização do tempo de protrombina (INR).

O fosfato de cloroquina ou sulfato de hidroxicloroquina podem ser usados na prevenção da malária em regiões em que a seleção de resistência para a cloroquina não se verifique; alguns países nestas condições incluem o Afeganistão, Argélia, Angola, Bangladesh, Bolívia, Botswana, Brasil, Burkina Faso, entre outros. A profilaxia deve iniciar-se 1 a 2 semanas antecedendo a viagem e continuar-se semanalmente, no mesmo dia da semana, durante a viagem e nas 4 semanas posteriores. Os efeitos secundários mais relatados incluem distúrbios gastrointestinais, cefaleias, tonturas, visão turva, insónia e prurido, no entanto estes sintomas não costumam requerer a substituição da terapêutica. Elevadas doses de cloroquina, como as usadas em artrite reumatóide, têm sido associadas a retinopatia. Todavia, este efeito secundário é raro quando a cloroquina é usada para a profilaxia da malária. Quem sofre efeitos secundários desconfortáveis após a toma de cloroquina pode tolerar melhor o fármaco após as refeições ou substituir o fármaco por um derivado, o sulfato de hidroxicloroquina, que apresenta maior tolerância.

Outra opção terapêutica é a doxiciclina, em que a profilaxia se inicia 1 a 2 dias antes da viagem. É um medicamento de toma diária, tal como a combinação de atovaquona e proguanilo, e a terapêutica deve ser continuada 4 semanas após a

viagem. Existe pouca informação relativamente à eficácia da profilaxia antimalárica com compostos análogos à minociclina, prescrita para acne. As pessoas em regimes prolongados deste fármaco que necessitem de quimioprofilaxia devem suspender a minociclina, 1 a 2 dias antes da viagem, e substituí-la pela doxiciclina. Entre os efeitos adversos destes fármacos registam-se a fotosensibilidade, que pode ser minimizada moderando-se a exposição directa ao sol e usando proteção solar. Pode diminuir-se a frequência de infeções vaginais provocadas por leveduras, e os sintomas gastrointestinais (náusea e emese) através da toma após uma refeição ou substituindo o fármaco por um dos seus derivados, doxiciclina monohidratada ou hclato de doxiciclina com revestimento gástrico. Estes fármacos estão contra-indicados em pessoas com alergia às tetraciclina, durante a gestação e em crianças com idade inferior a 8 anos.

Por último temos a mefloquina, cuja toma em regime de profilaxia se inicia nas 2 semanas anteriores à viagem, de toma semanal e com suspensão da terapia apenas 4 semanas após a viagem. É um fármaco que, em doses profiláticas, está associado a efeitos adversos raros mas graves, como psicoses. Os efeitos são mais frequentes com o aumento da dosagem, nos casos de tratamento. Outros efeitos secundários incluem distúrbios gastrointestinais, cefaleias, insónia, distúrbios visuais, depressão, distúrbios de ansiedade e tonturas. Outros distúrbios neuropsiquiátricos relatados nos testes de farmacovigilância *postmarketing* incluem neuropatias sensoriais e motoras (parestesias, tremores e ataxia), agitação, alterações de humor, ataques de pânico, confusão ou alucinações, que persistem após a suspensão da terapêutica, e que devem levar à revisão da terapêutica. A mefloquina é contra-indicada em pessoas com hipersensibilidade ao composto e a compostos análogos, ou com depressão ativa ou recente historial de depressão, distúrbios de ansiedade, psicose, esquizofrenia ou outros problemas relevantes do foro psiquiátrico. Deve usar-se com precaução em utentes com historial de distúrbios psiquiátricos ou de depressão. [15] [16]

1.7 Tratamento da malária

As estratégias para tratamento da malária têm sofrido evolução ao longo dos tempos, devido essencialmente à capacidade de seleção para resistências exibida por *Plasmodium sp.* Todos os países onde a malária é endémica tiveram de atualizar as suas políticas de tratamento com fármacos clássicos, como a cloroquina, a amodiaquina e a sulfadoxima-pirimetamina (SP), passando a utilizar essencialmente os ACT's (Artemisinin Combination Therapy) recomendados recentemente pela OMS. As terapias de combinação à base de artemisimina são geralmente bem toleradas e extremamente eficazes, o que contribuiu para a redução da morbidade e mortalidade da malária a nível global. No entanto, a deteção de estirpes resistentes à artemisimina no sudeste do continente asiático ameaça os benefícios destas terapêuticas. Como tal surgiram recomendações para opções terapêuticas alternativas, baseadas em evidência científica e publicadas pela OMS.

No caso de infeções por *P. falciparum* sem complicações, caracterizadas pela presença de sintomas e por um teste parasitológico positivo, seja por RDT ou por microscopia, mas sem características de malária severa, o objectivo clínico para o tratamento é curar a infeção o mais rapidamente possível, evitando que esta progrida para doença severa, eliminando todos os parasitas do organismo.

ACT é uma combinação de um derivado de artemisimina, potente mas de curta duração de ação com um fármaco parceiro com maior tempo de semi-vida, mais lentamente eliminado. A artemisimina elimina rapidamente a maior fração dos parasitas na corrente sanguínea, tendo efeito tanto nas formas assexuadas como nas formas sexuadas que perpetuam o ciclo no mosquito *Anopheles sp.* O fármaco parceiro elimina os restantes parasitas e proporciona proteção contra seleção para resistências para o derivado de artemisimina. Para além disso, como tem uma maior semi-vida também garante efeito profilático pós-tratamento. As 5 formulações para ACT recomendadas para tratamento de malária sem complicações são: arteméter + lumefantrina; artesunato + amodiaquina; artesunato + mefloquina; artesunato + sulfadoxima-pirimetamina (SP) e dihidroartemisimina + piperaquina. É aconselhada uma duração de tratamento de 3 dias, pois cobre dois ciclos assexuados do parasita, o que garante que apenas uma pequena fração de parasitas permanece para eliminação pelo fármaco parceiro, o que reduz a probabilidade de selecção para resistências.

Existem sub-populações, como as crianças, grávidas e doentes a tomar potentes indutores enzimáticos (ex. efavirenz, rifampicina), que têm farmacocinéticas modificadas, o que pode influenciar a eficácia do tratamento. Com o aumento da falha da terapêutica e da consequente seleção para resistências é importante estabelecerem-se regimes terapêuticos para o tratamento correto destas populações especiais. O período de maior preocupação, devido ao potencial teratogénico, é o primeiro trimestre da gravidez. Os fármacos considerados mais seguros durante a gestação são a quinina, a cloroquina, a clindamicina e o proguanilo. O regime terapêutico mais seguro no tratamento de malária causada por *P. falciparum* sem complicações consiste em quinina + clindamicina, em concentrações de 10 mg/Kg de peso corporal, durante 7 dias. Nos casos em que a terapêutica anterior não está disponível, ou falha, existe a alternativa de um ACT, artesunato oral + clindamicina. Em mulheres a amamentar, a concentração de fármaco que passa para o leite é residual, no entanto a tetraciclina está contra-indicada nestes casos devido ao seu potencial efeito nefasto a nível do desenvolvimento ósseo e dentário.

Em crianças com massa corporal inferior a 5 Kg o regime terapêutico recomendado consiste num ACT com a mesma dosagem em mg/Kg de massa corporal que a usada para crianças com 5 Kg de massa corporal. Relativamente à escolha do fármaco parceiro SP, este deve ser evitado nas primeiras semanas de vida porque substitui competitivamente a bilirrubina e pode causar hiperbilirrubinemia. As tetraciclina são contra-indicadas durante a infância pelas razões anteriormente referidas e a primaquina deve ser evitada nos primeiros seis meses de vida, pois há escassez de dados relativamente à sua toxicidade em crianças.

Por último, em pacientes co-infectados com HIV, as interacções medicamentosas devem ser tidas em consideração. Há resultados positivos de estudos usando trimetoprim + sulfametoxazol como profilaxia, em adultos e crianças infectados com HIV, em regiões com elevadas taxas de resistência a anti-folatos. Nestes doentes é de evitar terapêutica com artesunato + amodiaquina, se estiverem a tomar zidovudina ou efavirenz, devido ao risco aumentado de desenvolver neutropenia. Também existem registos de hepatotoxicidade na administração

concomitante de efavirenz com esta ACT, que pode ser devido a uma inibição do metabolismo da amodiaquina mediada pelo CYP2C8, causada pelo anti-retroviral. [21]

Capítulo II: Quimioterapia e resistências

2.1 Antimaláricos de base quinolínica

Os fármacos de base quinolínica surgiram com a descoberta do quinino (fig. II-1), um composto natural extraído da casca de árvores do género *Cinchona* cuja estrutura é caracterizada por um sistema bicíclico fundido que inclui um anel heterocíclico quinolínico. O quinino impulsionou o desenvolvimento de novas quinolinas sintéticas, com uma estrutura mais simplificada e propriedades farmacológicas melhoradas, tais como a cloroquina, a primaquina, a amodiaquina e a mefloquina, cujas estruturas moleculares estão representadas na Figura II-2. A halofantrina e a lumefantrina, também antimaláricos quinolínicos, apresentam maiores semelhanças estruturais com o quinino, sendo baseadas em sistemas de anéis de fenantreno e fluoreno, respetivamente, e representadas na Figura II-3. Todos estes compostos, com a exceção da primaquina, interferem com o processo de destoxificação do grupo heme pelo *Plasmodium*, inibindo a polimerização da hemozoína. Contudo, podem estar envolvidos outros alvos terapêuticos no mecanismo de ação destes fármacos. O antimalárico de base quinolínica de referência é a cloroquina. Foi a primeira 4-aminoquinolina sintética disponível clinicamente (em 1947), tendo proporcionado um substituto adequado para o quinino, com uma menor toxicidade associada e maior facilidade de obtenção do que o quinino. A CQ é considerada um dos fármacos de maior sucesso, sendo um composto seguro e de produção económica, e foi responsável pela cura de milhões de pessoas com malária. Atualmente, o seu uso contra *Plasmodium falciparum* está restrito ao norte de África, América Central e nas Caraíbas, onde o fármaco ainda mantém atividade terapêutica contra o parasita. A resistência à CQ foi reportada inicialmente na Colômbia e na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, em 1957, e pouco tempo depois alastrou-se à fronteira entre a Colômbia e a Venezuela. Entre os finais de 1970 e de 1980 a resistência de *P. falciparum* à cloroquina invadiu todo o continente africano. As quinolinas antimaláricas interferem com o sequestro do grupo heme, produzido durante a digestão da hemoglobina pelo

parasita e tóxico para este. No vacúolo digestivo do *Plasmodium* o heme é dimerizado, formando dímeros de β -hematina, que depois complexam por um processo de biomineralização, formando o pigmento malárico hemozoína. A CQ e os seus análogos ligam-se ao heme inicialmente formado, impedindo o seu processo de destoxificação, que envolve dimerização e posterior cristalização. Os complexos formados entre o fármaco e o heme são prejudiciais para as membranas e enzimas do parasita. Durante anos, acreditou-se que o desenvolvimento de resistências à cloroquina por estirpes de *Plasmodium* se devia a uma maior acumulação da CQ nos vacúolos digestivos de parasitas sensíveis, comparativamente a parasitas resistentes. A procura da base genética do *Plasmodium* que conferia resistência aos antimaláricos de base quinolínic culminou, em 2000, na descoberta do gene *pfcr*, responsável pela codificação da proteína CRT (Chloroquine Resistance Transporter). O gene *pfcr*, localizado no cromossoma 7, é extremamente polimórfico, possuindo mais de 20 diferentes posições e gerando assim mais de 20 sequências proteicas distintas. [22], [23], [25]

Desde a descoberta da importância da proteína *P. falciparum* CRT (PfCRT), desenvolveram-se vários estudos de campo para encontrar polimorfismos com relevância clínica. Verificou-se que todas as estirpes resistentes à CQ examinadas exibiam a alteração de um resíduo aminoácido de lisina por um resíduo de treonina no codão 76 (K76T), e que a presença desta mutação determinava uma resposta clínica à CQ insuficiente. Quando se reverteu a mutação em parasitas resistentes, os parasitas voltaram a apresentar sensibilidade para a CQ. [24]

Os mais recentes estudos de transfeção demonstraram que a extensão da resistência à CQ depende do fundo genético das linhas parasitárias, sendo que em certos fundos a mutação K76T não provoca falha da terapêutica mas causa maior tolerância à CQ. Um dos modelos de mecanismo de resistência mais consensuais é a hipótese de alterações no efluxo do fármaco carregado, em que a carga positiva do aminoácido lisina na posição 76 (K76) limita o efluxo da CQ, uma base fraca diprótica que no ambiente ácido do vacúolo exibe duas cargas positivas. Se a carga de K76 for substituída por um aminoácido com uma cadeia lateral sem carga positiva, como K76T, a CQ^{2+} pode abandonar o vacúolo através do gradiente de concentração, por via do transportador de efluxo CRT. No entanto, se ocorrer uma mutação noutra região da

proteína pode restaurar-se uma carga positiva, o que compensa a alteração gerada pelo K76T e reverte o fenótipo de resistência. No sudeste asiático identificou-se uma estirpe de *P. falciparum* sensível à cloroquina com a alteração S163R, no quarto domínio transmembranar da CRT, que também contém a mutação K76 que condiciona a resistência à CQ. Verificou-se que alguns compostos, entre os quais o verapamilo, conseguem reverter a resistência à cloroquina nos parasitas *P. falciparum* (Martin, S. K., Oduola, A. M. J., and Milhous, W. K.(1987) *Science* 235, 899-901), por exibirem regiões lipofílicas e positivamente carregadas, o que lhes permite competir com a CQ pela ligação ao PfCRT, retardando o efluxo do fármaco do vacúolo digestivo. Para além disso, o mecanismo de ação do verapamilo também envolve um aumento na concentração de cloroquina nos eritrócitos infectados com o parasita resistente. A CQ é uma base diprótica fraca que se acumula em organelos acídicos, tais como os vacúolos digestivos do *P. falciparum*, devido ao gradiente de pH entre o citosol do parasita e o organelo. O verapamilo causa um aumento na concentração de CQ nos eritrócitos infectados, por manipular o seu pH externo e, desse modo, alterar o gradiente de pH, ou seja, tornar o meio mais ácido, o que leva à acumulação da CQ, tanto em trofozoítos sensíveis como em resistentes ao fármaco. [26], [27], [29]

Um estudo (Veiga *et al.*, 2016) usando linhas celulares de *P. falciparum* geneticamente modificadas com controlos isogénicos mostrou que a mutação no gene PfMDR1 N86Y modula a sensibilidade do parasita a vários antimaláricos de primeira linha. A mutação N86Y aumenta a suscetibilidade à lumefantrina, mefloquina e dihidroartemisinina, contudo induz resistência à amodiaquina e cloroquina. A mutação Y184F no gene PfMDR1 resulta num menor impacto nas linhas celulares, contudo verifica-se um decréscimo na suscetibilidade de *P. falciparum* à PPQ quando a mutação está em ligação com o resíduo N86 do mesmo gene. Em parasitas que exprimem o genótipo wild-type N86 do PfMDR1 verificou-se um aumento 3 a 4x superior em valores de IC₅₀ para LMF e MFQ, comparativamente ao genótipo mutante N86Y. A informação obtida é consistente com a genotipagem associada a estudos de terapias de combinação realizados com isolados de África e da Ásia, sendo evidente a predominância do alelo N86 em doentes com infeções recorrentes após quimioterapia com a associação dos fármacos arteméter e lumefantrina. [28]

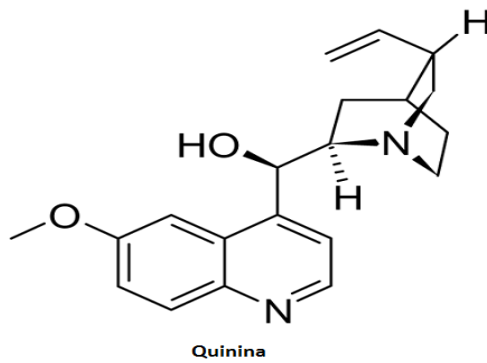


Figura II- 1: Representação a 2D da estrutura molecular da quinina.

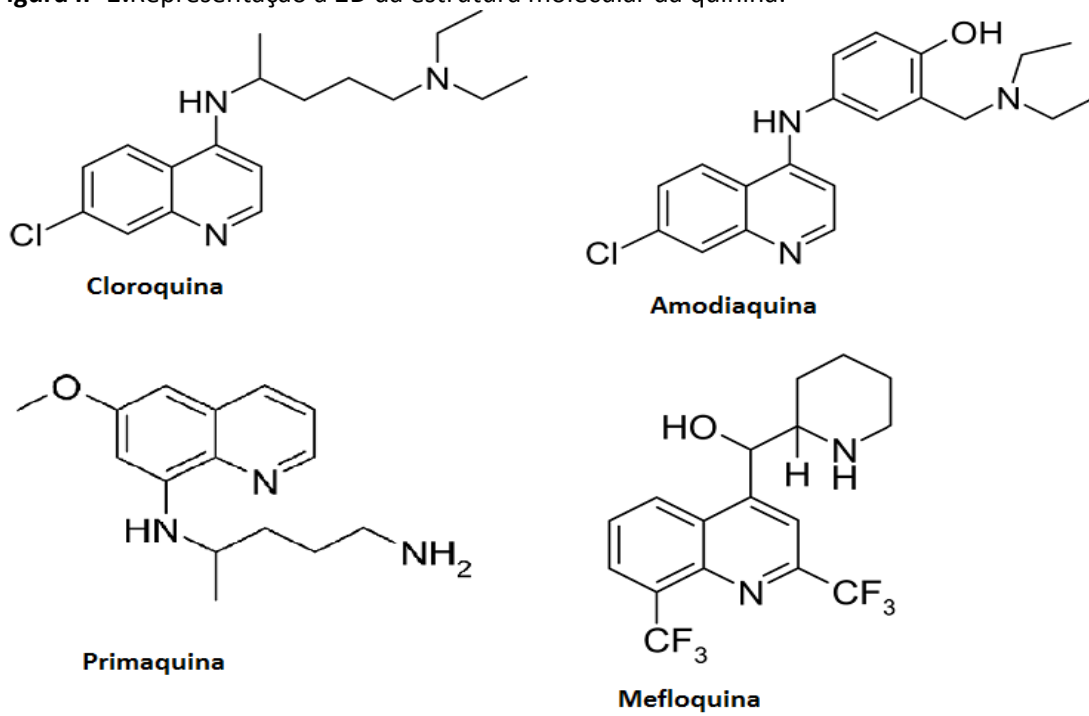


Figura II- 2: Representação a 2D das estruturas moleculares dos fármacos cloroquina, primaquina, amodiaquina e mefloquina.

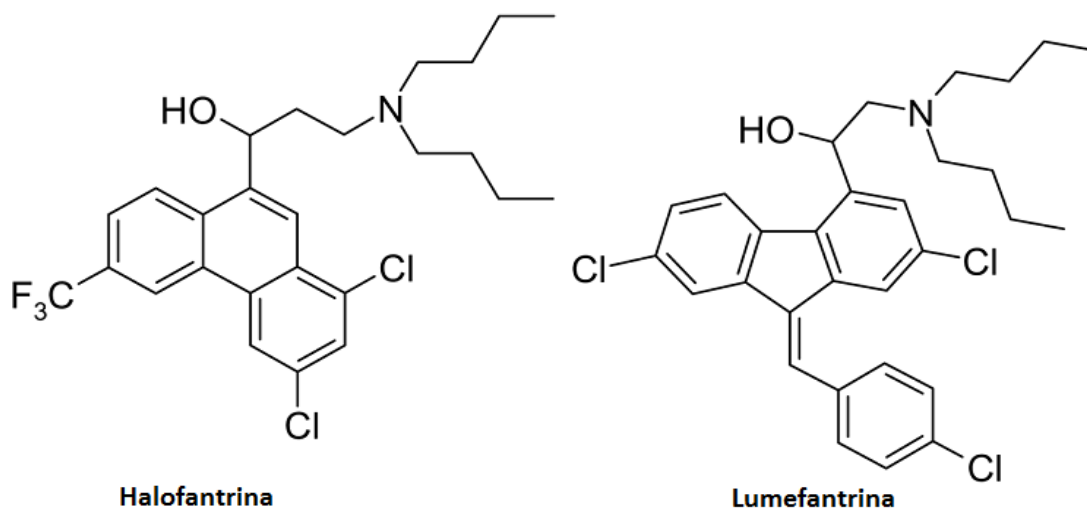


Figura II- 3: Representação a 2D das estruturas moleculares da halofantrina e lumefantrina.

2.2 Antagonistas dos folatos

Os fármacos deste grupo inibem a síntese de purinas, pirimidinas e aminoácidos, o que vai interferir na síntese de ADN e na síntese proteica. Apesar de o mecanismo geral ser semelhante, ou seja, o bloqueio da síntese de tetrahidrofolato, um co-factor importante nas reações de síntese das purinas e pirimidinas, existem 2 grupos de antagonistas dos folatos, dependendo da enzima que inibem. Os dois grupos de fármacos incluem: (i) os fármacos da família das diaminopiridinas e biguanidas, como a pirimetamina, o proguanilo e o cloroproguanilo, que inibem a enzima dihidrofolato redutase (DHFR); e (ii) alguns fármacos da família das sulfonamidas, tais como a sulfonamida, a sulfadoxina (fig. II-4) e a dapsona (fig. II-5), que inibem a enzima dihidropteroato sintase (DHPS). Podem ser administrados simultaneamente fármacos dos 2 grupos, de modo a retardar a seleção para resistências e aumentar a eficácia terapêutica. A utilização destes fármacos está geralmente restrita a meio hospitalar.

Investigações ao nível do gene *dhfr* culminaram na sequenciação do fenótipo sensível e do fenótipo resistente no *P. falciparum*, demonstrando que a seleção para resistência à pirimetamina é devida a mutações pontuais no gene. Foi sequenciada a DHFR derivada do clone 3D7, sensível à pirimetamina, e também alguns isolados com graus distintos de resistência ao fármaco, (Cowman et al.,1988). No clone sensível 3D7 existe uma serina no codão 108, ao passo que nos isolados resistentes verificou-se a substituição da serina por uma asparagina (S108N). Outros isolados mais resistentes

apresentaram mutações adicionais nos códons: 51 (N51I), 59 (C59R) e 164 (I164L). A substituição da isoleucina por leucina no codão 164 não resultou em efeito substancial na ligação da pirimetamina. Um estudo publicado por outro grupo revelou que as mutações N51I e C59R, ao nível da DHFR, conferem maiores níveis de resistência à pirimetamina do que apenas a mutação S108N ([Peterson et al., 1988](#)), o que corrobora a proposta de que as mutações pontuais no gene *dhfr* originam resistência ao fármaco.

A resistência ao cicloguanilo está associada a mutações pontuais no gene *dhfr*, com substituição de um resíduo de alanina por uma valina, no codão 16 (A16V) e de uma serina por treonina no codão 108 (S108T). As mutações pontuais associadas a resistências à pirimetamina também conferem resistência cruzada ao cicloguanilo. Análises a amostras de isolados demonstraram que as mutações A16V e S108T estão restritas a amostras da América do Sul, pois este fármaco é extensivamente utilizado nesta região, comparativamente a África e ao sudeste asiático.

O gene *dhps* tem sido menos estudado do que o *dhfr*, contudo a forma mais comum de resistência à sulfadoxina também é a presença de mutações pontuais no domínio *dhps* do gene *dhps-pppk*. Em isolados de referência de *P. falciparum*, verificaram-se alterações em 5 aminoácidos diferentes: serina-436 para alanina ou fenilalanina (S436A/F), alanina-437 para glicina (A437G), lisina-540 para ácido glutâmico (K540E), alanina-581 para glicina (A581G) e alanina-613 para serina ou Treonina (A613S/T). Nem todas as mutações foram testadas isoladamente relativamente ao seu efeito na resistência do parasita, todavia todas as alterações testadas aumentam a resistência à sulfadoxina, bem como a outras sulfonamidas, entre as quais a sulfona dapsona. A resistência *in vivo* a sulfadoxina/pirimetamina (SP) observa-se em parasitas com mutações pontuais nos códons 108, 51 e 59 do gene *dhfr*, sendo a resistência aumentada por mutações pontuais nos códons 437 e/ou 540 ou 437 e/ou 581 do gene *dhps*. Níveis elevados de resistência a SP estão associados à seleção da mutação no codão 164 do *dhfr*, mas esta mutação não é comum no continente africano. Através de dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos, conseguiu-se demonstrar que a seleção desta mutação está associada a um decréscimo de eficácia no antifolato recentemente desenvolvido, Lapdap[®], uma associação de cloroproguanilo e dapsona. Num estudo recente, recorrendo a PCR em

tempo real, foi observada a presença da mutação 164 em isolados de *P. falciparum* do Malawi, o que indica que esta mutação está a ser selecionada em África. Resta saber qual será a progressão desta mutação pelo continente africano, e como afetará a eficácia do Lapdap[®]. [22], [30], [31]

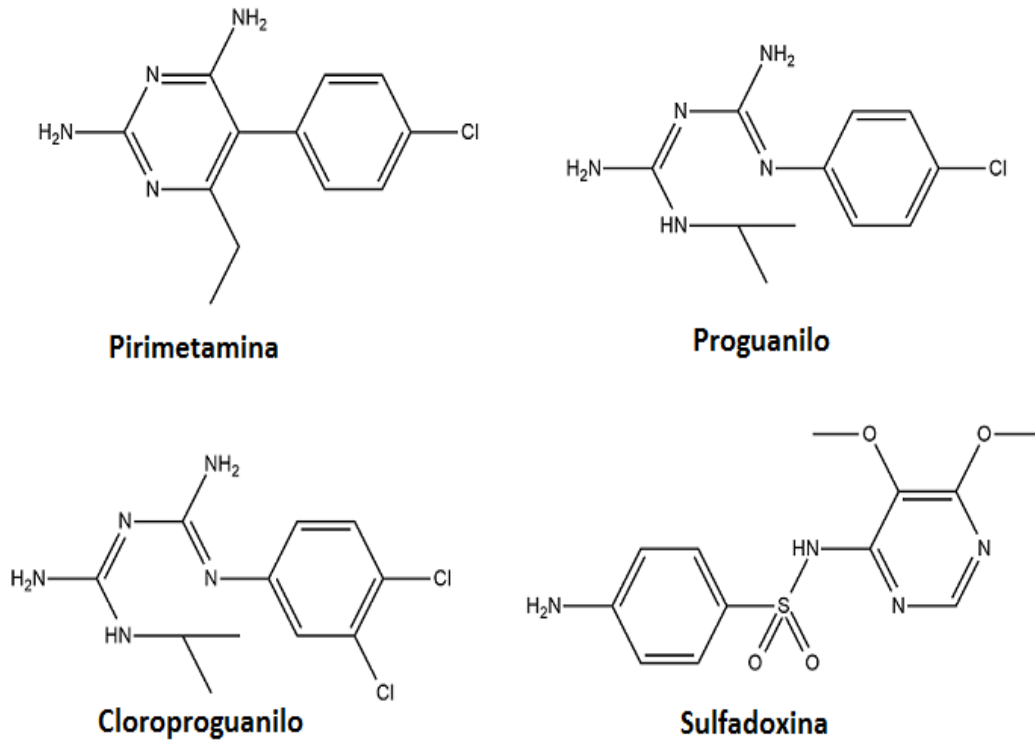


Figura II- 4: Representação a 2D das estruturas moleculares dos fármacos pirimetamina, proguanilo, cloroproguanilo e sulfadoxina.



Figura II- 5: Representação a 2D da estrutura molecular da dapsona.

2.3 Antibióticos

Alguns antibióticos apresentam efeito antimalárico através da sua ação na maquinaria de biossíntese proteica da mitocôndria, no procariota e/ou no seu

apicoplasto. O apicoplasto é um organelo que evoluiu de cloroplastos. A análise do genoma pertencente ao apicoplasto e da sua relação filogenética com genes de outros organismos revelou a sua proximidade com o genoma de algas. Atualmente sabe-se que o apicoplasto consiste num organelo com funções de biossíntese de heme, ácidos gordos e difosfato de isopentenilo. [31] A maioria dos antibióticos não exerce efeito visível no primeiro ciclo intracelular, mas no segundo ciclo os parasitas são mortos, após invadirem a célula do hospedeiro. Devido a este efeito retardado, a clearance parasitária e a febre têm uma duração mais longa, comparativamente aos casos tratados com antimaláricos clássicos (aproximadamente 4 dias em vez de 2 dias), quando os antibióticos são usados em regime de monoterapia. Como este atraso pode ser fatal em doentes não imunes, para quimioterapia de malária aguda esta classe apenas é utilizada em regime de terapêutica de combinação, em associação com fármacos que possuam ação mais rápida, como a quinina, o artesunato ou a fosmidomicina. Nestas combinações, o antimalário de ação mais rápida reduz a carga de parasitas, enquanto o antibiótico elimina os restantes parasitas, inclusive os menos sensíveis ao fármaco com menor semi-vida. A doxiciclina, em combinação com a quinina ou artesunato, é uma opção válida para tratamento de casos de malária sem complicações, ou mesmo para casos graves de malária. O fármaco também é utilizado na quimioprofilaxia da malária, quando a mefloquina está contra-indicada ou em áreas com estirpes de *P. falciparum* multirresistentes. A clindamicina é considerada segura na gravidez e em crianças, pelo que surge como alternativa à doxiciclina nestes casos. É recomendada por autoridades e comités nacionais, em regime de terapêutica de combinação, usando um antimalário de ação rápida como parceiro na associação. Contudo, devido ao seu curto tempo de semi-vida não tem utilidade como agente quimiprolático. As estruturas dos fármacos doxiciclina e clindamicina estão representadas na Figura II-6. [32]

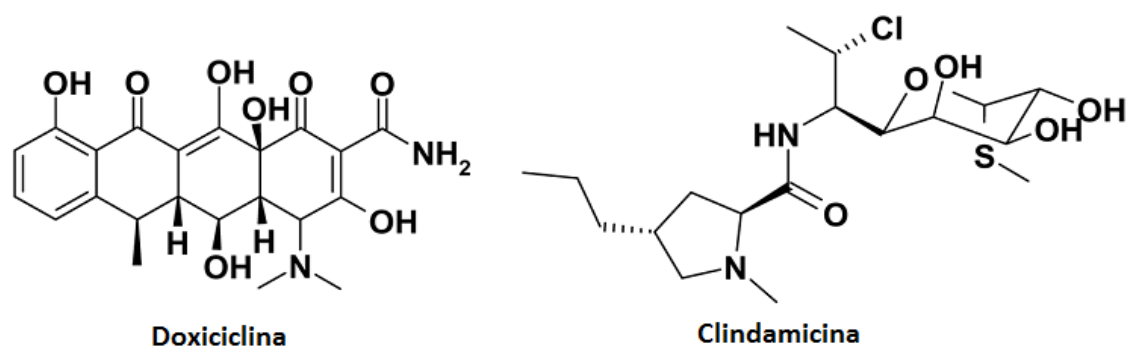


Figura II- 6: Representação a 2D das estruturas moleculares dos antibióticos doxiciclina e clindamicina.

2.4 Inibidores da cadeia respiratória

A atovaquona é uma hidroxinaftoquinona (fig. II-7) que inibe a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, o que causa uma quebra no potencial de membrana do organelo. Liga-se ao sítio de ligação da ubiquinona, no complexo citocromo bc₁, e bloqueia o movimento de um cluster de ferro-enzofre, contendo um domínio proteico responsável pelo transporte de elétrons. O uso de atovaquona em ensaios clínicos, em regime de monoterapia, demonstrou conduzir a uma rápida seleção para estirpes resistentes de *P. falciparum*, o que resultou em falhas da terapêutica na ordem dos 30%. Nas estirpes resistentes, o sítio de ligação Q₀ sofre alteração por substituição de um aminoácido, reduzindo a sensibilidade do complexo citocromo bc₁ para a atovaquona num índice 1000x superior. Existe um forte sinergismo entre atovaquona e as biguanidas não metabolizáveis, tais como o proguanilo e o cloroproguanilo. Recentemente desenvolveu-se uma teoria relativamente ao mecanismo deste sinergismo: quando a cadeia transportadora de elétrons, dominante em estabelecer o potencial de membrana mitocondrial, é inibida pela atovaquona, a reposição do potencial de membrana ocorre por uma via alternativa, envolvendo hidrólise de ATP e troca do ADP₃ gerado contra ATP₄ pelo transportador ATP/ADP. Contudo, esta via sofre inibição pelo proguanilo, resultando numa quebra imediata e irreversível do potencial de membrana. Através desta associação, comercializada pela GSK sob a designação Malarone™, a seleção para estirpes resistentes é reduzida. Todavia, assim que uma estirpe se torna resistente à atovaquona também apresenta resistência à associação. A combinação

atovaquona/proguanilo é usada na profilaxia e tratamento de malária sem complicações, sendo também eficaz nos estádios iniciais do parasita, o que permite uma profilaxia causal com a combinação. Devido à baixa hidrossolubilidade da atovaquona, recomenda-se a sua toma em conjunto com uma refeição contendo alto teor de lípidos. Estes fármacos possuem em geral boa tolerabilidade, com poucos efeitos secundários graves relatados. A prevalência de mutações no gene do citocromo b que conferem resistência à combinação é baixa, sendo inferior a 1% nos isolados primários. [32]

No estudo realizado por Babet Schwöbel [33] usando uma amostra sanguínea de um doente masculino de 28 anos infetado com *P. falciparum*, foi detetada evidência de recidiva após tratamento com Malarone™. Clonou-se então e sequenciou-se a região codificante do citocromo bc₁ extraída do parasita. A sequência exibiu um SNP, com uma alteração de Timina-Adenina-Timina para Timina-Citosina-Timina no codão 268 resultando numa substituição do resíduo de aminoácido tirosina para serina (Y268S). As mutações no codão 268 do gene do citocromo bc₁ de *Plasmodium* estão associadas a uma falha de terapêutica da associação atovaquona/proguanilo *in vivo* e podem usar-se como marcador de resistência. Contudo é fundamental mais pesquisa em isolados de campo para determinar a função do codão 268 na seleção de estirpes resistentes à atovaquona/proguanilo. [33]

A eficácia da combinação atovaquona/proguanilo suscitou um elevado interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de compostos que inibam o complexo bc₁ e com propriedades farmacológicas melhoradas. Uma das classes de compostos que mostrou potencial foram as 4-oxoquinolinas -3 éster substituídas em posições 6 e/ou 7. O autor desta monografia realizou um estágio extracurricular, desenvolvido no grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal do CCMar – Universidade do Algarve, no âmbito do qual procedeu à síntese de compostos desta classe. Este trabalho experimental, e a pesquisa bibliográfica que lhe esteve subjacente, constituíram a base para a realização desta tese. O trabalho experimental desenvolvido está descrito no capítulo III.

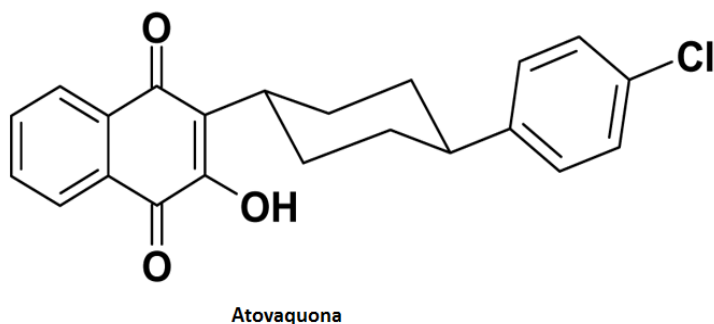


Figura II- 7: Representação a 2D da estrutura molecular da atovaquona.

2.5 Artemisininas

A artemisinina é um fármaco antimalárico de base endoperoxídica obtido a partir da planta artemísia (*Artemisia annua*). Devido a problemas de solubilidade, são usados em terapêutica derivados deste composto natural, com propriedades melhoradas a nível de administração. Os derivados semi-sintéticos de artemisinina mais usados em clínica incluem o artesunato de sódio (hidrossolúvel) e o arteméter (lipossolúvel). Estes e outros derivados da artemisinina são obtidos por redução da sub-estrutura de lactona ao seu hemiacetal, dihidroartemisinina, e subsequente metilação deste para obtenção do acetal arteméter, ou acilação para o hemiéster de ácido succínico, artesunato. As estruturas das artemisininas referidas estão representadas na Figura II- 8. Ambos os compostos são rapidamente transformados *in vivo* em dihidroartemisinina, que possui um curto tempo de semi-vida (entre 40 e 60 minutos). [32] Este curto tempo de semi-vida está na base das recidivas encontradas, na sequência da administração destes compostos em regimes de monoterapia.

O modo de ação das artemisininas continua sob intenso debate. Contudo, é consensual que a ligação peróxido das artemisininas é o farmacóforo, que após sofrer clivagem catalisada por Fe (II) intraparasitário ou heme produz radicais livres de oxigénio (ROS), que se demonstrou rearranjarem de modo a formar radicais centrados em carbono. [32] Estas espécies radicalares têm elevada capacidade alquilante, modificando múltiplos alvos moleculares, como proteínas e heme, no vacúolo digestivo do parasita. Em estudos conduzidos por Schlitzer e colaboradores [32] as artemisininas foram também implicadas na inibição de uma bomba de cálcio (PfATP6)

no retículo endoplasmático do parasita. Atualmente, os derivados de artemisinina são os fármacos mais ativos no combate à malária, sendo sempre usados em combinação com outros antimaláricos de ação mais prolongada, de modo a prevenir recidivas e seleção para estirpes resistentes. Os fármacos de associação mais utilizados são a amodiaquina, a lumefantrina e a mefloquina. Nos EUA, a combinação de arteméter (20 mg) e lumefantrina (120 mg) foi aprovada em 2009 para terapia de malária causada por *P. falciparum*, com o nome de marca Coartem®. Atualmente, a resistência a artemisininas ainda não é considerada clinicamente relevante. Contudo, foram reportados episódios na fronteira Tailândia-Cambodja que tiveram um efeito alarmante na comunidade de parasitologistas. [32]

No decorrer de um estudo realizado por Isozumi e colaboradores [34], foram observadas 4 novas mutações não-sinónimas e 5 novas mutações sinónimas no gene *K13 propeller*, altamente conservado, de parasitas *P. falciparum* provenientes do Oeste do Quênia. Arie e colaboradores [35] notaram que a frequência dos alelos mutantes está correlacionada com a prevalência de positividade ao 3º dia após tratamento com ACT em doentes no Cambodja, sendo que estas mutações reflectem seleção de estirpes não sensíveis. O estudo revelou 17 alelos mutantes no gene *K13 propeller*, que codifica para uma bomba de efluxo. Dos alelos mutantes revelados, as mutações C580Y, R539T e Y493H revelaram ser prevalentes e estar relacionadas com uma clearance parasitária diminuída *in vivo*. A maioria destas mutações são incompatíveis com o ciclo de vida do parasita, tendo-se verificado que algumas destas mutações permitiram a sobrevivência de estirpes com seleção para resistência à artemisinina. [34]

Num estudo realizado por Falq e colaboradores [36] isolaram-se 16 amostras positivas para *P. falciparum*, sendo que apenas 11 se encontravam em condições de ser analisadas para mutações. Das 11 amostras analisadas, 6 apresentavam o alelo mutante K13 (C580Y), associado a resistência a derivados de artemisinina. Concluiu-se que os indivíduos assintomáticos constituem um reservatório para estirpes resistentes à artemisinina, sendo que os casos que suportam esta proposta foram reportados nas regiões este e oeste do distrito de Chey Saen, no Cambodja, o que indica que, as mutações associadas à bomba de efluxo K13 não estão restritas a uma área limitada.

Estes resultados indiciam uma eficácia limitada para a associação DHA-PPQ como primeira linha de tratamento na maior parte do Camboja, sendo certo que a falência de terapêutica associada a seleção para estirpes resistentes se tem deslocado da fronteira Tailândia-Camboja para o Norte do Camboja. Estes dados comprometem a confiança da comunidade médica internacional na eficácia da associação DHA-PPQ como primeira linha de tratamento na região do Camboja, pois ao verificar-se seleção para resistência à DHA, aumenta também a pressão sobre o fármaco parceiro, culminando em falência da terapêutica por seleção de estirpes de *P. falciparum* resistentes à PPQ. [36]

Na sequência de um estudo Veiga e colaboradores [28] reportaram evidências de que a mutação N86Y do gene PfMDR1 é responsável por alterar a resposta do *P. falciparum* à dihidroartemisinina (DHA), causando um decréscimo dos valores de IC₅₀ de 1,5x em comparação com os parasitas isogênicos N86, ou seja, os parasitas com a mutação têm a nível do PfMDR1 apresentam maior suscetibilidade à DHA. Este fenómeno difere da resistência à artemisinina mediada por mutações a nível do gene *K13 propeller*, que se manifestam em suscetibilidade reduzida à DHA nos estágios de anel (trofozoítos imaturos). As mudanças no IC₅₀ demonstram que o *pfmdr1* reduz a suscetibilidade do parasita na fase de trofozoíta, uma vez que a degradação de hemoglobina é mais intensa, resultando num aumento das concentrações intracelulares de ião Fe²⁺, proveniente do heme, capaz de ativar os derivados de artemisinina. [28]

Arteméter é uma molécula mais lipofílica do que a artemisinina, e bastante mais do que o artesunato. É facilmente absorvida pelo trato GI, permitindo administração oral. Atualmente, a aplicação de arteméter em combinação com a lumefantrina é o único ACT disponível que demonstra conformidade com as normas de Boas Práticas de Fabrico. A combinação é administrada em 6 doses, num período de 3 dias. Neste regime, o arteméter cobre dois ciclos assexuais do parasita, conduzindo a uma redução de carga parasitária na ordem de 10⁸. Após as 72 horas iniciais verifica-se que as artemisininas foram eliminadas do organismo, pelo que a partir deste limiar, o sucesso da terapêutica é totalmente dependente da lumefantrina, estando condicionado pela quantidade de lumefantrina reabsorvida a nível gastrointestinal,

que por sua vez está dependente da toma concomitante com alimentos de alto teor lipídico. [32]

Artesunato é um fármaco instável no ambiente *in vivo*. O éster succínico é clivado pelas esterases, libertando a dihidroartemisinina como agente ativo. Sendo um sal de um ácido carboxílico, o artesunato é um fármaco hidrossolúvel que pode ser administrado por via IV, pelo que é crucial no tratamento de malária severa, principalmente em ambiente hospitalar, em doentes cuja condição física não permite outra via de administração. [32]

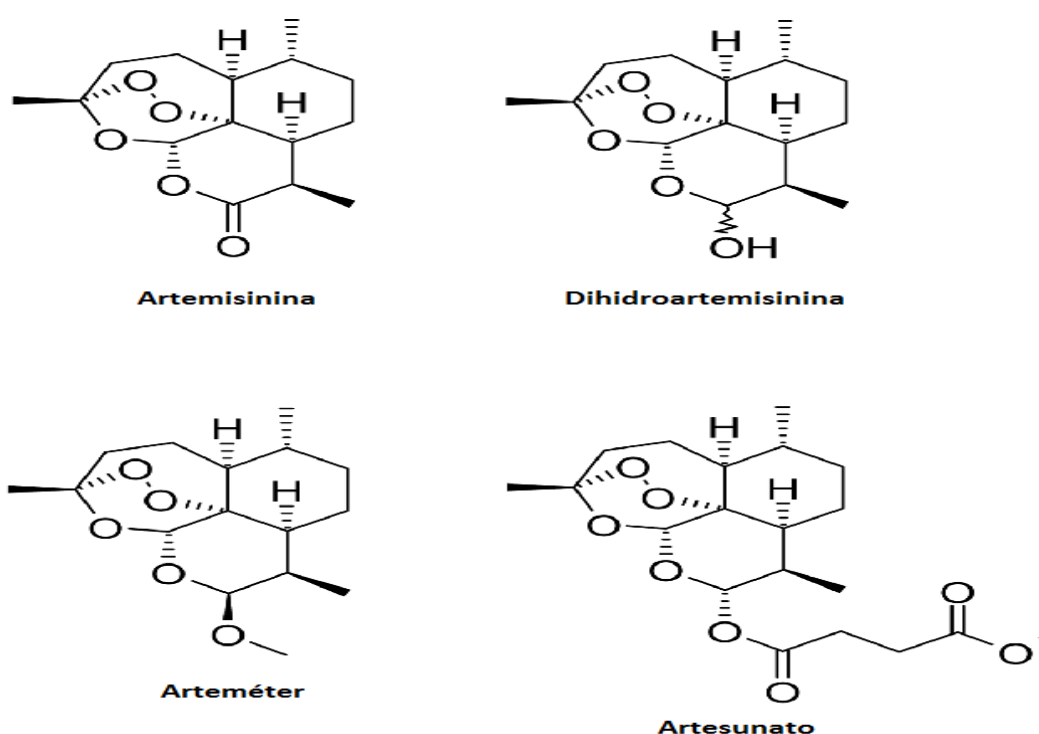


Figura II- 8: Representação a 2D das estruturas moleculares dos derivados de artemisinina.

Capítulo III: Inibidores do complexo bc_1 plasmodial com atividade antimalárica

3.1. O alvo terapêutico – citocromo bc_1

O citocromo bc_1 (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase, complexo respiratório III) é uma enzima fundamental da cadeia transportadora de eletrões (CTE) em todos os metazoa e inúmeros fungos e protozoa. O complexo bc_1 é responsável por

catalisar a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c. A transferência de elétrons está acoplada à translocação vetorial de prótons ao longo da membrana interna mitocondrial. O complexo contém dois sítios de ligação à quinona, o sítio de oxidação do ubiquinol (Q_0) e o sítio de redução da ubiquinona (Q_i), em extremos opostos da membrana. O citocromo b, subunidade central, acomoda as bolsas de ligação para Q_0 e Q_i . Como consequência direta da inibição do complexo bc_1 , suspende-se a transferência de elétrons pela cadeia respiratória, ou seja, esgotam-se as reservas de intermediários redutores (NADH) e o potencial de membrana do parasita colapsa. Sem o complexo bc_1 a funcionar para oxidar o ubiquinol, não ocorre a oxidação da dihidro-orotato desidrogenase (DHODH), pois esta necessita de ubiquinona oxidada como aceitador de elétrons para o DHODH. Isto culmina numa inibição da biossíntese de pirimidinas e na morte do parasita. [37]

Os fármacos da classe das hidroxinaftoquinonas, classe a que pertence a atovaquona (ATQ), foram pioneiros na inibição da cadeia respiratória por antagonismo competitivo da região Q_0 . Estes fármacos causam uma alteração conformacional irreversível na proteína Rieske Fe-S, que a torna semelhante ao citocromo b, impedindo transferência de elétrons para o citocromo c_1 . As falhas da terapêutica com ATQ estão associadas a mutações no sítio de ligação do fármaco ao citocromo b. Estas mutações desestabilizam as interações hidrofóbicas intermoleculares entre a ATQ e o domínio de ligação na proteína ou alteram o volume da bolsa hidrofóbica (fig. III-1), impossibilitando uma ligação adequada do fármaco com o domínio de ligação. Uma opção válida no desenho de hidroxinaftoquinonas que não sejam afetadas por estas mutações é alterar o alvo terapêutico para a proteína Rieske Fe-S, uma subunidade da bolsa de ligação do citocromo b, codificada por ADN nuclear e que apresenta menor frequência de mutações espontâneas comparativamente ao ADN mitocondrial. [38] A estrutura das novas hidroxinaftoquinonas seria ajustada ao novo alvo.

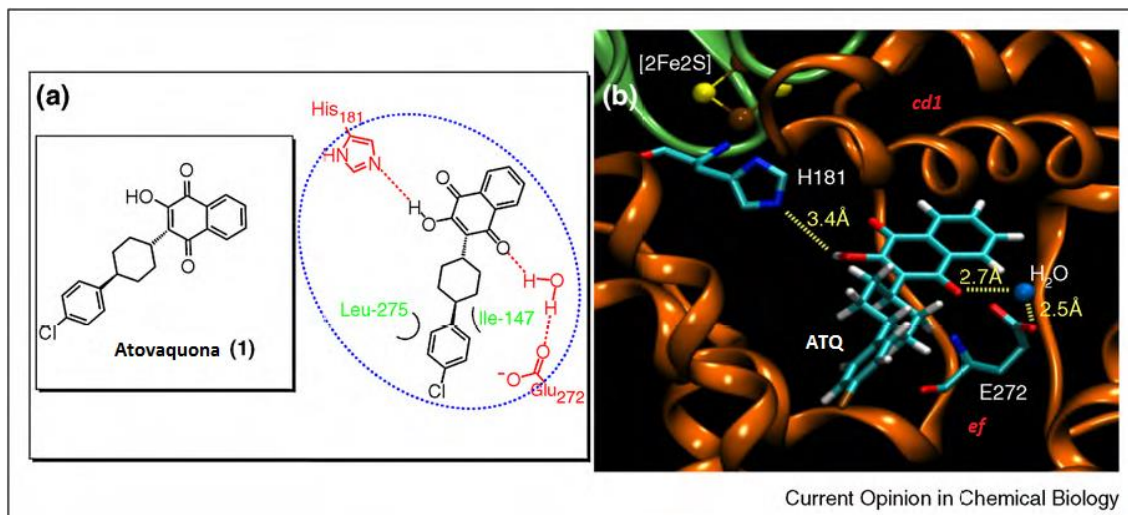


Figura III- 1: (a) Representação da estrutura da atovaquona (1) e interações responsáveis pela ligação da ATQ ao sítio Q_0 bc_1 , no modelo de levedura. (b) Representação de estrutura do sítio Q_0 com energia minimizada. O citocromo b está representado em estrutura de laço, a laranja (com componentes ef e cd1 do Q_0 indicados) e a proteína Rieske representada a verde. As pontes de hidrogénio estabelecidas com o ligando ATQ His-181 (Rieske) e Glu-272 (cyt b) estão representadas em tracejado e a molécula de água em ponte está representada como uma esfera azul.

3.2. Desenho e síntese de 4-oxoquinolinas com potencial na inibição do complexo bc_1 plasmodial

Como referido no capítulo anterior, a seleção para estirpes de *Plasmodium* resistentes a todas as classes de antimaláricos usados em clínica, inclusive os derivados de artemisinina, está a tornar-se uma preocupação de saúde global. Apesar de esforços mundiais para desenvolvimento de uma vacina contra a malária, o que diminuiria a carga epidemiológica da doença, considera-se da máxima importância o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos, preferencialmente com novos mecanismos de ação e dirigidos a novos alvos, e com propriedades farmacológicas melhoradas, de modo a evitar o surgimento de resistências cruzadas com os fármacos usados atualmente em clínica e a combater eficazmente as infeções por *Plasmodium falciparum*. [39]

Em 2008 foi demonstrado que algumas quinolonas interagem com o sítio Q_0 do complexo bc_1 , inibindo a cadeia respiratória do parasita. Procedeu-se assim à síntese de uma biblioteca de 4-alkil- e 4-alcóxi-(1H)-quinolonas com o objectivo de obter informação acerca da relação entre a estrutura e atividade dos compostos (SAR), para seleccionar um inibidor com seletividade e potência adequadas. [40]

Desenvolveram-se recentemente quinolonas contendo diariléteres como substituintes, das quais são exemplos os compostos ELQ-400 e ELQ-300, cujas estruturas se encontram representadas na Figura III-2. Ambos os compostos apresentam atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, mas o composto ELQ-400 mostrou ser 10x mais potente que o composto ELQ-300. O composto ELQ-400 revelou-se inativo em parasitas transgênicos que expressem a enzima dihidroorotato desidrogenase (DHODH) de levedura, o que indica que o seu mecanismo de acção está relacionado com a suspensão da síntese de pirimidinas associada à inibição do citocromo bc₁. O composto ELQ-400 revelou atividade *in vivo* nas formas sanguíneas de *P. yoelii*. Neste estudo, os ratos foram tratados oralmente com uma dose de ELQ-400 24 horas após a infeção. Ambos os compostos, ELQ-300 e ELQ-400, mostraram eficácia 4 horas pós-tratamento, com ED₅₀ de 0,02 e 0,01 mg/Kg, respetivamente, e doses curativas de 0,3 e 0,1 mg/Kg, respetivamente. O composto ELQ-300 foi desenvolvido a partir da endoquina (fig. III-3). [40] [41]

A atividade aviária da endoquina foi descrita por Salzer e seus colaboradores há mais de 70 anos. Contudo, apesar de a endoquina apresentar atividade antimalárica em modelos de aves, tal não se traduziu em atividade *in vivo* em humanos, devido a instabilidade metabólica. Descobriu-se que esta instabilidade metabólica deriva de uma cadeia alquílica longa na posição 3 do núcleo de quinolona. Ao substituir a cadeia alquílica pela cadeia lateral da piridona GW844520, obteve-se o ELQ-271 (fig. III-2), com estabilidade metabólica melhorada. Subsequentes ajustes estruturais com base em estudos de relação estrutura atividade originaram o ELQ-300. O composto ELQ-300 apresenta elevada selectividade para o citocromo bc₁ de *Plasmodium*, em comparação com o citocromo bc₁ humano, e não apresenta resistências cruzadas com a ATQ. Exibe atividade contra os gametócitos de *P. falciparum*, suspendendo o seu desenvolvimento nos estágios I e II, a uma concentração de 0,1µM. Também apresenta atividade contra gametócitos no estágio IV, a um valor de IC₅₀ de 79,1 nM. O composto encontra-se em estudos de formulação, de modo a transitar para ensaios clínicos. [42]

A enzima PfNDH2 só tem um inibidor conhecido, o hidroxi-2-dodecil-4-(1H)-quinolona (HDQ). A investigação relacionada com este alvo terapêutico começou recentemente, na sequência dos estudos de Biagini e colaboradores [37]. Estes

estudos revelaram que o composto HDQ, representado na Figura III-4, exibe potente atividade contra a estirpe 3D7 de *P. falciparum*, com valores de IC_{50} de $86,5 \pm 2,6$ nM, inibindo a PfNDH2. O fármaco apresentou menor sensibilidade contra estirpes transgênicas que exprimem a enzima DHODH proveniente de levedura, requerendo neste caso valores de IC_{50} de $6,1 \pm 0,9$ μ M. Este resultado é indicativo de inibição da função mitocondrial, pois a enzima DHODH consegue ultrapassar a necessidade de oxidação do ubiquinol pelo complexo bc_1 . A partir do isolado TM90C2B, contendo a mutação Y268S, responsável por conferir resistência à atovaquona, no citocromo *b* (razão de IC_{50} mutante/controlo > 1000) determinou-se a atividade do composto HDQ, que se revelou elevada ($IC_{50} = 64 \pm 7,2$ nM), sugerindo que os inibidores têm diferentes mecanismos de ação e/ou alvos terapêuticos. O composto HDQ também inibiu o complexo bc_1 em concentrações nanomolares, com um valor de $IC_{50} = 19 \pm 1,3$ nM, o que pode indicar que o análogo do quinol tem um mecanismo duplo de ação, atuando em duas enzimas respiratórias, a PfNDH2 e o complexo bc_1 . [37] [40]

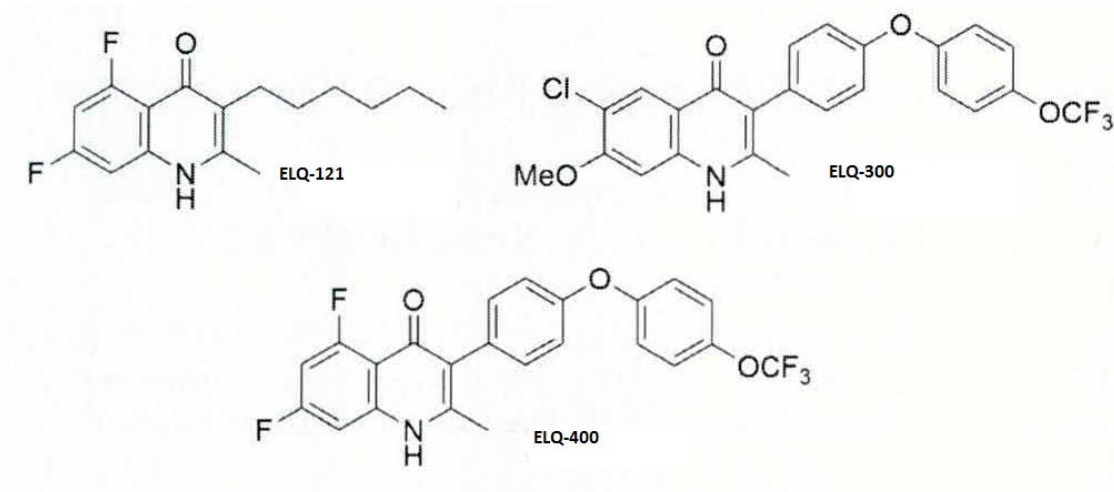


Figura III- 2: Representação das estruturas moleculares dos compostos ELQ-300, ELQ-400 e ELQ-271.

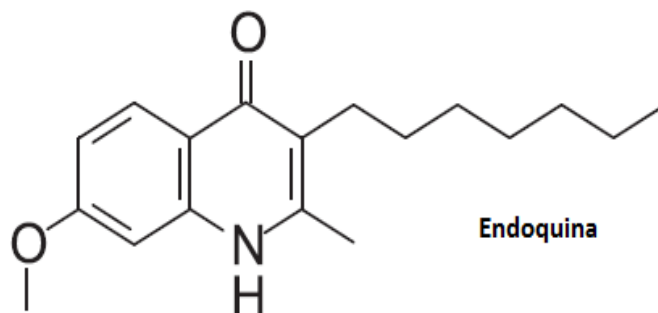


Figura III- 3: Representação da estrutura molecular do composto endoquina, o composto modelo para o quimiotipo dos ELQ (endochin like quinolones).

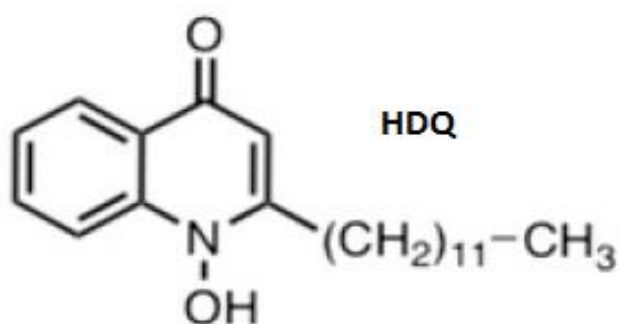


Figura III- 4: Representação da estrutura molecular do composto HDQ.

Conforme fundamentado nos parágrafos anteriores, há interesse em explorar a síntese de 4-oxoquinolinas 3-éster substituídas nas posições 6 e 7. Assim sendo, devem realizar-se estudos de relação estrutura atividade para os substituintes em 6 e 7, bem como realizar estudos para caracterizar as propriedades farmacocinéticas dos compostos sintetizados, de modo a produzir moléculas com elevada atividade *in vivo* e uma farmacocinética adequada. Neste enquadramento o autor realizou trabalho experimental na síntese de 4-oxoquinolinas, no âmbito de um projeto de estágio extracurricular que serviu de base a esta monografia. Nomeadamente, foi abordada a síntese de 4-oxoquinolinas 3-éster substituídas nas posições 6 e/ou 7 do núcleo quinolínico, cuja estrutura base se encontra representada na Figura III-5. [43] [44]

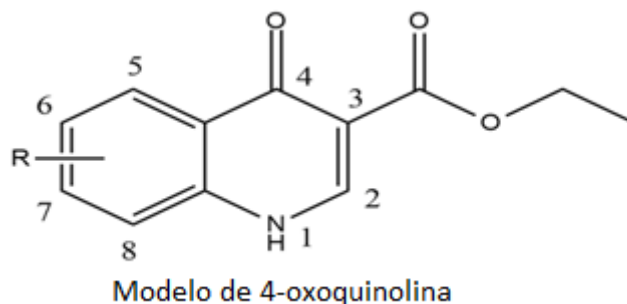


Figura III- 5: Representação estrutural a 2D do modelo de 4-oxoquinolina 3-éster considerado no projeto laboratorial.

3.3. Síntese de 4-oxoquinolinas 3-éster (quinolonas)

3.3.1. Abordagem sintética e discussão dos resultados

A abordagem sintética geral para preparação de 4-oxoquinolinas 3-éster com diversidade estrutural, que se encontra representada na Figura III-5, baseia-se no acoplamento do 3-aminofenol com malonato de dietil etoximetileno (DEEMM) para originar o composto intermédio PH03. O PH03 vai agir como composto de base para a síntese das restantes 4-oxoquinolinas, por ataque nucleofílico do fenol/fenóxido a blocos de síntese baseados em heterociclos, com um carbono electrodeficiente ligado a halogénio para substituição nucleofílica com saída de haleto. O fenol facilmente perde o hidrogénio tornando-se fenóxi devido à estabilização da carga negativa deste pelas estruturas de ressonância a nível do anel aromático. As reações são conduzidas em condições anidras, pelo que se recorreu a THF anidro. As reações foram seguidas por TLC, verificando-se que, em alguns casos, além do acoplamento desejado houve a formação de produtos secundários. Para obter apenas o produto pretendido recorreu-se aos métodos de purificação usuais, como cristalização e cromatografia em coluna.

As reações de ciclização para obter o modelo 4-oxoquinolina foram realizadas recorrendo a Dowtherm A, que permite a condução da reação a temperaturas elevadas, aproximadamente 250 °C, embora com riscos de termólise nalguns casos. Para ocorrer a ciclização, o anel aromático ataca um dos grupos carboxilo, formando-se etanol no processo, que evapora do meio reacional. Esta estratégia formação de 4-oxoquinolinas foi objeto de estudos recentes no grupo. [43] [44]

As reações conduzidas no decurso das sínteses realizadas serão objeto de considerações específicas, em seguida.

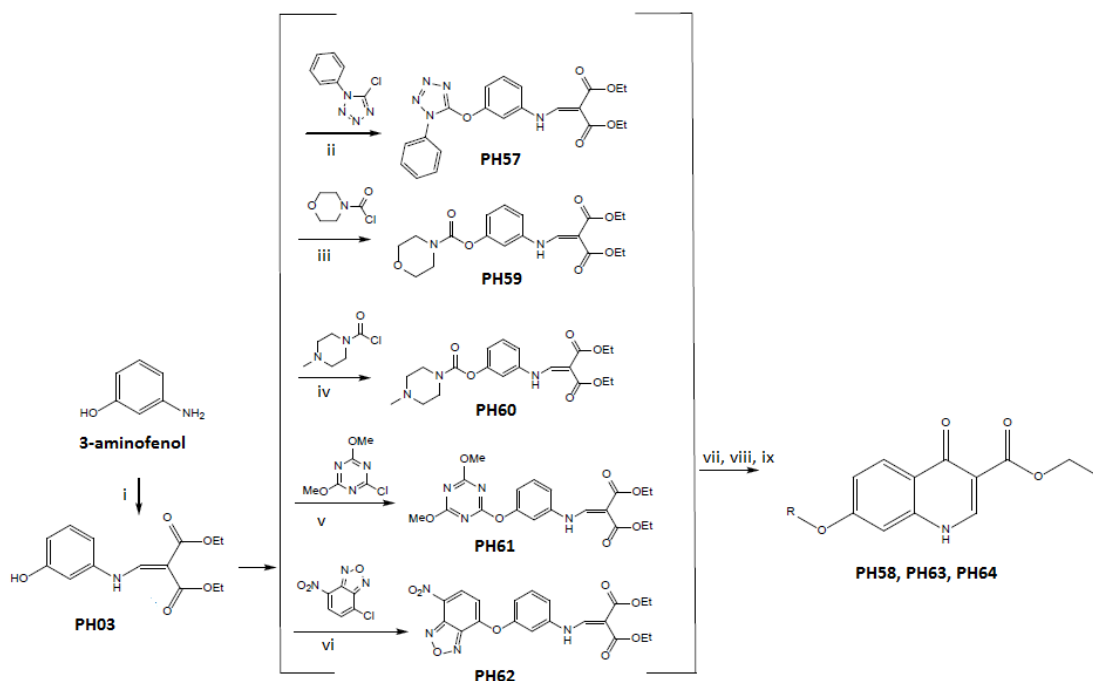


Figura III- 6: Esquema geral de síntese de 4-oxoquinolonas.

(i) Acoplamento de 3-aminofenol com malonato de dietil etoximetileno (DEEMM), composto PH03

Mecanismo PH03

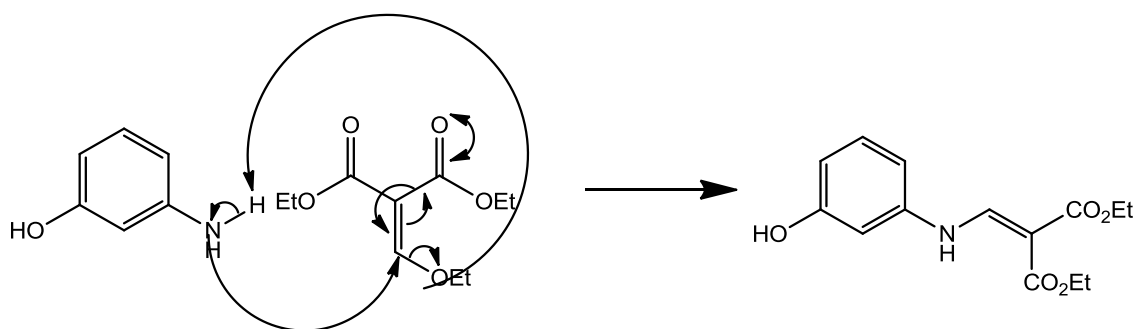


Figura III- 7: Esquema representativo da síntese do composto PH03.

O composto intermédio PH03 foi obtido por acoplamento de 3-aminofenol com malonato de dietil etoximetileno, na ausência de solvente, tal como exemplificado na Figura III-7. Ao controlar a reação por TLC verificou-se que houve desaparecimento do 3-aminofenol (mancha amarela) e aparecimento de uma mancha que cora de laranja

quando revelada em anisaldeído, com um RF igual ao RF da referência do produto pretendido (sintetizado anteriormente).

A reação foi completa, pois não se observaram vestígios de 3-aminofenol. Contudo, houve formação de produtos secundários. O produto desejado foi purificado por cristalização em etanol. Este solvente revelou-se adequado, visto o produto ser pouco solúvel. Contudo, para ocorrer cristalização e purificação é necessária a dissolução total do composto, daí se ter utilizado também algum DCM (o mínimo possível). O p.e do DCM é mais baixo que o do etanol, logo ao colocar-se no evaporador rotativo, evapora completamente, ficando apenas o etanol na mistura a cristalizar. Como o produto está em maior quantidade, acaba por cristalizar em etanol. Após obtenção de cristais, estes foram lavados com etanol gelado, para não se dissolverem.

No espectro de massa (**Anexo 1A**) não era visível o pico correspondente ao composto de partida ($M=109,13$ g/mol). O composto final pretendido tem uma massa de $279,29$ g/mol e a sua presença foi comprovada no espectro de massa em que se obteve um pico correspondente a m/z de 280 ($[M+H]^+$) e além disso existia um pico correspondente a m/z de 302 correspondente ao aduto ($[M+Na]^+$) bem como um valor de m/z de 318 corresponde ao aduto ($[M+K]^+$). Também existe um pico correspondente a m/z de 234 , o fragmento resultante da perda de um anião etóxido de um dos grupos éster.

O produto também foi caracterizado por RMN 1H (**Anexo 1B**), sendo importante destacar a presença de um tripleto com um desvio químico entre $1,25$ ppm e $1,45$ ppm, correspondente à ressonância dos $6H$ terminais dos grupos éster (no derivado de malonato), 2 quartetos com desvio químico entre $4,20$ ppm e $4,35$ ppm, correspondente à ressonância dos $4H$ dos dois CH_2 dos grupos éster referidos. Já o hidrogénio do carbono adjacente à amina secundária aparece sob a forma de singuleto, com um desvio químico de $8,53$ ppm. Quanto às ressonâncias dos hidrogénios aromáticos, observa-se a presença de um tripleto ($1H$) entre $7,10$ ppm e $7,30$ ppm e um multipletto ($3H$) entre $6,55$ ppm e $6,75$ ppm, sendo que o multipletto pode ser desdobrado num singuleto e em dois dupletos.

Relativamente ao espectro de RMN ^{13}C (**Anexo 1C**) verifica-se uma sobreposição do espectro obtido com o espectro previsto, confirmando a presença do produto.

(ii) Preparação do éter tetrazólico derivado de PH03, composto PH57

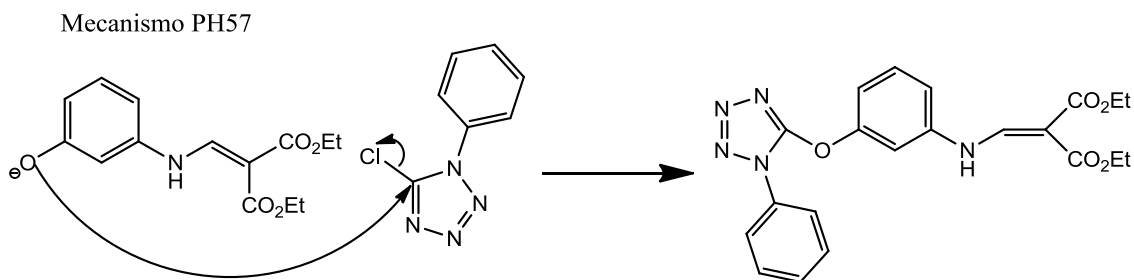


Figura III- 8: Esquema representativo da síntese do composto PH57.

A reação de síntese do composto PH57, representada na Figura III-8, requer condições anídras. De modo a secar THF usou-se sódio metálico na presença de um indicador (benzofenona). O sódio reage com a água presente no solvente e, para existir uma superfície de contacto maior e assim aumentar a possibilidade de secagem, são usadas lâminas de sódio o mais finas e pequenas possível. A cor azul obtida após a adição de benzofenona, após agitação num banho de ultra-sons é indicadora da ausência de água. Na manta, sob aquecimento, o THF entra em refluxo e é recolhido num balão de recolha.

A reação foi controlada por TLC, tendo-se dado por terminada após 16h (o.n) apesar de ainda haver algum composto de partida, devido à presença de produtos secundários. Após extração, a análise à fase orgânica revelou a presença de uma mancha que se destacava em intensidade e também corava de laranja (com revelação em anisaldeído), com um RF diferente do composto de partida. O produto foi purificado por cristalização em etanol (e DCM).

O rendimento obtido foi de 79%, o que é aceitável visto que a reação não foi completa e houve formação de produtos secundários.

O produto cristalino obtido foi caracterizado por espectrometria de massa (MS) e RMN ^1H . O espectro de massa (**Anexo 2A**) confirma a presença do composto pretendido, pois observa-se um pico com valor de m/z de 423,19 correspondente ao ião molecular ($[\text{M}]^+$). Por RMN (**Anexo 2B**) além dos picos correspondentes às

ressonâncias dos grupos éster, existentes no composto de partida (1,24 ppm e 4,21 ppm) e por integração vê-se a presença, na zona aromática (7-8ppm) de mais 5H (grupo fenilo), provenientes da adição do 5-cloro-1-feniltetrazole ao composto de partida, logo 9H na região aromática.

(iii) Preparação do éster morfolínico derivado de PH03, composto PH59

Mecanismo PH59

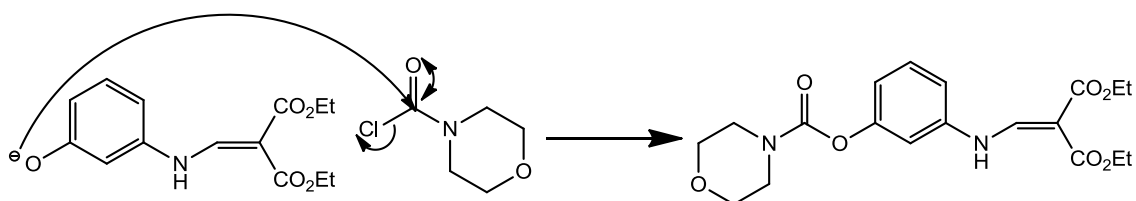


Figura III- 9: Esquema representativo da síntese do composto PH59.

A reação foi realizada em condições anidras, representada na Figura III-9. Permaneceu sob refluxo durante a noite (o.n), mas como não progrediu completamente para a formação do produto adicionou-se mais derivado morfolínico. A reação progrediu eficazmente e foi completa. No entanto, eram evidentes mais do que uma mancha e recorreu-se a cristalização como método de purificação. Análise por TLC de uma solução do sólido obtido por cristalização revelou a presença de uma mancha a corar de laranja (revelação em anisaldeído) que se considerou corresponder ao produto expetável, mas também apresentou outras manchas com outros arrastamentos. Por isso, o sólido cristalino foi purificado novamente por cristalização, e aguardando-se resultados da caracterização.

(iv) Preparação do éster 4-metil-piperazina derivado do PH03, composto PH60

Mecanismo PH60

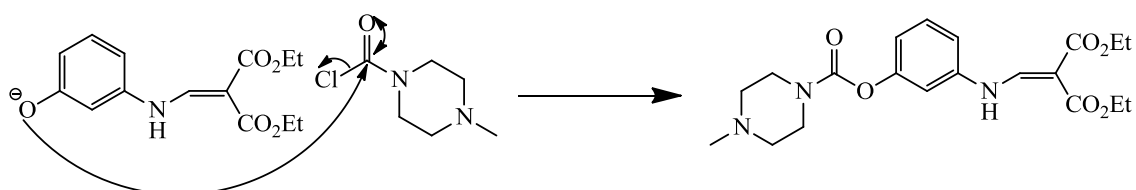


Figura III- 10: Esquema representativo da síntese do composto PH60.

Nesta síntese do composto PH60, representada na Figura III-10, houve dificuldades relacionadas com a solubilidade do composto heterocíclico, tendo-se adicionado mais derivado de piperazina (+0,8 eq. ao longo da reação). A reação acabou por não ser completa, mas com evidência de formação de alguns produtos secundários. Tentou-se isolar o produto desejado por cristalização, mas sem sucesso.

Partiu-se para purificação por coluna (cromatografia em sílica gel) em que se usou DCM como eluente inicial (para eluir compostos mais apolares, inclusive o composto de partida) e foi-se aumentando a polaridade para 5% MeOH/DCM para eluir o produto final que cora de laranja (revelado em anisaldeído) mas com um RF diferente da mancha laranja do composto de partida.

O rendimento foi de 67%, o que é aceitável visto que a reação não foi completa, houve perdas por formação de produtos secundários e perdas na coluna cromatográfica. Obteve-se uma fração contendo composto de partida e produto, em que se tentou cristalização.

Aguarda-se caracterização completa por MS e RMN ^1H , mas tudo indica que é o produto uma vez que os derivados de malonato coram de laranja e tem RF diferente do composto de partida.

(v) Preparação do éter 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina derivado do PH03, composto PH61

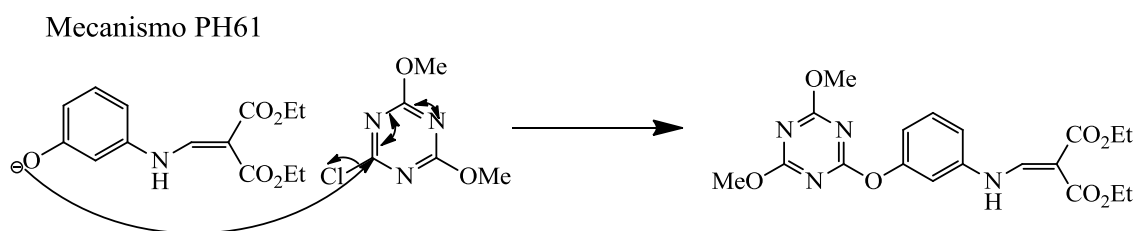


Figura III- 11:Esquema representativo da síntese do composto PH61.

Através do controlo da reação de síntese do composto PH61, representada na Figura III-11, por TLC verificou-se que esta não foi completa, devido à existência de composto de partida. Contudo, por serem evidentes manchas correspondentes a produtos secundários, suspendeu-se a reação. A tentativa de purificação por cristalização falhou. Então recorreu-se a purificação por cromatografia em coluna, usando-se DCM como eluente.

O produto foi obtido com um rendimento baixo (16%), logo é necessário melhorar as condições reacionais, por exemplo alterando a base utilizada, ou aumentando o tempo de reação, ou solubilizando previamente o reagente ou alterando o solvente.

(vi) Preparação do éter 7-nitrobenzo (1,2,5)-oxadiazole derivado do PH03, composto PH62

Mecanismo PH62

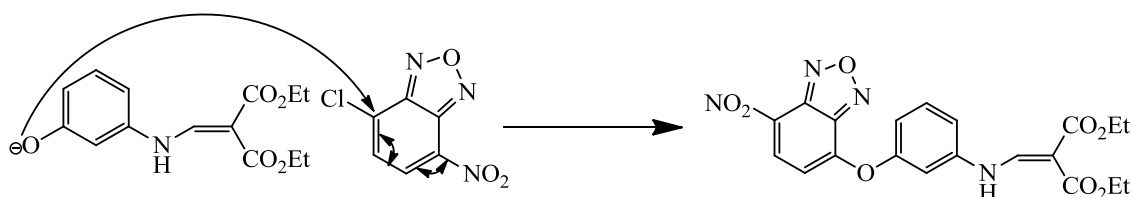


Figura III- 12: Esquema representativo da síntese do composto PH62.

Na tentativa de preparação do composto PH62, cujo esquema de síntese está representado na Figura III-12, a adição do cloreto de oxadiazole (NBD) ao meio reacional onde estava presente o composto PH03 resultou numa mistura preta. A reação não evoluiu após um período de 24h. Fez-se uma tentativa de extração, contudo não foi possível distinguir as duas fases, por isso após evaporação total tentou-se solubilização seletiva em água, acetato de etilo, DCM e acetona. Recorrendo a análises por TLC foi evidente a presença de composto de partida (PH03) em todas as frações e apenas a fração do DCM apresentava vestígios de outras manchas (quantidades vestigiais).

É necessário desenvolver as experimentais para que esta síntese ocorra com sucesso: experimentar outras bases, outros solventes, aumentar temperatura e tempo reacional.

(vii) Ciclização do composto PH57 em Downterm A a temperatura de 250°C, composto PH58

Mecanismo PH58

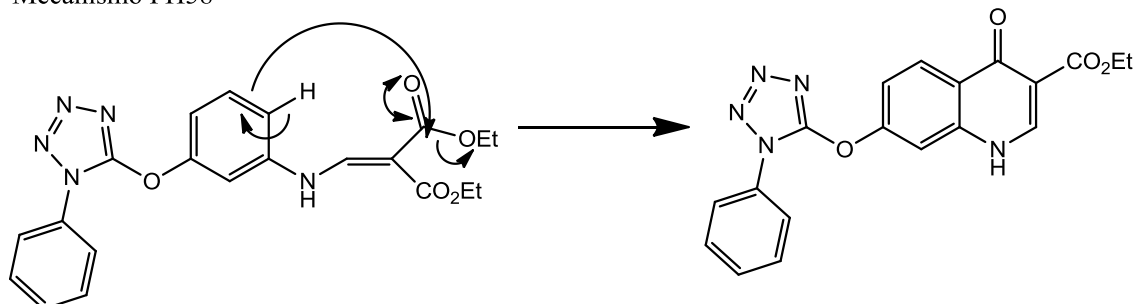


Figura III- 13: Esquema representativo da síntese do composto PH58.

Ciclização em Dowtherm A, ocorre a temperaturas elevadas (aproximadamente 250°C), esquema de síntese representado na Figura III-13. O progresso da reação foi controlado por TLC, até se observar o consumo total do composto de partida. Ao diminuir a temperatura e adicionar um solvente orgânico adequado, ocorre a precipitação de compostos quinolínicos devido aos seus problemas de solubilidade (precipitam facilmente com a diminuição da temperatura).

Obteve-se um sólido não puro, pelo que se recorreu a cromatografia de flash como método de purificação, sendo que a fração pura foi caracterizada por RMN ^1H (inconclusivo, **Anexo 3B**) e por MS (**Anexo 3A**). Verifica-se um pico com m/z de 349 que corresponde à quinolona com perda de N_2 no tetrazole. Esta quebra pode ter surgido de duas formas: ou o produto da reação não é a quinolona esperada, mas sim um derivado quinolínico que perdeu azoto molecular no processo de ciclização, ou seja, ocorreu termólise devido às altas temperaturas (quebra das ligações simples do tetrazole) ou pode ser um fragmento do produto pretendido que se obteve em MS e em que m/z de 304 corresponde à perda de ^-OEt e m/z de 277 corresponde à perda de CO_2Et (ambos fragmentos do $m/z=349$). A cristalização e caracterização por difração de raios X ajudaria na elucidação estrutural do composto.

Sugestões a considerar são a escolha de outro método de ciclização (POCl_3), tentar a ciclização a temperaturas mais baixas (potencialmente complicado) ou tentar ciclização com menor tempo de reação (para minimizar a ocorrência de termólise).

(viii) Ciclização do composto PH60 em Dowtherm A a temperatura de 250°C, composto

PH63

Mecanismo PH63

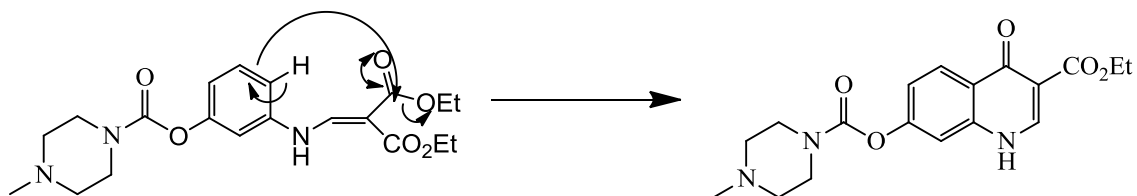


Figura III- 14: Esquema representativo da síntese do composto PH63.

Aplicou-se a metodologia para a ciclização do composto PH57, esquema de síntese representado na Figura III-14. Análise por TLC revelou que a ciclização foi incompleta, contudo a reação foi suspensa após 3h para evitar a formação de produtos secundários. Ocorreu precipitação de um sólido impuro, logo é necessário realizar uma etapa de purificação que o autor desta monografia não acompanhou devido à finalização do estágio.

(ix) Ciclização do composto PH61 em Dowtherm A a temperatura de 250°C, composto

PH64

Mecanismo PH64

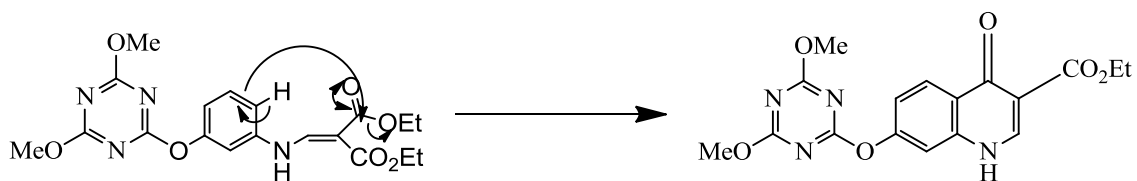
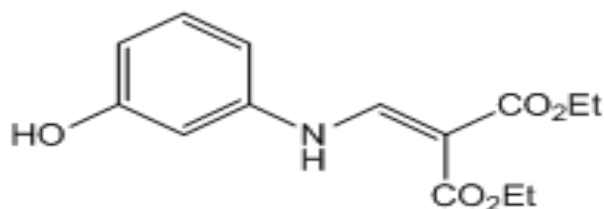


Figura III- 15: Esquema representativo da síntese do composto PH64.

Aplicou-se a metodologia para a ciclização do composto PH57, esquema de síntese representado na Figura III-15. Análise por TLC revelou que a ciclização foi completa, pois não se observou composto de partida. Contudo ficou pendente a purificação e a caracterização.

3.3.2. Procedimentos de síntese detalhados

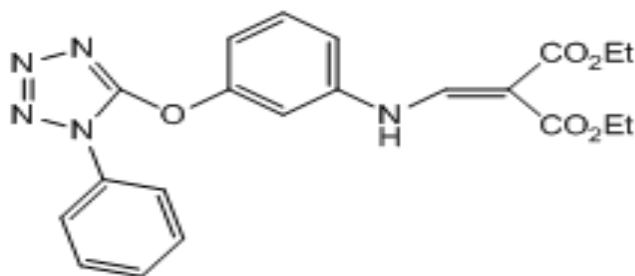
(i) Acoplamento de 3-aminofenol com dietil etoximetileno malonato (DEEMM), o composto PH03



Adicionou-se 3-aminofenol (3,0 g; 27,49 mmol) a DEEMM (5,944 g; 5,60 mL). Refluxou-se a mistura a 100°C, durante 2h30min. Purificou-se o sólido resultante por cristalização em etanol (e DCM para ajudar a solubilizar). Recolheram-se os cristais por filtração, a vácuo, e lavaram-se com etanol gelado. A mistura foi recristalizada em etanol e DCM, obtendo-se um sólido (6,8 g; 24,25 mmol; rendimento de 89%).

Caracterizou-se o composto por MS e RMN (^1H e ^{13}C) com base na interpretação se dos espectros obtidos incluídos no **Anexo 1 (1A para o MS, 1B para o RMN ^1H e 1C para o RMN ^{13}C)**.

(ii) Preparação do éter tetrazólico derivado de PH03, o composto PH57

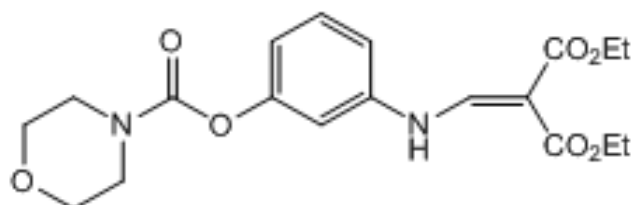


Adicionou-se PH03 (1,0 g; 3,58 mmol) e *tert*-butóxido de potássio (3 eq; 1,205 g) a THF seco (aprox. 30 mL), sob atmosfera de azoto. Adicionou-se à mistura uma

solução de 5-cloro-1-feniltetrazole (1,6 eq; 1,03 g) em THF seco (aprox. 20 mL), sob atmosfera de azoto. A mistura final permaneceu sob agitação, em refluxo, a 64°C, durante 14 horas, sob atmosfera de azoto. O progresso da reação foi controlado por TLC. Após desaparecimento da mancha correspondente a PH03, deixou-se arrefecer a mistura à temperatura ambiente e removeu-se o THF sob vácuo. O sólido obtido foi lavado com água e acetato de etilo. Extraíu-se a fase aquosa com acetato de etilo, secou-se a fase orgânica com MgSO₄ anidro e filtrou-se sob vácuo. A fase orgânica foi concentrada no evaporador rotativo, sob vácuo, e deixou-se cristalizar. O sólido formado (1,2 g; 2,84 mmol; 79%) foi recolhido por filtração e seco.

Caracterizou-se o composto obtido por MS e RMN ¹H, através da análise dos correspondentes os espectros, incluídos no **Anexo 2 (2A para o MS e 2B para o RMN ¹H)**.

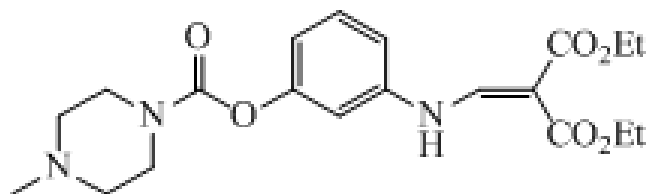
(iii) Preparação do éster morfolínico derivado de PH03, o composto PH59



Adicionou-se PH03 (1,0 g; 3,58 mmol) e *tert*-butóxido de potássio (3 eq; 1,205 g) a THF seco (30mL). Adicionou-se cloreto de 4-carboximorfolina (1,2 eq; 4,30 mmol; 0,5 mL). Adicionou-se THF seco (15mL), a 64°C, e manteve-se a mistura em refluxo, durante a noite e sob atmosfera de N₂. Após 16h foi adicionado 0,25 mL (0,6 eq) de cloreto de 4-carboximorfolina. Após 5h a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o THF removido sob vácuo. O resíduo sólido foi dissolvido em acetato de etilo e água e subsequentemente extraído com acetato de etilo. As frações orgânicas foram recolhidas, secas com MgSO₄, filtradas e concentradas sob vácuo. Cristalização do sólido resultante em etanol (e DCM). Não puro, segundo a TLC. Lavagem dos cristais em etanol gelado e recristalização.

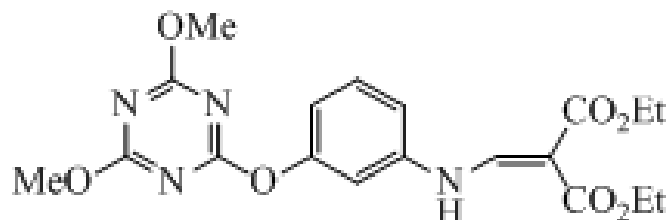
Aguarda a cristalização do composto PH59, seguida de sua caracterização por MS e RMN ^1H .

(iv) Preparação do éster 4-metil-piperazina derivado do PH03, o composto PH60



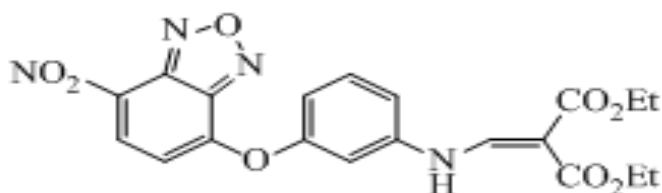
Adicionou-se o PH03 (1,0 g; 3,58 mmol), *tert*-butóxido de potássio (3 eq; 1,205 g), THF seco (30 mL). O hidrocloreto de 4-metil-1-clorocarboxipiperazina (1,2 eq; 4,3 mmol; 0,7 g) foi dissolvido em THF seco (15 mL) mas foi adicionado mais 0,4 eq (0,24 g) devido à sua fraca solubilidade. A reação foi mantida a 64°C, em refluxo, durante a noite e sob atmosfera de N_2 . Após 16h foi adicionado mais 0,4 eq (0,24 g) de hidrocloreto de 4-metil-1-clorocarboxipiperazina. Após 5h a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o THF removido sob vácuo, no evaporador rotativo. Seguiu-se extração, usando acetato de etilo e água. Foram recolhidas as frações orgânicas, secas com MgSO_4 anidro, filtradas e concentradas. Tentativa de recristalização em etanol (e DCM) não produziu resultados. Purificação por cromatografia em sílica gel (eluinto com $\text{DCM} \rightarrow 5\% \text{MeOH/DCM}$). Após purificação obteve-se um composto sólido (0,975 g; 2,40 mmol; 67%). Aguarda caracterização completa por MS e RMN ^1H .

(v) Preparação do éter 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina derivado do PH03, o composto PH61



Adicionou-se PH03 (1,0 g; 3,58 mmol) e *tert*-butóxido de potássio (3 eq; 1,205 g) a THF seco (30 mL). O 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (1,2 eq; 4,30 mmol; 0,754 g) foi adicionado ao balão após dissolvido em 15 mL de THF seco. Reação foi mantida a 64°C, em refluxo, sob atmosfera de N₂, durante 24h. Mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e o THF removido sob vácuo no evaporador rotativo. O sólido foi dissolvido em acetato de etilo e água e extraído com acetato de etilo. As frações orgânicas foram recolhidas, secas com MgSO₄ anidro, filtradas e a solução foi concentrada. Tentativa de recristalização em etanol (e DCM) não produziu resultados. Purificação por cromatografia em sílica gel (eluindo com DCM). Após purificação obteve-se um sólido (0,242g; 0,58mmol; um rendimento de 16%). Aguarda caracterização completa por MS e RMN ¹H.

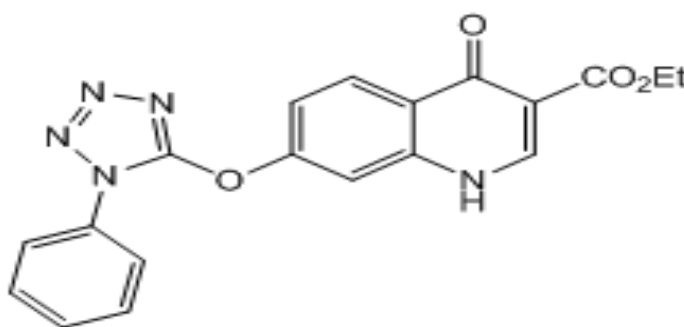
(vi) Preparação do éter 7-nitrobenzo (1,2,5)-oxadiazole derivado do PH03, composto PH62



Adicionou-se PH03 (1,0 g; 3,58 mmol) e *terc*-butóxido de potássio (3 eq; 1,205 g) a THF seco (30 mL). O 4-cloro-7-nitrobenz(1,2,5)-oxadiazole (1,2 eq; 4,30 mmol; 0,857 g) foi adicionado juntamente com 15mL de THF seco (solução preta). A reação foi mantida a 64°C, em refluxo, sob atmosfera de N₂, durante 24h. A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e o THF removido sob vácuo no evaporador rotativo. O sólido foi lavado com água e acetato de etilo mas não foi possível extrair porque não houve separação de fases. Evaporação da água e do acetato de etilo. Solubilização em água fria (PH62H₂O). Solubilização em acetato de etilo frio (PH62AcOEt). Solubilização em DCM (PH62DCM). Solubilização em acetona (PH62Acet).

A reação não foi bem sucedida pelo que não existem resultados relevantes a apresentar.

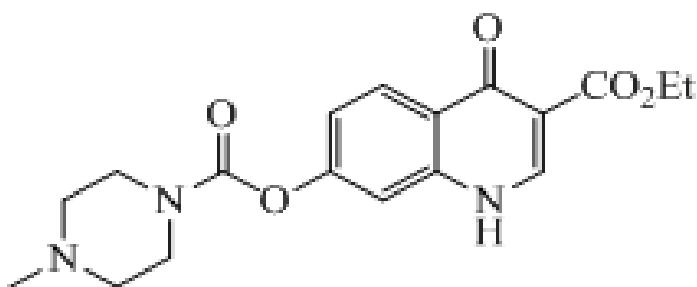
(vii) Ciclização do composto PH57 em Downterm A a temperatura de 250°C – PH58



Dissolveu-se PH57 (0,6 g; 1,42 mmol) em Dowtherm A (10 mL). A solução foi refluxada a 250°C durante 3h. A mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e formou-se um precipitado. Precipitado foi recolhido por filtração, lavado com hexano e éter etílico. Realizou-se cromatografia de flash que se fez em 10%AcOEt/Hex como eluente e terminou-se com AcOEt. Recolheu-se as frações puras, juntou-se todas num balão e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo.

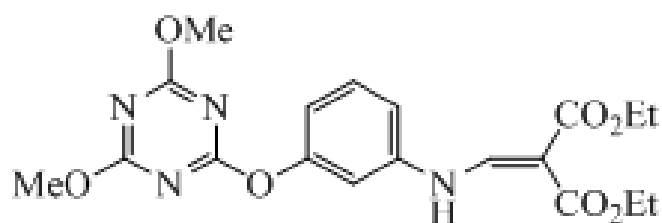
Foi caracterizado por MS e RMN ¹H sendo que se obtiveram os espetros presentes nos documentos **Anexo 3 (3A para o MS e 3B para o RMN ¹H)**.

(viii) Ciclização do composto PH60 em Dowtherm A a temperatura de 250°C – PH63



Dissolveu-se o PH60 (0,5 g; 1,23 mmol) em Dowtherm A (15 mL). A solução foi refluxada a 250°C durante 3h. A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e formou-se um precipitado. Precipitado foi recolhido por filtração, lavado com hexano e éter etílico. Aguarda purificação e caracterização posterior por MS e RMN ¹H.

(ix) Ciclização do composto PH61 em Dowtherm A a temperatura de 250°C – PH64



Dissolveu-se o PH61 (0,222g; 0,52mmol) em Dowtherm A (7mL). A solução foi refluxada a 250°C durante 3h. A mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e formou-se um precipitado. Precipitado foi recolhido por filtração, lavado com hexano e éter etílico. Aguarda precipitação, seguida de possível purificação e caracterização por MS e RMN ¹H.

3.3.3. Considerações finais

Durante este projeto conseguiu-se sintetizar bem como caracterizar os compostos PH03, PH57 e o PH58. No PH58 não se tem a certeza se o que se obteve corresponde a um fragmento do composto que perdeu o N₂ no tetrazole devido ao impacto eletrónico, ou se é o produto que efetivamente temos presente e que resulta de termólise devido às elevadas temperaturas a que se realiza a ciclização.

Também se sintetizaram os seguintes compostos que aguardam caracterização por MS e RMN ¹H: o PH59, PH60, PH61, PH63 e PH64. Sendo que o PH59 necessita de cristalizar para posterior caracterização, o PH63 não se encontra puro logo precisa de ser purificado por cristalização ou coluna antes de ser analisado e o PH64 que se está à espera de precipitação e em que é necessário realizar controlo por TLC para averiguar se está puro para posterior caracterização.

No caso do PH62 a reação não foi bem sucedida pelo que deve-se tentar otimizar a reação de síntese de modo a obtermos o produto desejado, sendo que se pode usar outras bases, outros solventes, aumentar temperatura e o tempo reacional.

Capítulo IV: Conclusão

As terapêuticas usadas contra a malária demonstram ser insuficientes para o controlo da doença, devido à seleção para estirpes de *P. falciparum* multirresistentes. Atendendo a isto é crucial a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos, para uso tanto em regime de monoterapia como em regime de combinação, de modo a controlar o problema da seleção de resistências. Nesta perspectiva, surgiu um interesse no quimiotipo das hidroxinaftoquinonas, bem como na sua capacidade de inibição do complexo bc₁ da cadeia respiratória plasmodial. O fármaco modelo para a síntese de novos inibidores do complexo bc₁, com propriedades otimizadas, foi a atovaquona.

Um dos compostos pioneiros foi a endoquina, descrita por Salzer e colaboradores há mais de 70 anos. Contudo, apesar de apresentar efeito antimaláricos em modelos de aves, tal não se traduziu para atividade *in vivo* em humanos devido a instabilidade metabólica da molécula. No entanto, a substituição da cadeia alquílica lateral da endoquina pela cadeia lateral da piridona GW844520 originou o composto

ELQ-271, com estabilidade metabólica acrescida. Por sua vez, o ELQ-271 deu origem aos compostos ELQ-300 e ELQ-400, após ajustes estruturais com base em estudos SAR. Estes compostos apresentam maior atividade e seletividade para o complexo bc_1 , logo são candidatos promissores a ensaios clínicos. Adicionalmente o composto ELQ-300 apresenta atividade contra estágios I a IV de gametócitos de *P. falciparum*, formas não sanguíneas do parasita e de difícil eliminação.

O autor desta monografia realizou um estágio extracurricular no grupo Reatividade Orgânica e Química Medicinal do CCMar – Universidade do Algarve, no âmbito da qual esteve envolvido na síntese de uma biblioteca de compostos do grupo das 4-oxoquinolinas 3-éster substituídas em posições 6 e/ou 7 com potencial atividade antimalárica. A estrutura do modelo de 4-oxoquinolina é semelhante aos compostos ELQ anteriormente referidos e, apesar de não se terem realizado estudos de atividade durante a duração do estágio, tudo indica que apresentariam alguma atividade antimalárica. Como projeto de investigação é um contributo considerável, pois ao criar-se uma biblioteca de compostos com o mesmo modelo de base 4-oxoquinolina, consegue-se comparar o efeito dos substituintes na interação com o alvo terapêutico, citocromo bc_1 , tanto *in vitro* como, futuramente, em modelos animais, bem como determinar o seu efeito a nível das propriedades farmacocinéticas dos compostos produzidos. O último ponto é crucial, pois os fármacos com mais efeito atualmente, as artemisininas, apresentam tempos de semi-vida demasiado curtos (40 a 60 minutos) para serem usados em monoterapia, levando a recrudescência e forçando desse modo a seleção para estirpes resistentes. Outro projeto importante é a síntese de compostos com o mesmo alvo terapêutico que a atovaquona, contudo sem resistências cruzadas com este fármaco, para permitir um maior leque de opções terapêuticas eficazes no combate à malária.

Referências Bibliográficas

1. WHO | Malaria em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>
2. OMS. Organização Mundial de Saúde. World Malaria Report 2014. Consultado em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>>
3. S. Roberts, Larry; Janovy Jr., John – **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 8th edition. New York: McGraw-Hills, 2009. ISBN 978-0-07-302827-9
4. Autino, Beatrice; Noris, Alice; Russo, Rosario, and Castelli, Francesco (2012). Epidemiology of Malaria in Endemic Areas. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases. <http://doi.org/10.4084/MJHID.2012.060>
5. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Malaria - About Malaria - Biology em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
6. NIH, National Institute for Allergy and Infectious Diseases. NIAID - Health & Research Topics - Malaria em: <https://www.niaid.nih.gov/topics/Malaria/Pages/lifecycle.aspx>
7. Patient - (16/05/2016) Health information - Malaria prevention. Consultado em: <http://patient.info/health/malaria-prevention>;
8. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (10/07/2015) Traveler's Health, Malaria. Consultado em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/malaria>;
9. Narahashi, T. (1971). Mode of Action of Pyrethroids. *Bull. Org. mond. Santé Bull Wld Hlth Org.*, 44, 337-345;
10. Pubchem – Open Chemistry Database (02/07/2016). Compound Summary for CID 40326. Consultado em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Permethrin#section=Top>
11. R. Roberts, James; Routt Reigart, J. – **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6th edition. 2013. Chapter 4: Pyrethrins and Pyrethroids. Consultado em: <https://www.epa.gov/pesticide-worker-safety/recognition-and-management-pesticide-poisonings>;
12. Pubchem – Open Chemistry Database (05/07/2016). Compound Summary for CID 4284. Consultado em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N-Diethyl-3-methylbenzamide;
13. MedlinePlus – Bug spray poisoning. Consultado em <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002763.htm>;
14. Chiodini PL, Patel D, Whitty CJM and Laloo DG. Guidelines for malaria prevention in travelers from the United Kingdom, 2015. London: Public Health England; September 2015. Consultado em: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/461295/2015.09.16_ACMP_guidelines_FINAL.pdf;

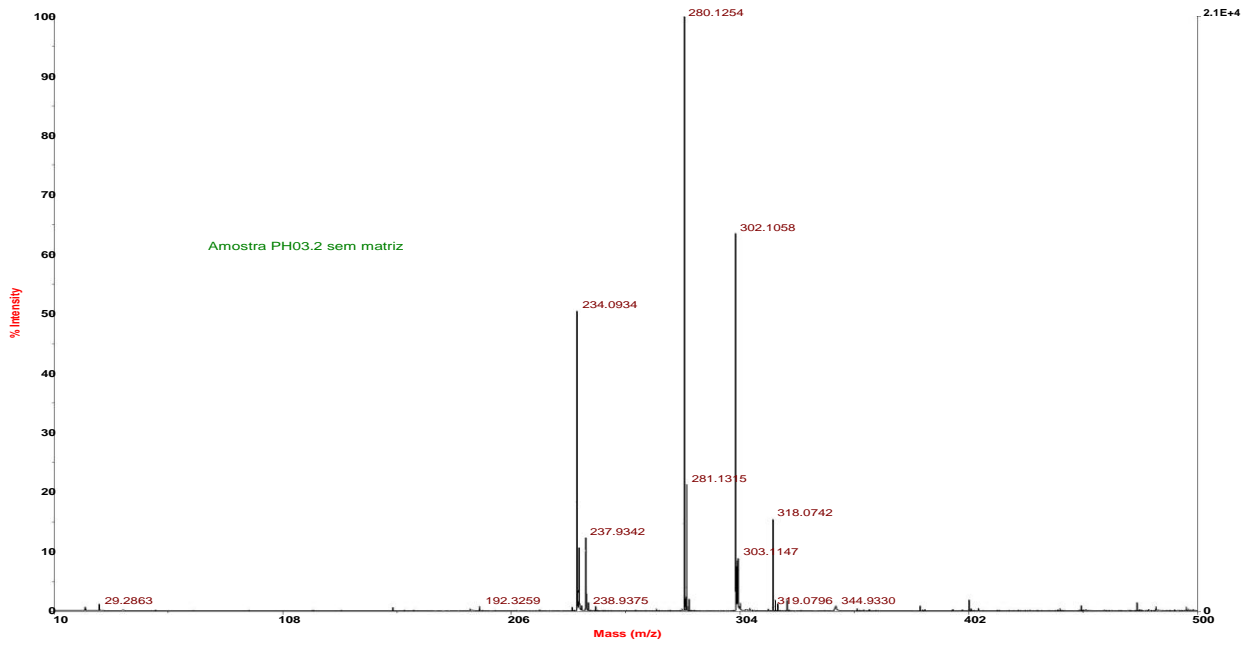
15. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (05/07/2016). Choosing a drug to prevent Malaria. Consultado em: <https://www.cdc.gov/malaria/travelers/drugs.html>;
16. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (05/07/2016). Yellow Book, Chapter 3: Infectious Diseases related to travel. Malaria. Consultado em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/malaria>;
17. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (06/07/2016). Malaria Diagnosis (United States). Consultado em: https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html;
18. WHO, World Health Organization (06/07/2016). Malaria Rapid Diagnostic Tests. Consultado em: http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid_diagnostic_tests/en/;
19. WHO, World Health Organization (05/07/2016). Malaria Microscopy Diagnosis. Consultado em: <http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/microscopy/en/>;
20. Fontecha, Gustavo A; Mendoza, Meisy; Banegas, Engels; Poorak, Mitra; Oliveira, Alexandre M De; Mancero, Tamara; Udhayakumar, Venkatachalam; Lucchi, Naomi W; Mejia, Rosa E. (2012). Comparison of Molecular tests for the diagnosis of malaria in Honduras. *Malaria Journal*, 11:119. doi: 10.1186/1475-2875-11-119.
21. WHO, World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd Edition. 2015. ISBN: 978 92 4 154912 7. Consultado em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>;
22. Müller, Ingrid B; Hyde, John E. (2010). Antimalarial Drugs: modes of action and mechanisms of resistance. *Future Microbiology*, 5(12). Consultado em: http://www.medscape.com/viewarticle/734498_1;
23. Mughtin, Mathirut; Bray, Patrick G.; Ridley, Robert G. e Ward, Stephen A. (1998). Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenantrene methanols. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, p. 2973-2977. Consultado em: <http://aac.asm.org/content/42/11/2973.full.pdf+html>;
24. Wellems, Thomas E. e Plowe, Christopher V. (2001). Chloroquine resistant malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(6), 770-776. doi: 10.1086/322858;
25. Sullivan Jr., David J.; Matile, Hugues; Ridley, Robert J. e Goldberg., Daniel E. (1998). A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31103-31107. doi: 10.1074/jbc.273.47.31103;
26. Lakshmanan, Viswanathan; Bray, Patrick G; Verdier-Pinard, Dominik; Johnson, David J; Horrocks, Paul; Muhle, Rebecca A; Alakpa, George E; Hughes, Ruth H; Ward, Steve A; Krogstad, Donald J; Sidhu, Amar Bir Singh e Fidock David A. (2005). A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-

- reversible chloroquine resistance. *The EMBO Journal*, 24(13): 2294–2305. doi: [10.1038/sj.emboj.7600681](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600681);
27. Martiney, James A.; Ceramy, Anthony e Slater, Andrew F. G. (1995). Verapamil reversal in the chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(83), 22393-22398. doi: 10.1074/jbc.270.38.22393;
 28. Veiga, M. Isabel; Dhingra, Satish K.; Henrich, Philipp P.; Straimer, Judith; Gnädig, Nina; Uhlemann, Anne-Catrin; Martin, Rowena E.; Lehane, Adele M. e Fidock, David A. (2016). Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nature Communications*, 7:11553 doi: 10.1038/ncomms11553 (2016);
 29. Nzila, Alexis. (2006). The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1043-1054. doi: 10.1093/jac/dkl104;
 30. Gregson, Aric e Plowe, Christopher V. (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological reviews*, 57(1), 117-145. doi: 10.1124/pr.57.1.4;
 31. Striepen, Boris. (2011). The apicoplast: a red algae in human parasites. doi:10.1042/BSE05;
 32. Schlitzer, Martin. (2008). Antimalarial drugs – what is in use and what is in the pipeline. *Archiv der Pharmazie*, 341, 149-163. doi: 10.1002/ardp.200700184;
 33. Schwöbel, Babett; Alifrangis, Michael; Salanti, Ali e Jelinek, Tomas. (2003) Different Mutation Patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *in vivo*: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential *in vivo* resistance marker. *Malaria Journal*, p. 2-3. doi: 10.1186/1475-2875-2-5;
 34. Isozumi, Rie; Uemura, Haruki; Kimata, Isao; Ichinose, Yoshio; Logedi, John; Omar, Ahmeddin H.; e Kaneko, Akira. (2015). Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Centers for Disease Control and Prevention*, 21. doi: 10.3201/eid2103.140898;
 35. Ariey, Frédéric; Witkowski, Benoit; Amaratunga, Chanaki; Beghain, Johann; Langlois, Anne-Claire; Khim, Nimol; Kim, Saorin; Duru, Valentine; Bouchier, Christiane; Ma, Laurence; Lim, Pharath; Leang, Rithea; Duong, Socheat; Sreng, Sokunthea; Suon, Seila; Chur, Char Meng; Bout, Denis Mey; Ménard, Sandie; Rogers, William O.; Genton, Blaise; Fandeur, Thierry; Miotto, Olivo; Ringwald, Pascal; Bras, Jacques Le; Berry, Antoine; Barale, Jean-Christophe; Fairhurst, Rick M.; Benoit-Vical, Françoise; Mercereau-Puijalon, Odile e Ménard, Didier. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505 (7481): 50-55. doi: [10.1038/nature12876](https://doi.org/10.1038/nature12876);

36. Falq, Grégoire; Bergh, Rafael Van Den; Smet, Martin De; Etienne, William; Nguon, Chea; Rekol, Huy; Imwong, Mallika; Dondorp, Arjen; e Kindermans, Jean-Marie. (2016). Assessing the asymptomatic reservoir and dihydroartemisinin–piperaquine effectiveness in a low transmission setting threatened by artemisinin resistant *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 15(1): 446. doi: [10.1186/s12936-016-1487-z](https://doi.org/10.1186/s12936-016-1487-z);
37. Vallières, Cindy; Fisher, Nicholas; Antoine, Thomas; Al-Helal, Mohammed; Stocks, Paul; Berry, Neil G.; Lawrenson, Alexandre S.; Ward, Stephen A.; O'Neill, Paul M.; Biagini, Giancarlo A.; e Meunier, Brigitte. (2012). HDQ, a Potent Inhibitor of *Plasmodium falciparum* Proliferation, Binds to the Quinone Reduction Site of the Cytochrome *bc*₁ Complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56 (7), 3739-3747. doi: [10.1128/AAC.00486-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00486-12);
38. Barton, Victoria; Fisher, Nicholas; Biagini, Giancarlo A.; Ward, Stephen A. e Paul O'Neill, M. (2010). Inhibiting *Plasmodium* cytochrome *bc*₁: a complex issue. *Elsevier*, 14:440-446. doi: [10.1016/j.cbpa.2010.05.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.05.005);
39. Biagini, Giancarlo A.; Fisher, Nicholas; Shone, Alison E.; Mubaraki, Murad A.; Srivastava, Abhishek; Hill, Alisdair; Antoine, Thomas; Warman, Ashley J.; Davies, Jill; Pidathala, Chandrakala; Amewu, Richard K.; Leung, Suet C.; Sharma, Raman; Gibbons, Peter; Hong, David W.; Pacorel, Bénédicte; Lawrenson, Alexandre S.; Charoensutthivarakul, Sitthivut; Taylor, Lee; Berger, Olivier; Mbekeani, Alison; Stocks, Paul A.; Nixon, Gemma L.; Chadwick, James; Hemingway, Janet; Delves, Michael J.; Sinden, Robert E.; Zeeman, Anne-Marie; Kocken, Clemens H. M.; Berry, Neil G.; O'Neill, Paul M. e Ward, Stephen A. (2012). Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *PNAS*, 109 (21), 8298-8303. doi: [10.1073/pnas.1205651109](https://doi.org/10.1073/pnas.1205651109);
40. Nixon, Gemma L.; Pidathala, Chandrakala; Shone, Alison E.; Antoine, Thomas; Fisher, Nicholas; O'Neill, Paul M.; Ward, Stephen A. e Biagini, Giancarlo A. (2013). Targeting the mitochondrial electron transport chain of *Plasmodium falciparum*: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *PNAS*, 5 (13), 1573-1591. doi: [10.4155/FMC.13.121](https://doi.org/10.4155/FMC.13.121);
41. Doggett, J. Stone; Nilsen, Aaron; Forquer, Isaac; Wegmann, Keith W.; Jones-Brando, Lorraine; Yolken, Robert H.; Bordón, Claudia; Charman, Susan A.; Katneni, Kasiram; Schultz, Tracey; Burrows, Jeremy N.; Hinrichs, David J.; Meunier, Brigitte; Carruthers, Vern B. e Riscoe, Michael K. (2012). Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. *PNAS*, 109 (39), 15936-15941. doi: [10.1073/pnas.1208069109](https://doi.org/10.1073/pnas.1208069109);
42. Beteck, Richard M.; Smit, Frans J.; Haynes, Richard K. e N'Da, David D. (2014). Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. *Malaria Journal*, 13 (339). doi: [10.1186/1475-2875-13-339](https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-339);

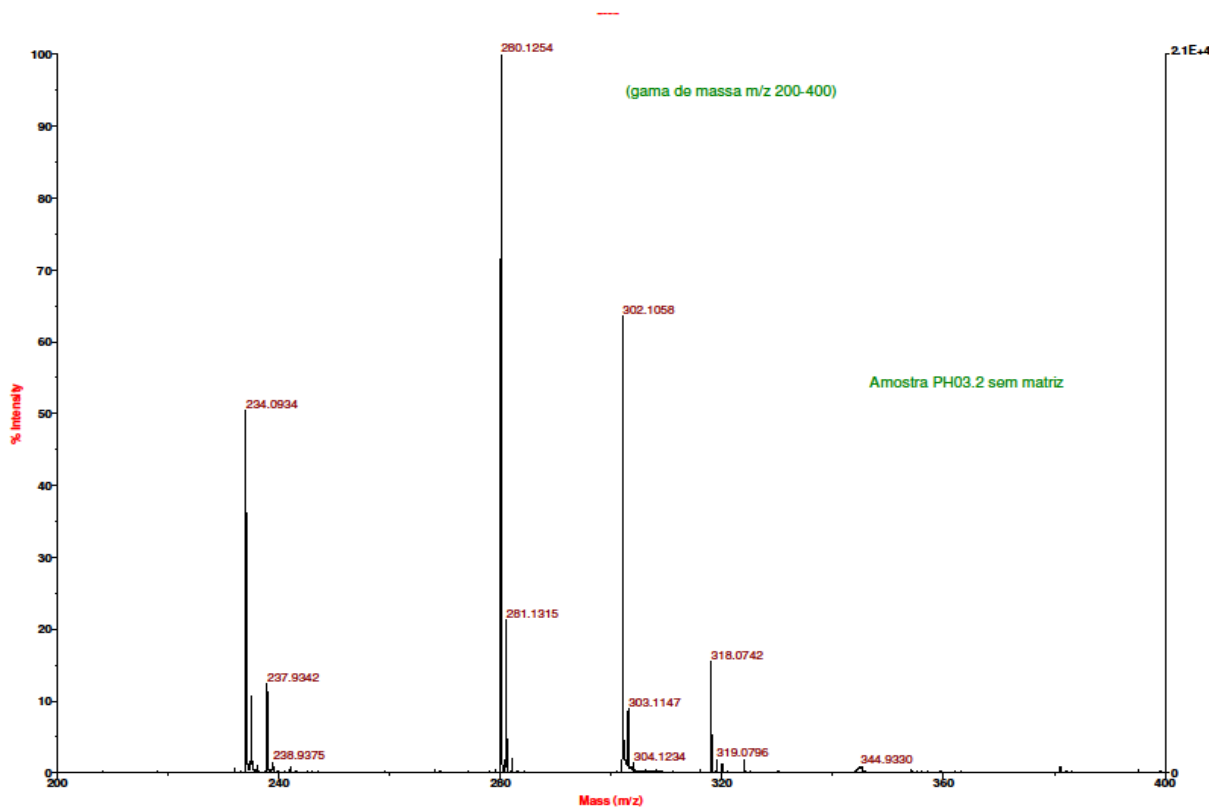
43. Horta, P.: "Synthesis and study of quinolonas targeting plasmodial *bc*₁ protein complex", Research Seminars of Doctoral Program, Faro (Setembro 2015), Portugal;
44. Horta, P.: "Design and synthesis of quinolones directed to the *Plasmodium falciparum* *bc*₁ protein complex"m Group Meeting (Medicinal Chemistry and Organic Reactivity Group), Faro (Maio 2014), Portugal.

Anexo 1a- 1



Cal ext
D:_Amostra PH03.2_0001.dat
Acquired: 17:34:00, April 20, 2012

Anexo 1a- 2



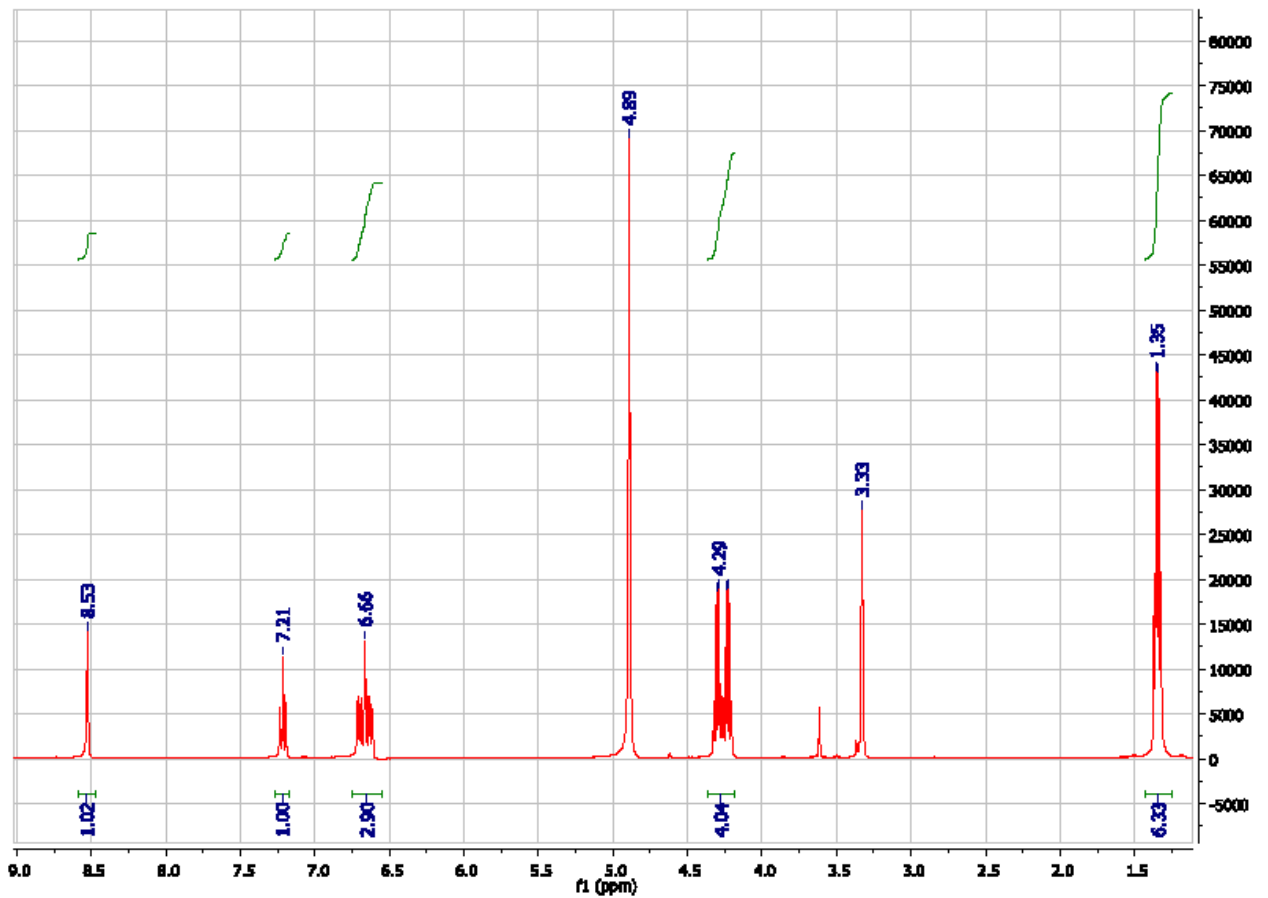
Cal ext
D:_Amostra PH03.2_0001.dat
Acquired: 17:34:00, April 20, 2012

Anexo 1a- 3

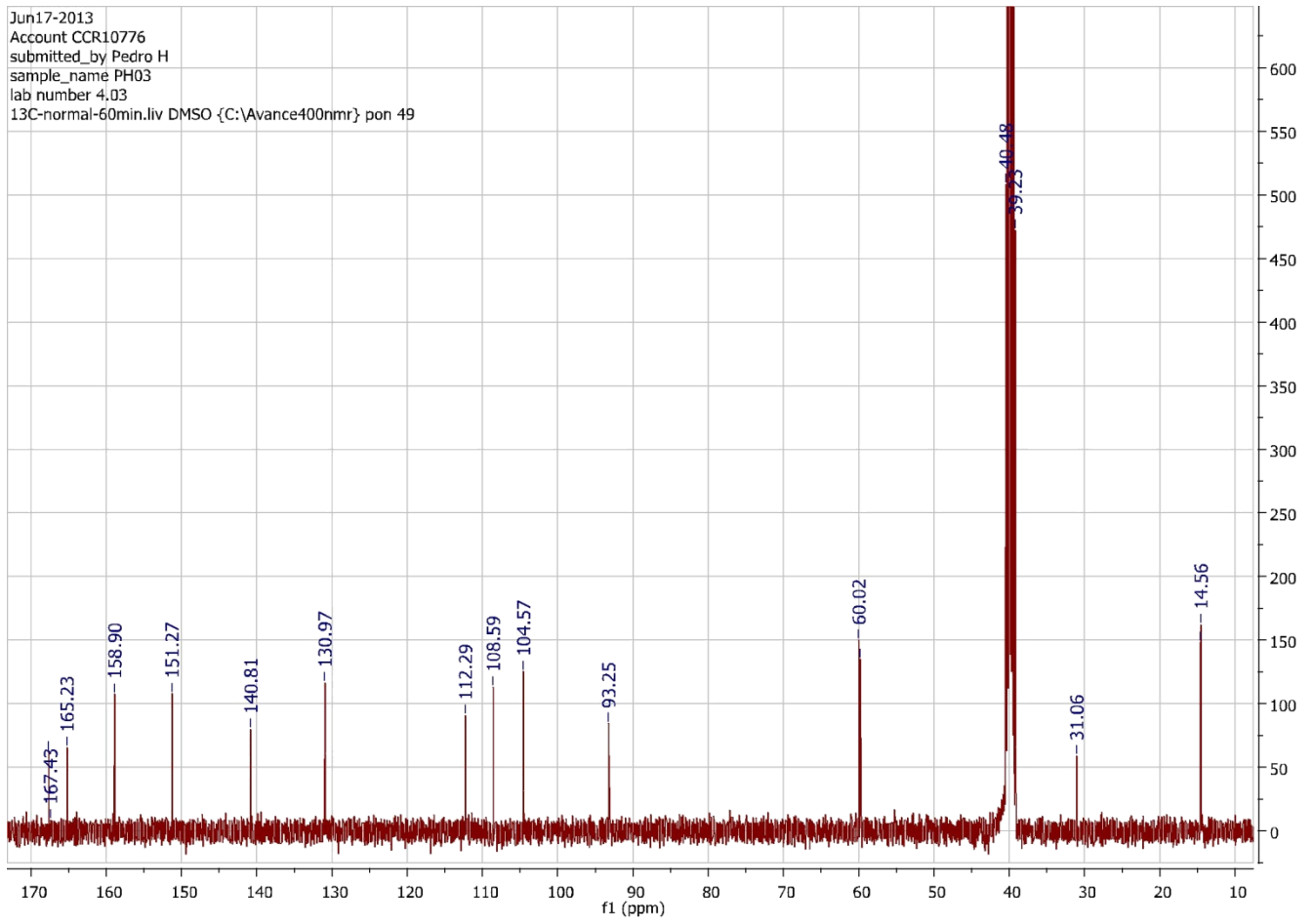
Amostra PH03.2 sem matriz

Index	Centroid Mass	Lower Bound	Upper Bound	Height	Relative Intensity	Area
1	23.18671	22.79	23.25	108	0.5	1506.61
2	29.286278	28.99	29.53	258	1.2	3805.96
3	192.325917	191.75	192.92	169	0.79	1794.06
4	234.093383	233.61	234.53	10829	50.47	39411.71
5	235.083267	234.9	235.88	2293	10.69	8633.46
6	237.934194	237.3	238.48	2650	12.35	19795.58
7	238.937494	238.48	239.59	317	1.48	2609.02
8	280.125373	279.45	280.6	21456	100	61255.04
9	281.131529	280.6	281.94	4567	21.29	13722.84
10	302.105814	301.54	302.87	13633	63.54	47351.98
11	303.114731	302.87	303.36	1906	8.89	8459.57
12	304.12337	303.99	305.04	291	1.36	1245.46
13	318.074234	317.71	318.57	3311	15.43	8978.28
14	319.079571	318.57	319.72	400	1.87	1337.4
15	344.933035	343.54	345.63	186	0.86	4125.68

Anexo 1b- 1



Anexo 1c-1





Laboratório de Análises

Um Laboratório ao serviço da Academia e da Indústria
Serviço de Espectrometria de Massa – GC-TOF

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Técnica	Luz Fernandes	Req. Interna	14GCT80
Amostra	PH57	Data da análise	17/07/2014
Submetida por	Professora Maria de Lurdes Cristiano Universidade do Algarve		
Espectrómetro de Massa	GC-TOF		
Modelo:	GCT da Micromass		
Modo de ionização	Impacto Electrónico (EI)		
Introdução da amostra	Introdução directa via sonda		

Resultado:
Espectros de massas em anexo.

Data measured by the Analytical Services of the Laboratório de Análises / Requisite.
Publications that use data measured by the Analytical Services, should include the following information in the appropriate section.
A typical sentence: "Data Mass Spectrometry obtained by the Laboratório de Análises / Requisite of the Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa (<http://www.dq.fct.unl.pt/en/analytical-services>)."

Serviço de Espectrometria de Massa – GC-TOF

Requisite/CQFB
Depto. de Química FCT/UNL
Campus de Caparica
2829-516 Monte de Caparica, Portugal

Tel: +351 212947805
Fax: +351 212948550
Email: luz.fernandes@fct.unl.pt

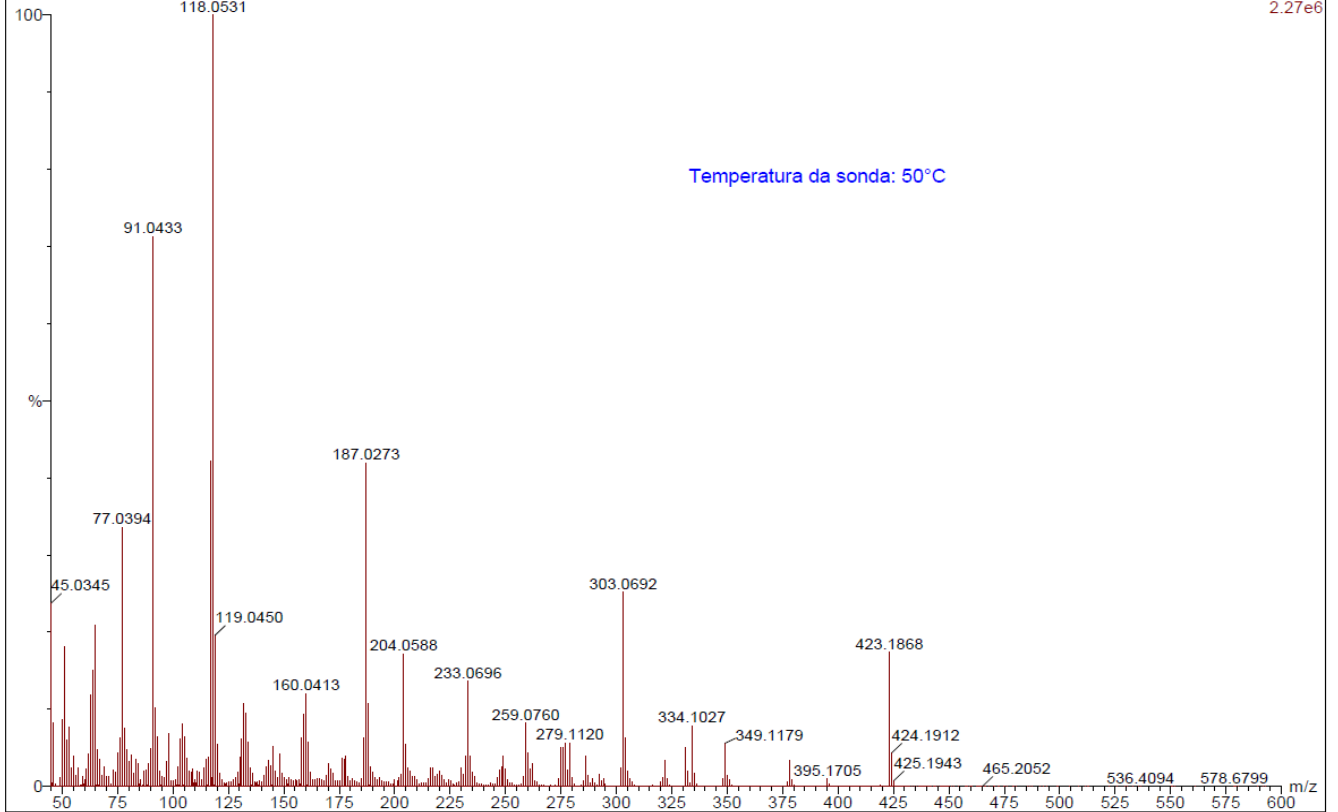
<http://www.dq.fct.unl.pt/servicos-externos>

Anexo 2a- 2

17Julho2014 (14GCT80)

Amostra PH57 923 (15.367) Cm (771:1282-2777:4497)

TOF MS EI+
2.27e6

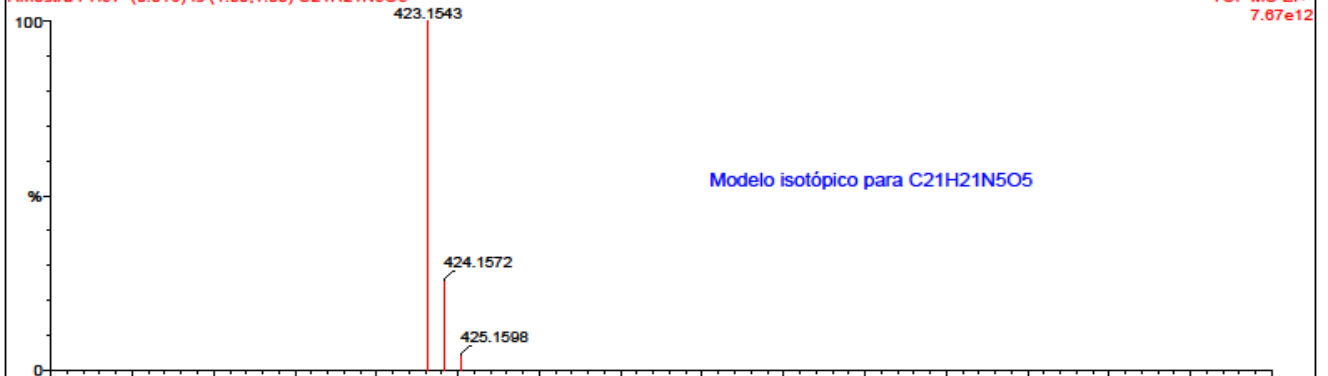


Anexo 2a- 3

17Julho2014 (14GCT80)

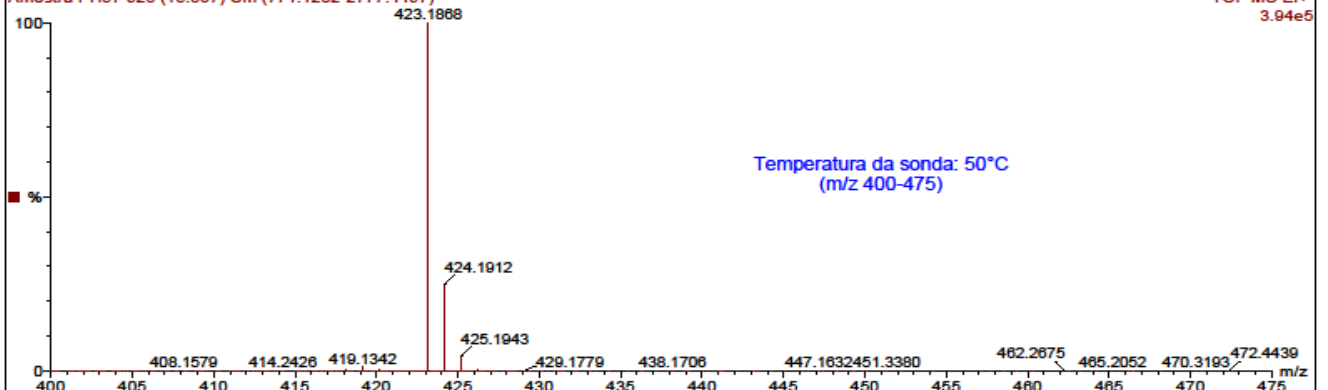
Amostra PH57 (0.016) Is (1.00,1.00) C₂₁H₂₁N₅O₅

TOF MS EI+
7.67e12



Amostra PH57 923 (15.367) Cm (771:1282-2777:4497)

TOF MS EI+
3.94e5

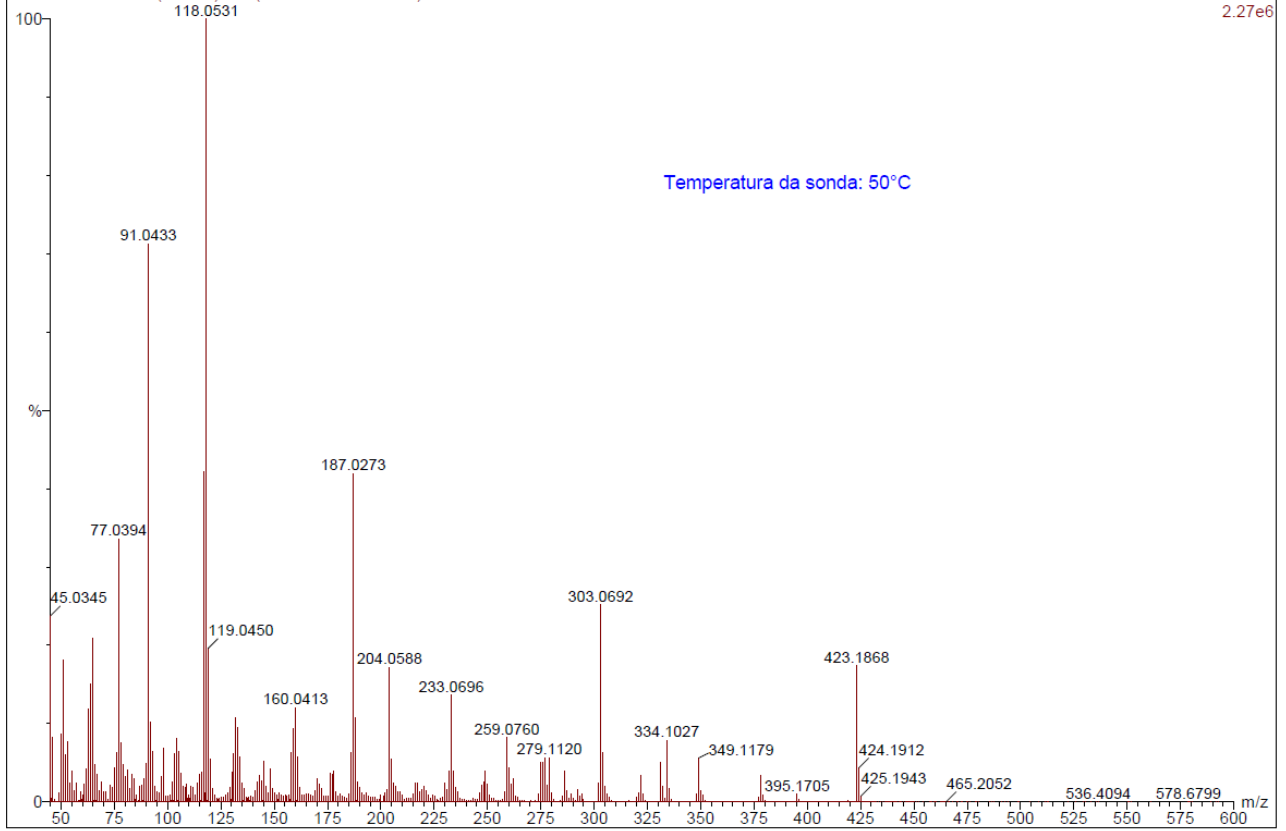


Anexo 2b- 1

17Julho2014 (14GCT80)

Amostra PH57 923 (15.367) Cm (771:1282-2777-4497)

TOF MS EI+
2.27e6



Temperatura da sonda: 50°C



Laboratório de Análises

Um Laboratório ao serviço da Academia e da Indústria

Serviço de Espectrometria de Massa – GC-TOF

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Técnica	Luz Fernandes	Req.Interna	14GCT82
Amostra	PH58	Data da análise	31/07/2014
Submetida por	Professora Maria de Lurdes Cristiano Universidade do Algarve		
Espectrómetro de Massa	GC-TOF		
Modelo:	GCT da Micromass		
Modo de ionização	Impacto Electrónico (EI)		
Introdução da amostra	Introdução directa via sonda		

Resultado:

Espectros de massas em anexo.

Data measured by the Analytical Services of the Laboratório de Análises / Requimte.

Publications that use data measured by the Analytical Services, should include the following information in the appropriate section.
A typical sentence: "Data Mass Spectrometry obtained by the Laboratório de Análises / Requimte of the Departamento de Química da Universidade Nova de Lisboa (<http://www.dq.fct.unl.pt/en/analytical-services>)."

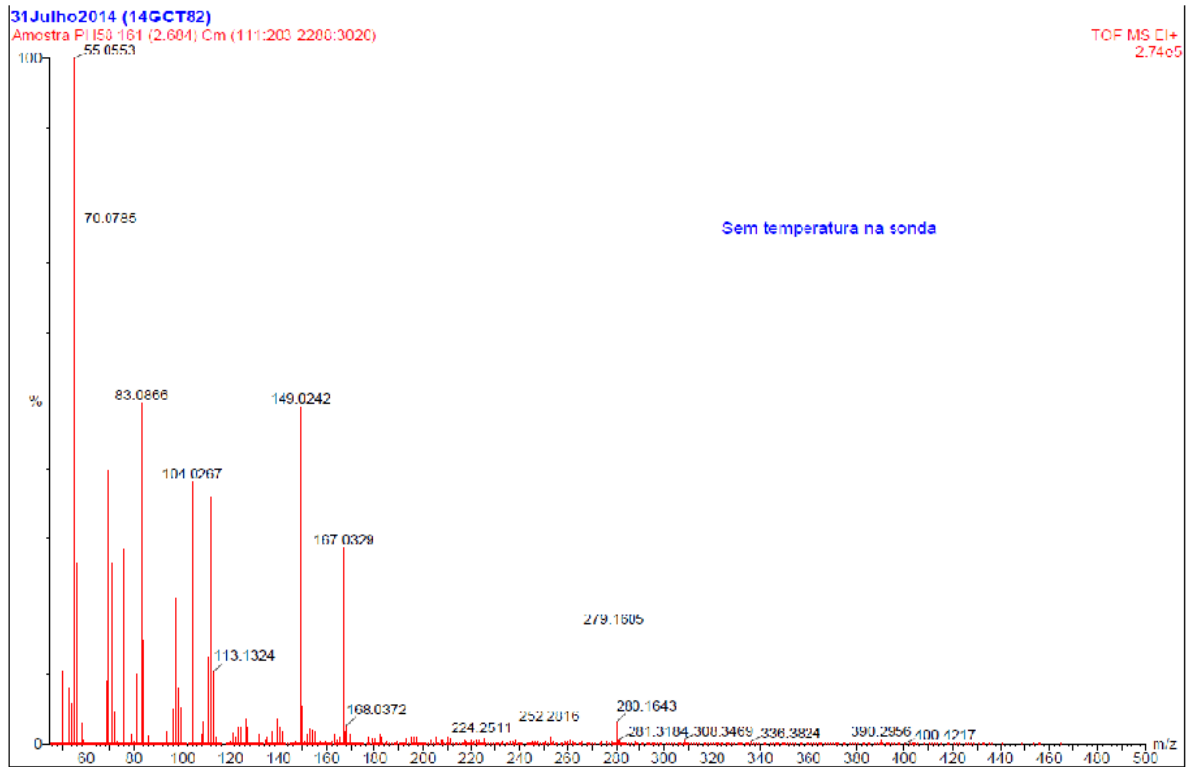
Serviço de Espectrometria de Massa – GC-TOF

Requimte/CQFB
Depto. de Química FCT/UNL
Campus de Caparica
2829-516 Monte de Caparica , Portugal

Tel: +351 212947805
Fax: +351 212948550
Email: luz.fernandes@fct.unl.pt

<http://www.dq.fct.unl.pt/servicos-externos>

Anexo 3a- 2

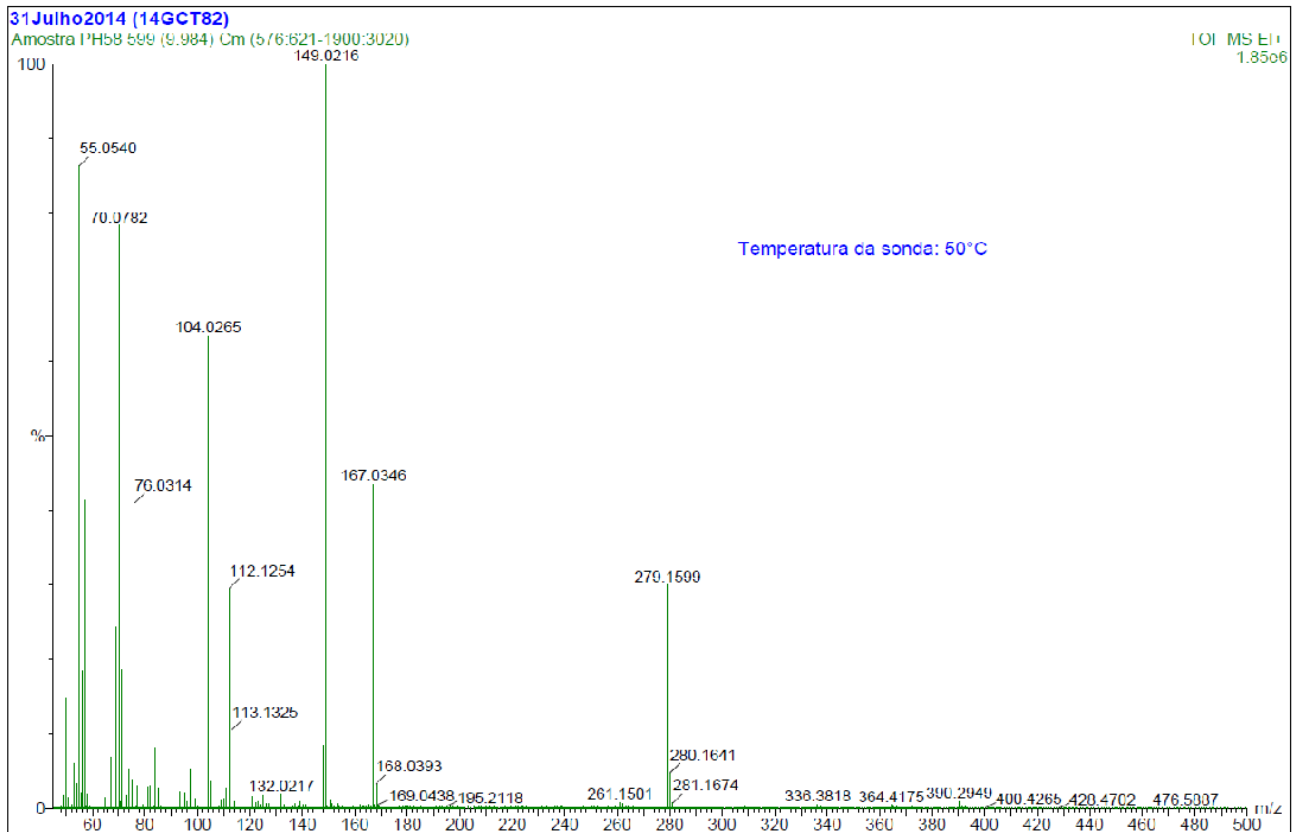


Anexo 3a- 3

31Julho2014 (14GCT82) Amostra PH58 161 (2.684) Cm (111:203-2288:3025) Sem temperatura na sonda, lista de picos com intensidade superior a 400

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	49.0087	3.14e3	1.15	0.13	51:	126.1408	9.76e3	3.56	0.40	101:	187.1478	6.91e2	0.25	0.03	151:	252.2816	8.10e3	2.96	0.33
2:	50.0164	2.86e4	10.42	1.17	52:	127.1491	6.79e3	2.48	0.28	102:	189.1605	1.02e3	0.37	0.04	152:	253.2874	2.47e3	0.90	0.10
3:	53.0398	2.23e4	8.15	0.92	53:	128.1422	8.28e2	0.30	0.03	103:	193.1957	1.82e3	0.66	0.07	153:	254.2972	9.03e2	0.33	0.04
4:	54.0474	1.61e4	5.86	0.66	54:	132.0228	3.61e3	1.32	0.15	104:	194.2041	1.87e3	0.68	0.08	154:	257.2314	6.24e2	0.23	0.03
5:	55.0553	2.74e5	100.00	11.26	55:	134.1024	1.70e3	0.62	0.07	105:	195.2125	2.47e3	0.90	0.10	155:	258.2331	5.53e2	0.20	0.02
6:	56.0626	7.20e4	26.27	2.96	56:	135.0911	2.76e3	1.01	0.11	106:	196.2193	2.72e3	0.99	0.11	156:	259.2430	7.97e2	0.29	0.03
7:	57.0708	1.20e5	43.92	4.95	57:	136.1186	2.11e3	0.77	0.09	107:	197.1321	4.96e2	0.18	0.02	157:	260.2507	9.35e2	0.34	0.04
8:	58.0721	8.06e3	2.94	0.33	58:	137.1342	4.64e3	1.69	0.19	108:	197.2271	2.30e3	0.84	0.09	158:	261.1505	1.26e3	0.46	0.05
9:	59.0507	1.11e3	0.40	0.05	59:	138.1416	4.32e3	1.58	0.18	109:	199.1494	5.56e2	0.20	0.02	159:	261.2572	8.18e2	0.30	0.03
10:	67.0551	3.95e4	14.41	1.62	60:	139.1498	9.77e3	3.56	0.40	110:	201.1649	6.53e2	0.24	0.03	160:	262.1583	8.80e2	0.32	0.04
11:	68.0628	2.47e4	9.02	1.02	61:	140.1565	6.75e3	2.46	0.28	111:	202.0779	5.34e2	0.19	0.02	161:	262.2657	6.41e2	0.23	0.03
12:	69.0708	1.09e5	39.67	4.47	62:	141.1650	5.01e3	1.83	0.21	112:	203.1785	1.35e3	0.49	0.06	162:	263.2733	4.28e2	0.16	0.02
13:	70.0785	2.07e5	75.60	8.52	63:	142.1686	4.72e2	0.17	0.02	113:	204.1863	4.73e2	0.17	0.02	163:	264.2817	5.17e2	0.19	0.02
14:	71.0862	7.25e4	26.47	2.98	64:	145.1002	6.38e2	0.23	0.03	114:	205.1827	2.27e3	0.83	0.09	164:	266.2985	7.69e2	0.28	0.03
15:	72.0701	1.27e4	4.65	0.52	65:	147.1127	9.53e2	0.35	0.04	115:	207.2103	1.22e3	0.45	0.05	165:	267.3024	5.89e2	0.22	0.02
16:	73.0088	4.95e2	0.18	0.02	66:	148.0162	1.17e4	4.27	0.48	116:	208.2200	1.35e3	0.49	0.06	166:	270.2383	4.14e2	0.15	0.02
17:	73.0655	8.66e2	0.32	0.04	67:	148.1234	1.03e3	0.38	0.04	117:	209.2279	1.77e3	0.65	0.07	167:	271.2422	4.31e2	0.16	0.02
18:	75.0236	5.60e3	2.04	0.23	68:	149.0242	1.35e5	49.17	5.54	118:	210.2348	2.42e3	0.88	0.10	168:	272.2513	5.96e2	0.22	0.02
19:	76.0317	7.79e4	28.43	3.20	69:	149.1204	5.29e3	1.93	0.22	119:	211.2407	2.16e3	0.79	0.09	169:	273.2596	6.14e2	0.22	0.03
20:	76.9965	6.62e2	0.24	0.03	70:	150.0287	1.47e4	5.37	0.61	120:	213.1645	4.65e2	0.17	0.02	170:	274.2658	8.34e2	0.30	0.03
21:	79.0554	3.45e3	1.26	0.14	71:	150.1353	1.87e3	0.68	0.08	121:	215.1794	5.89e2	0.21	0.02	171:	275.2731	5.72e2	0.21	0.02
22:	80.0623	7.86e2	0.29	0.03	72:	151.0345	1.02e3	0.37	0.04	122:	217.1922	1.37e3	0.50	0.06	172:	276.2827	7.27e2	0.27	0.03
23:	81.0710	2.75e4	10.02	1.13	73:	151.1493	3.53e3	1.29	0.14	123:	218.1987	9.03e2	0.33	0.04	173:	277.2895	4.57e2	0.17	0.02
24:	82.0785	2.28e4	8.32	0.94	74:	152.1570	3.28e3	1.20	0.13	124:	219.2101	1.34e3	0.49	0.06	174:	278.2988	9.60e2	0.35	0.04
25:	83.0866	1.36e5	49.76	5.61	75:	153.1653	6.18e3	2.26	0.25	125:	220.1915	1.74e3	0.64	0.07	175:	279.1605	4.64e4	16.93	1.91
26:	84.0936	4.07e4	14.86	1.67	76:	154.1723	5.42e3	1.98	0.22	126:	221.2246	1.01e3	0.37	0.04	176:	279.3103	4.93e2	0.18	0.02
27:	85.1019	3.11e4	11.33	1.28	77:	155.1804	4.36e3	1.59	0.18	127:	222.2352	1.36e3	0.49	0.06	177:	280.1643	8.68e3	3.17	0.36
28:	86.1036	3.13e3	1.14	0.13	78:	157.1007	8.47e2	0.31	0.03	128:	223.2428	1.65e3	0.60	0.07	178:	280.3142	6.54e3	2.39	0.27
29:	93.0702	4.42e3	1.61	0.18	79:	159.1161	7.63e2	0.28	0.03	129:	224.2511	3.28e3	1.20	0.13	179:	281.1694	1.26e3	0.46	0.05
30:	95.0869	2.17e4	7.92	0.89	80:	160.1235	4.57e2	0.17	0.02	130:	225.2569	1.82e3	0.66	0.07	180:	281.3184	1.79e3	0.65	0.07
31:	96.0939	1.37e4	4.99	0.56	81:	161.1269	9.32e2	0.34	0.04	131:	227.1805	5.51e2	0.20	0.02	181:	282.3279	5.59e2	0.20	0.02
32:	97.1021	5.80e4	21.17	2.39	82:	162.1389	8.83e2	0.32	0.04	132:	229.1967	6.34e2	0.23	0.03	182:	287.2731	4.94e2	0.18	0.02
33:	98.1094	2.20e4	8.04	0.91	83:	163.1398	3.34e3	1.22	0.14	133:	231.2119	1.01e3	0.37	0.04	183:	288.2833	6.98e2	0.25	0.03
34:	99.1169	1.43e4	5.23	0.59	84:	164.1546	1.41e3	0.52	0.06	134:	232.2173	6.95e2	0.25	0.03	184:	289.2906	4.39e2	0.16	0.02
35:	100.1183	1.27e3	0.46	0.05	85:	165.1651	2.72e3	0.99	0.11	135:	233.2271	1.04e3	0.38	0.04	185:	290.2979	5.88e2	0.21	0.02
36:	104.0267	1.04e5	38.08	4.29	86:	166.1725	2.64e3	0.96	0.11	136:	234.2333	4.82e2	0.18	0.02	186:	292.3141	4.96e2	0.18	0.02
37:	108.0927	3.90e3	1.42	0.16	87:	167.0329	7.83e4	28.56	3.22	137:	235.2438	6.42e2	0.23	0.03	187:	302.3020	5.31e2	0.19	0.02
38:	109.1022	9.01e3	3.29	0.37	88:	167.1812	4.49e3	1.64	0.18	138:	236.2513	7.93e2	0.29	0.03	188:	304.3158	4.80e2	0.18	0.02
39:	110.1100	1.61e4	5.87	0.66	89:	168.0372	7.21e3	2.63	0.30	139:	237.2577	8.61e2	0.31	0.04	189:	306.3308	4.03e2	0.15	0.02
40:	111.1180	3.43e4	12.52	1.41	90:	168.1885	4.10e3	1.50	0.17	140:	238.2666	1.44e3	0.53	0.06	190:	308.3469	1.74e3	0.64	0.07
41:	112.1258	9.88e4	36.03	4.06	91:	169.1959	3.44e3	1.25	0.14	141:	239.2717	1.47e3	0.54	0.06	191:	309.3535	4.16e2	0.15	0.02
42:	113.1324	2.83e4	10.32	1.16	92:	171.1151	4.04e2	0.15	0.02	142:	241.1954	4.52e2	0.17	0.02	192:	336.3824	9.99e2	0.36	0.04
43:	114.1358	2.53e3	0.92	0.10	93:	177.1605	2.65e3	0.97	0.11	143:	243.2066	6.39e2	0.23	0.03	193:	364.4202	6.32e2	0.23	0.03
44:	120.0881	9.14e2	0.33	0.04	94:	178.1710	1.15e3	0.42	0.05	144:	245.2265	8.89e2	0.32	0.04	194:	390.2956	1.70e3	0.62	0.07
45:	121.0389	2.69e3	0.98	0.11	95:	179.1794	2.14e3	0.78	0.09	145:	246.2341	7.72e2	0.28	0.03					
46:	121.0850	4.29e3	1.57	0.18	96:	180.1880	2.08e3	0.76	0.09	146:	247.2422	8.90e2	0.32	0.04					
47:	122.1089	2.29e3	0.84	0.09	97:	181.1965	3.10e3	1.13	0.13	147:	248.2502	6.04e2	0.22	0.02					
48:	123.1178	6.54e3	2.39	0.27	98:	182.2042	3.65e3	1.33	0.15	148:	249.2573	6.05e2	0.22	0.02					
49:	124.1256	6.40e3	2.34	0.26	99:	183.2107	2.76e3	1.01	0.11	149:	250.2661	1.25e3	0.45	0.05					
50:	125.1337	1.96e4	7.16	0.81	100:	185.1316	7.46e2	0.27	0.03	150:	251.2749	1.03e3	0.37	0.04					

Anexo 3a- 4



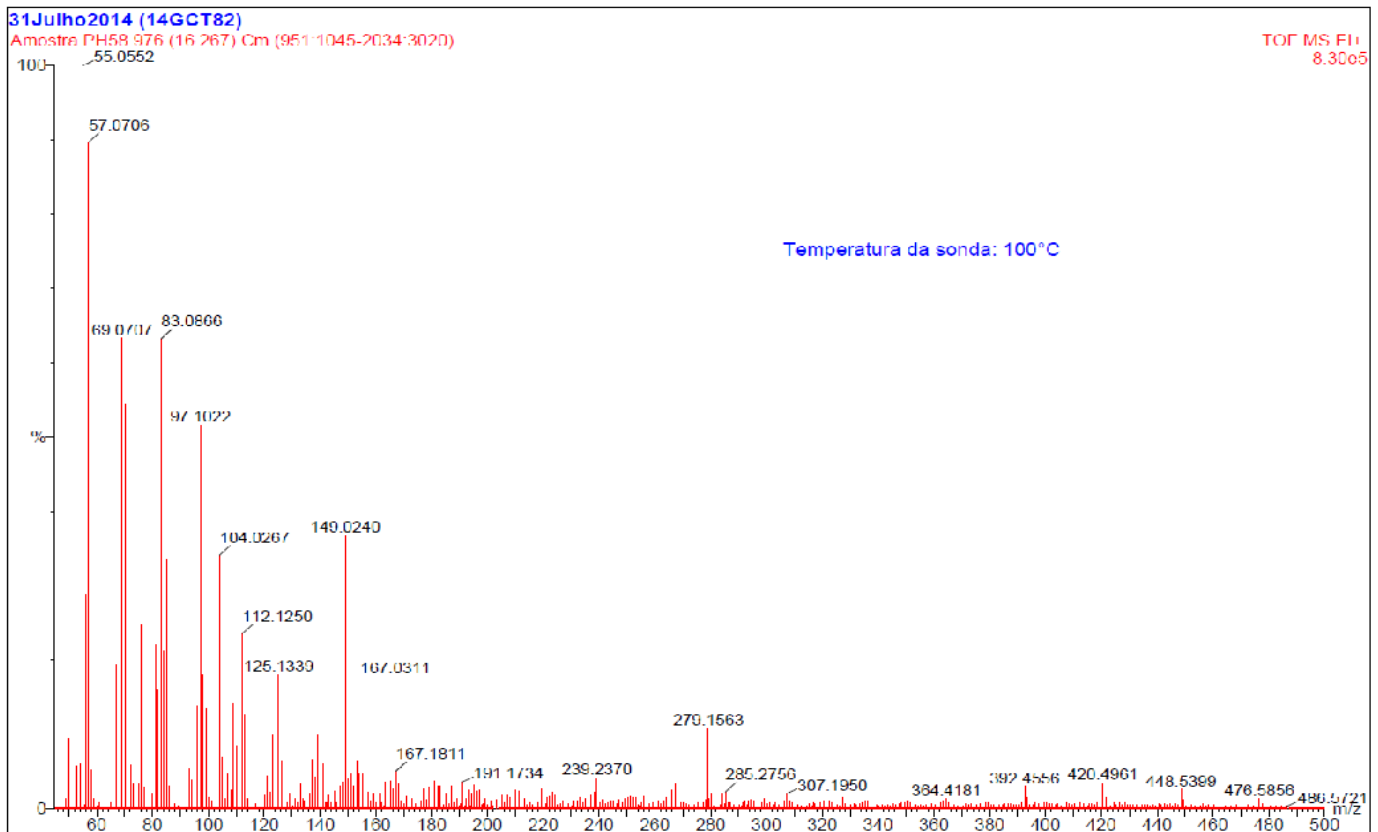
Anexo 3a- 5

31 Julho 2014 (14GCT82) Temperatura da sonda: 50°C, Lista de picos com intensidade superior a 1680

Amostra PH58 599 (9.984) Cm (576:621-1900:3020) TOF MS EI+

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No				
1:	48.0011	2.43e3	0.13	0.02	51:	104.0265	1.17e6	63.50	7.83	101:	165.1651	7.34e3	0.40	0.05	151:	235.2424	2.18e3	0.12	0.01
2:	49.0088	2.96e4	1.60	0.20	52:	104.7322	1.00e4	0.54	0.07	102:	166.1727	4.55e3	0.25	0.03	152:	236.2496	2.42e3	0.13	0.02
3:	50.0162	2.74e5	14.82	1.83	53:	105.0320	6.79e4	3.68	0.45	103:	167.0346	8.05e5	43.59	5.38	153:	237.2593	2.64e3	0.14	0.02
4:	50.5033	1.96e3	0.11	0.01	54:	108.0942	4.26e3	0.23	0.03	104:	167.1825	8.16e3	0.44	0.05	154:	238.2660	2.74e3	0.15	0.02
5:	51.0236	2.62e4	1.42	0.18	55:	109.1025	2.04e4	1.10	0.14	105:	167.9299	1.82e3	0.10	0.01	155:	239.2652	2.69e3	0.15	0.02
6:	52.0268	8.29e3	0.45	0.06	56:	110.1100	2.26e4	1.23	0.15	106:	168.0393	5.95e4	3.22	0.40	156:	245.2272	1.92e3	0.10	0.01
7:	53.0398	1.10e5	5.95	0.73	57:	111.1182	5.07e4	2.75	0.34	107:	168.1888	5.40e3	0.29	0.04	157:	247.2431	2.29e3	0.12	0.02
8:	54.0475	6.07e4	3.29	0.41	58:	112.1254	5.45e5	29.54	3.64	108:	169.0438	8.78e3	0.48	0.06	158:	249.2585	1.99e3	0.11	0.01
9:	55.0540	1.59e6	86.35	10.65	59:	113.1325	1.94e5	10.53	1.30	109:	169.1966	5.23e3	0.28	0.03	159:	250.2669	2.28e3	0.12	0.02
10:	55.5678	3.72e4	2.02	0.25	60:	114.1368	1.57e4	0.85	0.11	110:	171.1184	2.11e3	0.11	0.01	160:	251.2753	2.41e3	0.13	0.02
11:	56.0623	3.43e5	18.58	2.29	61:	121.0302	2.90e4	1.57	0.19	111:	177.1648	5.89e3	0.32	0.04	161:	252.2819	2.35e3	0.13	0.02
12:	56.5809	1.69e3	0.09	0.01	62:	121.1020	4.13e3	0.22	0.03	112:	178.1714	2.99e3	0.16	0.02	162:	253.2886	1.69e3	0.09	0.01
13:	57.0704	7.63e5	41.34	5.10	63:	122.0374	1.38e4	0.75	0.09	113:	179.0437	2.63e3	0.14	0.02	163:	256.2371	2.78e3	0.15	0.02
14:	57.5935	5.52e3	0.30	0.04	64:	122.1094	3.25e3	0.18	0.02	114:	179.1802	6.37e3	0.35	0.04	164:	257.2415	3.06e3	0.17	0.02
15:	58.0747	3.33e4	1.81	0.22	65:	123.1181	1.66e4	0.90	0.11	115:	180.0457	4.47e3	0.24	0.03	165:	259.2425	2.20e3	0.12	0.01
16:	59.0504	4.93e3	0.27	0.03	66:	124.1253	9.61e3	0.52	0.06	116:	180.1875	3.91e3	0.21	0.03	166:	261.1501	1.29e4	0.70	0.09
17:	61.0083	9.50e3	0.51	0.06	67:	125.1341	3.00e4	1.63	0.20	117:	181.1969	6.19e3	0.34	0.04	167:	261.2580	1.99e3	0.11	0.01
18:	65.0397	2.49e4	1.35	0.17	68:	126.1406	1.08e4	0.59	0.07	118:	182.2037	4.42e3	0.24	0.03	168:	262.1570	9.99e3	0.54	0.07
19:	67.0551	1.25e5	6.75	0.83	69:	127.1492	9.99e3	0.54	0.07	119:	183.2116	4.08e3	0.22	0.03	169:	263.1633	2.92e3	0.16	0.02
20:	68.0628	5.70e4	3.09	0.38	70:	128.1405	1.98e3	0.11	0.01	120:	185.1350	2.92e3	0.16	0.02	170:	264.2793	2.34e3	0.13	0.02
21:	69.0706	4.51e5	24.43	3.01	71:	132.0217	3.51e4	1.90	0.23	121:	187.1648	1.97e3	0.11	0.01	171:	265.2894	1.99e3	0.11	0.01
22:	69.6466	1.98e3	0.11	0.01	72:	133.0286	7.35e3	0.40	0.05	122:	189.1634	2.16e3	0.12	0.01	172:	266.2966	2.27e3	0.12	0.02
23:	70.0782	1.45e6	78.29	9.66	73:	134.1083	2.13e3	0.12	0.01	123:	191.1792	6.41e3	0.35	0.04	173:	267.2998	1.85e3	0.10	0.01
24:	70.6573	1.46e4	0.79	0.10	74:	136.1243	3.84e3	0.21	0.03	124:	192.1867	2.67e3	0.14	0.02	174:	275.2736	1.69e3	0.09	0.01
25:	71.0861	3.45e5	18.69	2.31	75:	137.1342	1.21e4	0.66	0.08	125:	193.1962	6.04e3	0.33	0.04	175:	278.2992	2.10e3	0.11	0.01
26:	72.0775	4.11e4	2.23	0.27	76:	138.1413	7.03e3	0.38	0.05	126:	194.2034	3.88e3	0.21	0.03	176:	279.1599	5.53e5	29.96	3.70
27:	73.0084	2.98e4	1.61	0.20	77:	139.1498	1.67e4	0.90	0.11	127:	195.2118	5.01e3	0.27	0.03	177:	279.3174	2.94e3	0.16	0.02
28:	73.0689	2.17e3	0.12	0.01	78:	140.1566	9.09e3	0.49	0.06	128:	196.2190	3.70e3	0.20	0.02	178:	280.1641	8.75e4	4.74	0.58
29:	74.0160	9.53e4	5.16	0.64	79:	141.1648	8.21e3	0.44	0.05	129:	197.2268	3.40e3	0.18	0.02	179:	280.3147	2.97e3	0.16	0.02
30:	75.0236	7.12e4	3.86	0.48	80:	148.0162	1.54e5	8.34	1.03	130:	199.1506	2.41e3	0.13	0.02	180:	281.1674	1.26e4	0.68	0.08
31:	76.0314	7.57e5	41.02	5.06	81:	148.1236	1.95e3	0.11	0.01	131:	201.1646	1.86e3	0.10	0.01	181:	282.1775	1.72e3	0.09	0.01
32:	76.6355	5.46e3	0.30	0.04	82:	149.0216	1.85e6	100.00	12.34	132:	203.1799	2.72e3	0.15	0.02	182:	294.3305	1.85e3	0.10	0.01
33:	76.9968	5.04e3	0.27	0.03	83:	149.1342	3.71e3	0.20	0.02	133:	205.1952	3.59e3	0.19	0.02	183:	306.3324	1.80e3	0.10	0.01
34:	77.0375	5.50e4	2.98	0.37	84:	149.8679	3.17e4	1.72	0.21	134:	207.2114	3.36e3	0.18	0.02	184:	307.3403	1.78e3	0.10	0.01
35:	79.0556	7.83e3	0.42	0.05	85:	150.0276	1.79e5	9.70	1.20	135:	208.2192	2.91e3	0.16	0.02	185:	308.3478	2.63e3	0.14	0.02
36:	81.0712	5.29e4	2.87	0.35	86:	150.1396	4.59e3	0.25	0.03	136:	209.2273	4.01e3	0.22	0.03	186:	334.2314	1.73e3	0.09	0.01
37:	82.0788	5.54e4	3.00	0.37	87:	151.0316	1.81e4	0.98	0.12	137:	210.2346	3.43e3	0.19	0.02	187:	334.3661	1.71e3	0.09	0.01
38:	83.0863	6.01e5	32.56	4.02	88:	151.1494	9.89e3	0.54	0.07	138:	211.2406	2.94e3	0.16	0.02	188:	336.3818	8.22e3	0.45	0.05
39:	83.7173	3.28e3	0.18	0.02	89:	152.1570	5.77e3	0.31	0.04	139:	213.1713	2.30e3	0.12	0.02	189:	337.3839	2.89e3	0.16	0.02
40:	84.0934	1.50e5	8.15	1.01	90:	153.1654	1.13e4	0.61	0.08	140:	217.1922	3.21e3	0.17	0.02	190:	358.3689	1.86e3	0.10	0.01
41:	85.0107	2.49e3	0.14	0.02	91:	153.4736	2.29e3	0.12	0.02	141:	218.2012	1.96e3	0.11	0.01	191:	364.4175	1.73e3	0.10	0.01
42:	85.1019	4.83e4	2.62	0.32	92:	153.5553	2.06e3	0.11	0.01	142:	219.2099	3.62e3	0.20	0.02	192:	365.4181	2.60e3	0.14	0.02
43:	86.1026	5.33e3	0.29	0.04	93:	154.1725	6.78e3	0.37	0.05	143:	220.2130	1.97e3	0.11	0.01	193:	366.3226	2.42e3	0.13	0.02
44:	93.0526	4.14e4	2.24	0.28	94:	155.1806	6.61e3	0.36	0.04	144:	221.2266	2.66e3	0.14	0.02	194:	370.3716	1.85e3	0.10	0.01
45:	95.0869	3.86e4	2.09	0.26	95:	157.1010	2.91e3	0.16	0.02	145:	222.2345	2.80e3	0.15	0.02	195:	372.3872	2.40e3	0.13	0.02
46:	96.0940	1.64e4	0.89	0.11	96:	159.1161	2.33e3	0.13	0.02	146:	223.2431	3.45e3	0.19	0.02	196:	374.4023	1.71e3	0.09	0.01
47:	97.1022	9.55e4	5.17	0.64	97:	162.0327	8.03e3	0.43	0.05	147:	224.2503	2.70e3	0.15	0.02	197:	386.4078	1.79e3	0.10	0.01
48:	98.1097	5.17e4	2.80	0.35	98:	163.0468	5.18e3	0.28	0.03	148:	225.2578	2.28e3	0.12	0.02	198:	390.2949	1.58e4	0.85	0.11
49:	99.1176	2.37e4	1.28	0.16	99:	163.1492	6.57e3	0.36	0.04	149:	231.2095	2.23e3	0.12	0.01	199:	391.2990	4.41e3	0.24	0.03
50:	100.1109	3.51e3	0.19	0.02	100:	164.1557	3.06e3	0.17	0.02	150:	233.2260	2.76e3	0.15	0.02	200:	392.4547	2.33e3	0.13	0.02

Anexo 3a- 6



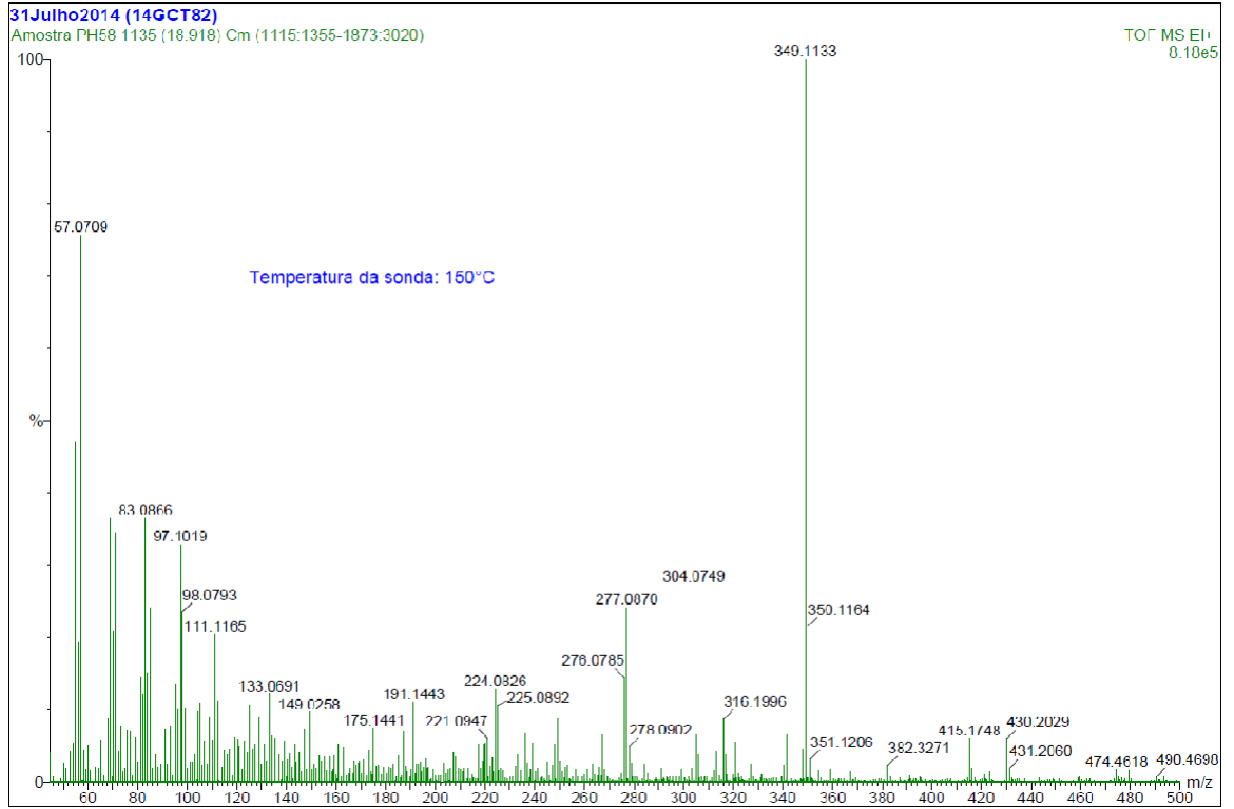
Anexo 3a- 7

31Julho2014 (14GCT82) Amostra PH58 976 (16 267) Cm (951-1045-2034-3020) TOF MS EI+ 8.30e5

Temperatura da sonda: 100°C, Lista de picos com intensidade superior a 8000

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	49.0087	9.95e3	1.20	0.08	51:	114.1346	1.09e4	1.32	0.08	101:	169.1962	2.95e4	3.55	0.23
2:	50.0165	7.83e4	9.44	0.60	52:	119.0865	2.47e4	2.98	0.19	102:	171.1198	1.34e4	1.61	0.10
3:	53.0399	4.73e4	5.70	0.36	53:	120.0928	1.46e4	1.76	0.11	103:	173.1331	9.94e3	1.20	0.08
4:	54.0476	5.01e4	6.04	0.39	54:	121.1024	3.58e4	4.32	0.28	104:	177.1635	2.28e4	2.75	0.18
5:	55.0552	8.30e5	100.00	6.38	55:	122.1093	1.79e4	2.16	0.14	105:	178.1707	9.90e3	1.19	0.08
6:	56.0626	2.39e5	28.77	1.84	56:	123.1182	8.25e4	9.94	0.63	106:	179.1802	2.40e4	2.89	0.18
7:	57.0706	7.44e5	89.66	5.72	57:	124.1253	4.86e4	5.86	0.37	107:	180.1874	1.72e4	2.07	0.13
8:	58.0719	4.25e4	5.13	0.33	58:	125.1339	1.50e5	18.03	1.15	108:	181.1965	3.08e4	3.71	0.24
9:	59.0475	1.05e4	1.27	0.08	59:	126.1404	5.24e4	6.32	0.40	109:	182.2022	2.47e4	2.97	0.19
10:	67.0553	1.60e5	19.27	1.23	60:	127.1493	5.85e4	7.05	0.45	110:	183.2118	2.54e4	3.06	0.20
11:	68.0628	8.49e4	10.24	0.65	61:	129.0740	1.59e4	1.91	0.12	111:	185.1370	1.61e4	1.94	0.12
12:	69.0707	5.25e5	63.30	4.04	62:	131.0866	1.02e4	1.23	0.08	112:	187.0277	2.51e4	3.03	0.19
13:	70.0784	4.51e5	54.33	3.47	63:	132.0874	8.03e3	0.97	0.06	113:	187.1447	9.12e3	1.10	0.07
14:	71.0864	4.38e5	52.84	3.37	64:	133.0985	2.71e4	3.27	0.21	114:	189.1611	1.02e4	1.23	0.08
15:	72.0741	4.80e4	5.78	0.37	65:	134.0643	1.08e4	1.30	0.08	115:	191.1734	2.96e4	3.57	0.23
16:	73.0208	2.79e4	3.37	0.21	66:	134.1106	8.39e3	1.01	0.06	116:	192.1835	1.09e4	1.31	0.08
17:	74.0185	2.15e4	2.59	0.17	67:	135.1145	4.26e4	5.14	0.33	117:	193.1958	2.07e4	2.49	0.16
18:	74.0601	2.82e4	3.40	0.22	68:	136.1243	1.70e4	2.05	0.13	118:	194.2033	1.67e4	2.01	0.13
19:	75.0246	2.70e4	3.26	0.21	69:	137.1341	5.50e4	6.63	0.42	119:	195.2120	2.63e4	3.17	0.20
20:	76.0317	2.04e5	24.63	1.57	70:	138.1411	3.45e4	4.15	0.26	120:	196.2178	1.95e4	2.35	0.15
21:	77.0388	2.40e4	2.89	0.18	71:	139.1497	8.09e4	9.76	0.62	121:	197.1339	8.10e3	0.98	0.06
22:	79.0556	4.25e4	5.12	0.33	72:	140.1566	5.20e4	6.26	0.40	122:	197.2272	2.05e4	2.47	0.16
23:	80.0624	1.75e4	2.11	0.13	73:	141.1650	5.08e4	6.12	0.39	123:	199.1531	1.07e4	1.29	0.08
24:	81.0710	1.82e5	21.95	1.40	74:	143.0886	1.45e4	1.75	0.11	124:	203.1751	9.08e3	1.09	0.07
25:	82.0787	1.33e5	15.98	1.02	75:	145.1024	1.98e4	2.38	0.15	125:	205.1943	1.53e4	1.85	0.12
26:	83.0866	5.24e5	63.22	4.03	76:	147.1069	2.53e4	3.05	0.19	126:	207.2114	1.49e4	1.79	0.11
27:	84.0928	1.75e5	21.14	1.35	77:	148.0166	2.88e4	3.47	0.22	127:	208.2189	1.31e4	1.58	0.10
28:	85.1022	2.78e5	33.48	2.14	78:	148.1223	9.04e3	1.09	0.07	128:	209.2275	2.06e4	2.48	0.16
29:	86.1042	2.48e4	2.99	0.19	79:	149.0240	3.05e5	36.71	2.34	129:	210.2297	2.07e4	2.49	0.16
30:	87.0473	1.34e4	1.61	0.10	80:	149.1326	3.21e4	3.86	0.25	130:	211.2418	1.88e4	2.26	0.14
31:	93.0700	4.33e4	5.21	0.33	81:	150.0289	3.22e4	3.88	0.25	131:	213.1719	1.02e4	1.23	0.08
32:	94.0772	3.10e4	3.74	0.24	82:	150.1396	1.39e4	1.67	0.11	132:	217.1815	1.53e4	1.85	0.12
33:	95.0869	1.73e5	20.82	1.33	83:	151.1492	3.92e4	4.72	0.30	133:	219.1955	2.18e4	2.62	0.17
34:	96.0940	1.13e5	13.66	0.87	84:	152.1565	2.45e4	2.95	0.19	134:	220.2042	9.50e3	1.15	0.07
35:	97.1022	4.28e5	51.59	3.29	85:	153.1652	5.31e4	6.40	0.41	135:	221.2268	1.28e4	1.54	0.10
36:	98.0970	1.49e5	17.98	1.15	86:	154.1683	3.78e4	4.56	0.29	136:	222.2346	1.34e4	1.62	0.10
37:	99.1181	1.11e5	13.41	0.86	87:	155.0938	1.21e4	1.46	0.09	137:	223.2427	1.82e4	2.19	0.14
38:	100.1132	1.23e4	1.48	0.09	88:	155.1804	3.88e4	4.68	0.30	138:	224.2488	1.54e4	1.86	0.12
39:	101.0657	8.70e3	1.05	0.07	89:	157.1045	1.82e4	2.19	0.14	139:	225.2582	1.45e4	1.75	0.11
40:	104.0267	2.83e5	34.10	2.18	90:	159.1176	1.72e4	2.08	0.13	140:	227.1884	8.63e3	1.04	0.07
41:	105.0455	5.67e4	6.84	0.44	91:	161.1248	1.58e4	1.90	0.12	141:	231.2113	8.17e3	0.99	0.06
42:	106.0744	1.02e4	1.22	0.08	92:	163.1472	2.94e4	3.54	0.23	142:	233.2241	1.11e4	1.33	0.09
43:	107.0862	3.85e4	4.64	0.30	93:	164.1551	1.13e4	1.37	0.09	143:	235.2422	1.06e4	1.27	0.08
44:	108.0938	2.09e4	2.52	0.16	94:	165.1648	3.07e4	3.70	0.24	144:	236.2496	1.18e4	1.42	0.09
45:	109.1024	1.18e5	14.17	0.90	95:	166.1723	2.12e4	2.55	0.16	145:	237.2586	1.45e4	1.74	0.11
46:	110.1096	6.91e4	8.34	0.53	96:	167.0311	1.47e5	17.76	1.13	146:	238.2584	1.83e4	2.20	0.14
47:	111.1182	2.69e5	32.41	2.07	97:	167.1811	4.13e4	4.97	0.32	147:	239.1790	1.08e4	1.30	0.08
48:	112.1250	1.95e5	23.51	1.50	98:	168.0376	1.26e4	1.52	0.10	148:	239.2370	3.42e4	4.12	0.26
49:	113.1332	1.05e5	12.68	0.81	99:	168.1867	2.66e4	3.21	0.20	149:	241.2065	8.98e3	1.08	0.07
50:	114.0575	8.35e3	1.01	0.06	100:	169.1021	8.36e3	1.01	0.06	150:	244.2250	8.67e3	1.05	0.07

Anexo 3a- 8



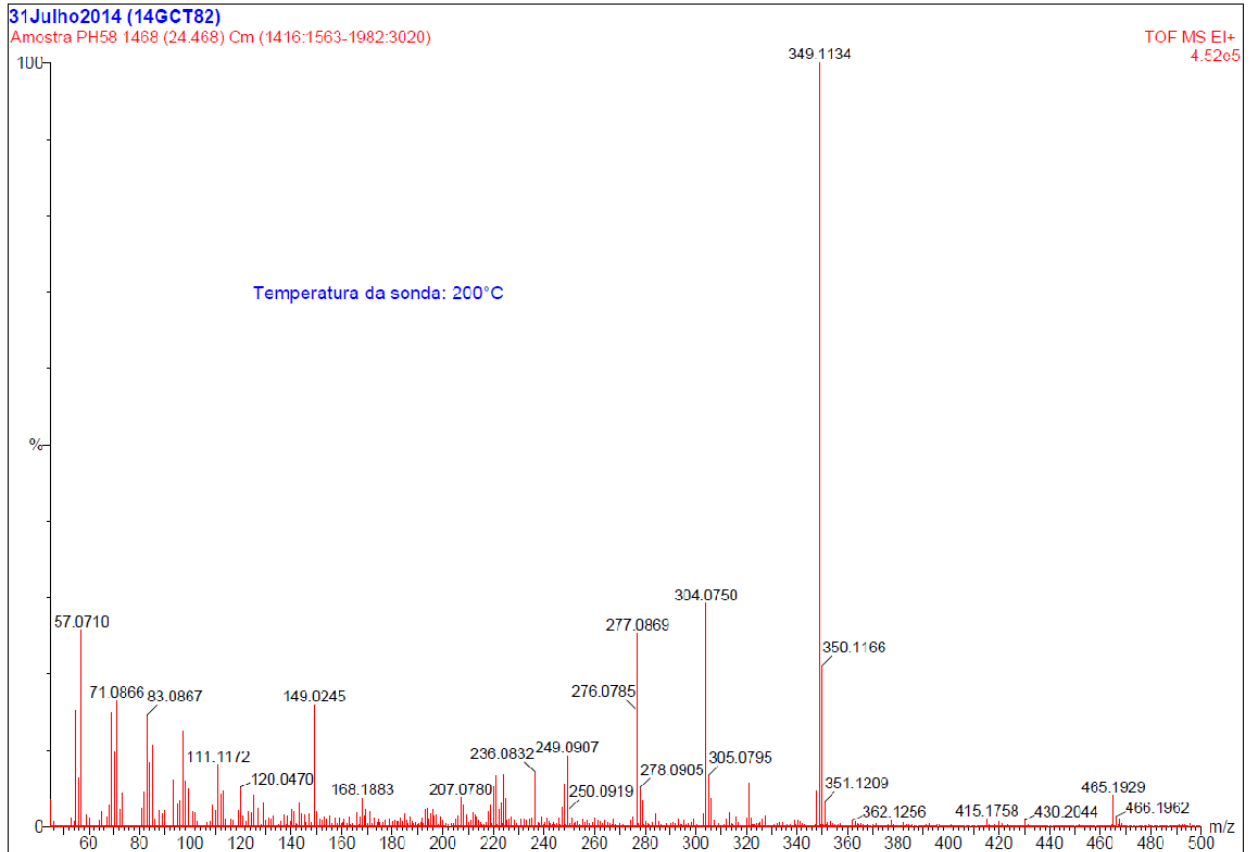
Anexo 3a- 9

31Julho2014 (14GCT82) Temperatura da sonda: 150°C, Lista de picos com intensidade superior a 14000

Amostra PH58 1135 (18.918) Cm (1115:1355-1873:3020) TOF MS EI+

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	45.0351	3.34e4	4.08	0.24	51:	101.0540	2.23e4	2.72	0.16	101:	153.1647	3.03e4	3.71	0.22	151:	222.0896	1.83e4	2.24	0.13
2:	50.0166	2.14e4	2.61	0.15	52:	102.0388	2.25e4	2.75	0.16	102:	154.1671	2.37e4	2.90	0.17	152:	223.0775	2.77e4	3.39	0.20
3:	51.0243	1.57e4	1.92	0.11	53:	103.0502	3.07e4	3.75	0.22	103:	155.0905	2.03e4	2.48	0.15	153:	224.0826	1.05e5	12.84	0.75
4:	53.0035	1.48e4	1.82	0.11	54:	104.0273	7.96e4	9.73	0.57	104:	155.1803	2.85e4	3.49	0.20	154:	224.2472	1.41e4	1.73	0.10
5:	53.0399	3.41e4	4.18	0.24	55:	105.0625	8.93e4	10.92	0.64	105:	157.0996	2.94e4	3.60	0.21	155:	225.0892	8.66e4	10.59	0.62
6:	54.0477	4.29e4	5.24	0.31	56:	106.0677	1.89e4	2.31	0.14	106:	159.1107	2.95e4	3.61	0.21	156:	226.0926	1.60e4	1.96	0.11
7:	55.0189	1.48e4	1.80	0.11	57:	107.0706	4.59e4	5.62	0.33	107:	161.0913	4.18e4	5.11	0.30	157:	232.1839	1.75e4	2.14	0.13
8:	55.0556	3.84e5	46.99	2.75	58:	108.0887	1.99e4	2.44	0.14	108:	163.1152	3.88e4	4.74	0.28	158:	233.0717	3.08e4	3.77	0.22
9:	56.0628	1.58e5	19.29	1.13	59:	109.1022	7.32e4	8.95	0.52	109:	165.1638	1.52e4	1.85	0.11	159:	236.0838	5.50e4	6.72	0.39
10:	57.0709	6.19e5	75.69	4.43	60:	110.1094	4.76e4	5.81	0.34	110:	166.1719	1.46e4	1.78	0.10	160:	237.0991	2.15e4	2.62	0.15
11:	58.0726	3.61e4	4.41	0.26	61:	111.1165	1.67e5	20.46	1.20	111:	167.1803	2.31e4	2.82	0.17	161:	239.2421	4.34e4	5.31	0.31
12:	60.0222	4.11e4	5.03	0.29	62:	112.1146	9.11e4	11.14	0.65	112:	168.0686	1.55e4	1.89	0.11	162:	241.2107	1.62e4	1.98	0.12
13:	63.0241	1.65e4	2.02	0.12	63:	113.1334	6.04e4	7.39	0.43	113:	168.1858	1.85e4	2.26	0.13	163:	245.1534	2.22e4	2.71	0.16
14:	64.0307	1.62e4	1.99	0.12	64:	114.0539	1.72e4	2.11	0.12	114:	169.0846	2.14e4	2.61	0.15	164:	247.0754	1.89e4	2.31	0.14
15:	65.0396	4.74e4	5.80	0.34	65:	115.0571	3.64e4	4.45	0.26	115:	169.1960	2.30e4	2.81	0.16	165:	248.0829	4.23e4	5.18	0.30
16:	67.0553	1.09e5	13.30	0.78	66:	116.0547	3.13e4	3.83	0.22	116:	171.1134	2.51e4	3.07	0.18	166:	249.0910	7.14e4	8.73	0.51
17:	68.0629	7.16e4	8.76	0.51	67:	117.0667	3.74e4	4.57	0.27	117:	173.1305	3.68e4	4.50	0.26	167:	250.0906	2.30e4	2.81	0.16
18:	69.0709	2.98e5	36.41	2.13	68:	119.0803	5.05e4	6.17	0.36	118:	175.1441	6.07e4	7.42	0.43	168:	252.2807	1.65e4	2.01	0.12
19:	70.0787	1.71e5	20.89	1.22	69:	120.0493	4.86e4	5.94	0.35	119:	176.1366	1.83e4	2.23	0.13	169:	253.0974	1.89e4	2.31	0.14
20:	71.0866	2.81e5	34.42	2.02	70:	121.0908	4.02e4	4.92	0.29	120:	177.1181	1.94e4	2.37	0.14	170:	263.1655	1.97e4	2.41	0.14
21:	72.0736	3.56e4	4.35	0.25	71:	123.1177	4.68e4	5.72	0.34	121:	179.0750	1.65e4	2.02	0.12	171:	266.2757	1.65e4	2.02	0.12
22:	73.0298	6.43e4	7.86	0.46	72:	124.1242	3.34e4	4.09	0.24	122:	181.1958	1.69e4	2.07	0.12	172:	267.2727	5.31e4	6.49	0.38
23:	75.0247	1.56e4	1.91	0.11	73:	125.1334	8.66e4	10.58	0.62	123:	182.2000	1.55e4	1.90	0.11	173:	276.0785	1.18e5	14.46	0.85
24:	76.0318	5.84e4	7.14	0.42	74:	126.1384	3.77e4	4.61	0.27	124:	183.2112	1.97e4	2.41	0.14	174:	277.0870	1.97e5	24.15	1.41
25:	77.0396	5.71e4	6.99	0.41	75:	127.1493	4.25e4	5.20	0.30	125:	185.1361	3.05e4	3.73	0.22	175:	278.0902	3.99e4	4.88	0.29
26:	79.0554	5.11e4	6.25	0.37	76:	128.0626	2.43e4	2.97	0.17	126:	187.0283	5.72e4	7.00	0.41	176:	279.1536	2.16e4	2.65	0.16
27:	80.0619	2.21e4	2.71	0.16	77:	129.0708	7.38e4	9.02	0.53	127:	188.0359	1.77e4	2.16	0.13	177:	284.2709	2.07e4	2.53	0.15
28:	81.0711	1.19e5	14.50	0.85	78:	130.0704	2.03e4	2.48	0.15	128:	189.1136	3.51e4	4.30	0.25	178:	291.0822	1.56e4	1.90	0.11
29:	82.0787	9.90e4	12.10	0.71	79:	131.0827	4.22e4	5.16	0.30	129:	191.1443	9.06e4	11.08	0.65	179:	303.0756	1.61e4	1.97	0.12
30:	83.0866	2.99e5	36.50	2.14	80:	132.0785	2.29e4	2.80	0.16	130:	192.1485	1.98e4	2.42	0.14	180:	304.0749	2.24e5	27.35	1.60
31:	84.0569	3.19e4	3.90	0.23	81:	133.0691	9.98e4	12.20	0.71	131:	193.0799	1.98e4	2.43	0.14	181:	305.0801	5.31e4	6.49	0.38
32:	84.0863	1.22e5	14.98	0.88	82:	134.0712	5.14e4	6.28	0.37	132:	194.0760	2.20e4	2.69	0.16	182:	306.0911	3.07e4	3.75	0.22
33:	85.0525	1.91e4	2.34	0.14	83:	135.0914	4.93e4	6.03	0.35	133:	195.0891	1.65e4	2.02	0.12	183:	313.2774	3.53e4	4.32	0.25
34:	85.1022	1.97e5	24.03	1.41	84:	136.1099	1.62e4	1.99	0.12	134:	195.2106	1.52e4	1.85	0.11	184:	316.1996	7.15e4	8.74	0.51
35:	86.1044	1.58e4	1.93	0.11	85:	137.1327	3.13e4	3.83	0.22	135:	196.0892	2.66e4	3.25	0.19	185:	316.7018	3.12e4	3.82	0.22
36:	87.0451	3.09e4	3.78	0.22	86:	138.1400	2.37e4	2.90	0.17	136:	196.2153	1.44e4	1.76	0.10	186:	321.0824	4.54e4	5.55	0.32
37:	88.0515	1.72e4	2.10	0.12	87:	139.1490	4.64e4	5.68	0.33	137:	197.2266	1.66e4	2.03	0.12	187:	327.2953	2.04e4	2.50	0.15
38:	89.0482	1.96e4	2.40	0.14	88:	140.1548	2.59e4	3.16	0.19	138:	203.1325	2.18e4	2.66	0.16	188:	340.3049	1.92e4	2.34	0.14
39:	90.0366	1.76e4	2.15	0.13	89:	141.0713	1.43e4	1.75	0.10	139:	206.1669	1.55e4	1.90	0.11	189:	341.3121	5.45e4	6.67	0.39
40:	91.0546	5.96e4	7.29	0.43	90:	141.1650	3.27e4	3.99	0.23	140:	207.0878	3.37e4	4.12	0.24	190:	348.1076	3.82e4	4.67	0.27
41:	92.0521	2.00e4	2.44	0.14	91:	142.0758	1.69e4	2.06	0.12	141:	208.0891	2.90e4	3.54	0.21	191:	349.1133	8.18e5	100.00	5.86
42:	93.0552	6.38e4	7.80	0.46	92:	143.0739	4.22e4	5.16	0.30	142:	209.0979	1.49e4	1.82	0.11	192:	350.1164	1.76e5	21.54	1.26
43:	95.0870	1.09e5	13.38	0.78	93:	144.0672	2.27e4	2.78	0.16	143:	211.2386	1.59e4	1.95	0.11	193:	351.1206	2.63e4	3.21	0.19
44:	96.0941	8.27e4	10.11	0.59	94:	145.0943	3.35e4	4.10	0.24	144:	213.1754	1.42e4	1.74	0.10	194:	382.3271	1.90e4	2.32	0.14
45:	97.1019	2.69e5	32.84	1.92	95:	147.1001	5.90e4	7.22	0.42	145:	217.1579	4.19e4	5.12	0.30	195:	415.1748	4.93e4	6.03	0.35
46:	98.0793	1.92e5	23.51	1.38	96:	149.0258	7.89e4	9.65	0.56	146:	218.0755	1.52e4	1.86	0.11	196:	416.1782	1.45e4	1.78	0.10
47:	98.1105	1.49e4	1.82	0.11	97:	149.1187	2.74e4	3.35	0.20	147:	219.0824	2.30e4	2.81	0.16	197:	430.2029	4.92e4	6.02	0.35
48:	99.0634	1.47e4	1.80	0.11	98:	150.0424	1.41e4	1.73	0.10	148:	219.1766	4.16e4	5.09	0.30	198:	431.2060	1.55e4	1.89	0.11
49:	99.1158	8.39e4	10.26	0.60	99:	151.1477	2.06e4	2.52	0.15	149:	220.0906	4.33e4	5.30	0.31	199:	474.4618	1.41e4	1.72	0.10
50:	100.0648	1.63e4	1.99	0.12	100:	152.1555	1.61e4	1.97	0.12	150:	221.0947	4.96e4	6.06	0.35					

Anexo 3a- 10



Anexo 3a- 11

31Julho2014 (14GCT82) TOF MS EI+

Amostra PH58 1468 (24.468) Cm (1416:1563-1982:3020) Temperatura da sonda: 200°C, Lista de picos com intensidade superior a 3100

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	
1:	45.0351	1.62e4	3.59	0.44	51:	123.1154	8.63e3	1.91	0.23	101:	187.0348	5.70e3	1.26	0.15	151:	249.0907	4.14e4	9.15	1.11		
2:	53.0036	5.08e3	1.12	0.14	52:	124.1230	8.35e3	1.85	0.22	102:	192.0703	5.35e3	1.18	0.14	152:	250.0919	1.01e4	2.23	0.27		
3:	55.0556	6.84e4	15.13	1.84	53:	125.1335	1.85e4	4.09	0.50	103:	193.0753	9.73e3	2.15	0.26	153:	251.0822	5.04e3	1.11	0.14		
4:	56.0629	2.89e4	6.38	0.78	54:	126.1392	9.25e3	2.04	0.25	104:	194.0750	1.03e4	2.28	0.28	154:	255.1066	3.90e3	0.86	0.10		
5:	57.0710	1.16e5	25.69	3.13	55:	127.1485	1.04e4	2.30	0.28	105:	194.2024	3.69e3	0.82	0.10	155:	256.2385	4.47e3	0.99	0.12		
6:	59.0495	6.59e3	1.46	0.18	56:	129.0709	1.41e4	3.12	0.38	106:	195.0795	7.39e3	1.63	0.20	156:	257.0877	3.14e3	0.69	0.08		
7:	60.0221	5.19e3	1.15	0.14	57:	130.0613	3.12e3	0.69	0.08	107:	196.0879	1.02e4	2.26	0.28	157:	260.0833	5.09e3	1.13	0.14		
8:	64.0306	3.35e3	0.74	0.09	58:	131.0823	4.99e3	1.10	0.13	108:	196.2181	6.37e3	1.41	0.17	158:	261.0990	3.43e3	0.76	0.09		
9:	65.0395	8.73e3	1.93	0.23	59:	132.0403	3.57e3	0.79	0.10	109:	197.2156	6.97e3	1.54	0.19	159:	264.2497	3.28e3	0.73	0.09		
10:	67.0553	5.87e3	1.30	0.16	60:	132.0828	3.46e3	0.76	0.09	110:	199.0449	5.78e3	1.28	0.16	160:	267.2792	4.63e3	1.02	0.12		
11:	68.0628	1.22e4	2.70	0.33	61:	133.0767	6.28e3	1.39	0.17	111:	199.1656	3.79e3	0.84	0.10	161:	275.0748	5.54e3	1.23	0.15		
12:	69.0710	6.76e4	14.93	1.82	62:	137.1288	6.85e3	1.51	0.18	112:	200.0544	3.10e3	0.69	0.08	162:	276.0785	6.95e4	15.36	1.87		
13:	70.0787	4.45e4	9.84	1.20	63:	138.1376	6.09e3	1.35	0.16	113:	205.0847	3.64e3	0.81	0.10	163:	277.0869	1.14e5	25.30	3.08		
14:	71.0866	7.45e4	16.46	2.00	64:	139.1460	1.06e4	2.35	0.29	114:	206.0760	6.52e3	1.44	0.18	164:	278.0905	2.29e4	5.06	0.62		
15:	72.0764	1.01e4	2.23	0.27	65:	140.1562	9.63e3	2.13	0.26	115:	207.0780	1.69e4	3.74	0.45	165:	279.1565	1.51e4	3.35	0.41		
16:	73.0298	1.95e4	4.32	0.53	66:	141.1627	8.48e3	1.87	0.23	116:	208.0858	1.23e4	2.72	0.33	166:	284.2723	7.40e3	1.64	0.20		
17:	81.0712	1.05e4	2.33	0.28	67:	143.0582	1.40e4	3.10	0.38	117:	209.0850	7.03e3	1.55	0.19	167:	293.0831	4.26e3	0.94	0.11		
18:	82.0787	2.03e4	4.48	0.55	68:	144.0593	7.81e3	1.73	0.21	118:	211.0418	6.78e3	1.50	0.18	168:	295.1994	3.29e3	0.73	0.09		
19:	83.0867	6.60e4	14.59	1.78	69:	145.0879	6.62e3	1.46	0.18	119:	211.2367	3.28e3	0.72	0.09	169:	299.1692	3.68e3	0.81	0.10		
20:	84.0894	3.81e4	8.41	1.02	70:	147.0991	7.64e3	1.69	0.21	120:	212.0471	8.21e3	1.81	0.22	170:	302.0622	3.93e3	0.87	0.11		
21:	85.0494	3.70e3	0.82	0.10	71:	149.0245	7.17e4	15.85	1.93	121:	213.0591	6.63e3	1.46	0.18	171:	303.0768	7.29e3	1.61	0.20		
22:	85.1021	4.79e4	10.59	1.29	72:	149.1209	4.38e3	0.97	0.12	122:	213.1908	5.76e3	1.27	0.16	172:	304.0750	1.32e5	29.18	3.55		
23:	86.1041	4.52e3	1.00	0.12	73:	150.0306	9.00e3	1.99	0.24	123:	214.0665	3.20e3	0.71	0.09	173:	305.0795	3.01e4	6.65	0.81		
24:	87.0446	1.21e4	2.68	0.33	74:	151.1383	4.54e3	1.00	0.12	124:	218.0743	8.47e3	1.87	0.23	174:	306.0909	1.68e4	3.71	0.45		
25:	88.0520	9.58e3	2.12	0.26	75:	152.1530	3.44e3	0.76	0.09	125:	219.0822	1.22e4	2.69	0.33	175:	307.0965	3.44e3	0.76	0.09		
26:	89.0535	7.52e3	1.66	0.20	76:	153.1624	5.75e3	1.27	0.15	126:	220.0880	2.31e4	5.10	0.62	176:	312.1802	4.63e3	1.02	0.12		
27:	90.0370	9.22e3	2.04	0.25	77:	154.1693	4.04e3	0.89	0.11	127:	221.0940	2.99e4	6.61	0.80	177:	313.1889	7.89e3	1.74	0.21		
28:	93.0406	2.76e4	6.09	0.74	78:	155.0860	4.18e3	0.92	0.11	128:	222.0850	9.91e3	2.19	0.27	178:	313.2809	3.49e3	0.77	0.09		
29:	95.0869	1.31e4	2.90	0.35	79:	155.1781	6.54e3	1.45	0.18	129:	223.0766	1.39e4	3.08	0.38	179:	316.2000	5.52e3	1.22	0.15		
30:	96.0942	1.52e4	3.36	0.41	80:	157.1125	5.40e3	1.19	0.15	130:	224.0826	3.05e4	6.74	0.82	180:	320.0763	5.16e3	1.14	0.14		
31:	97.1022	5.66e4	12.50	1.52	81:	159.1098	5.22e3	1.15	0.14	131:	225.0892	1.69e4	3.73	0.45	181:	321.0826	2.56e4	5.66	0.69		
32:	98.0835	2.72e4	6.01	0.73	82:	161.0965	4.56e3	1.01	0.12	132:	225.2511	3.52e3	0.78	0.09	182:	322.0868	5.32e3	1.18	0.14		
33:	98.1117	1.11e4	2.46	0.30	83:	163.1068	5.79e3	1.28	0.16	133:	226.0891	3.80e3	0.84	0.10	183:	326.1964	4.34e3	0.96	0.12		
34:	99.0623	3.84e3	0.85	0.10	84:	165.1585	3.11e3	0.69	0.08	134:	227.0782	5.97e3	1.32	0.16	184:	327.2036	6.47e3	1.43	0.17		
35:	99.1139	2.19e4	4.85	0.59	85:	166.1722	8.04e3	1.78	0.22	135:	227.1973	3.19e3	0.71	0.09	185:	339.2098	3.34e3	0.74	0.09		
36:	100.0746	3.16e3	0.70	0.08	86:	167.1790	5.58e3	1.23	0.15	136:	228.0826	3.43e3	0.76	0.09	186:	340.2135	3.18e3	0.70	0.09		
37:	101.0525	8.47e3	1.87	0.23	87:	168.0532	8.40e3	1.86	0.23	137:	230.0745	3.90e3	0.86	0.10	187:	341.1365	6.09e3	1.35	0.16		
38:	102.0374	7.94e3	1.76	0.21	88:	168.1883	1.69e4	3.73	0.45	138:	231.0837	3.89e3	0.86	0.10	188:	341.2202	4.25e3	0.94	0.11		
39:	109.1015	1.25e4	2.77	0.34	89:	169.0763	6.22e3	1.37	0.17	139:	232.0882	3.72e3	0.82	0.10	189:	348.1071	2.07e4	4.56	0.56		
40:	110.1093	9.60e3	2.12	0.26	90:	169.1953	9.93e3	2.20	0.27	140:	233.0816	3.50e3	0.77	0.09	190:	349.1134	4.52e5	100.00	12.17		
41:	111.1172	3.65e4	8.07	0.98	91:	170.9975	8.84e3	1.95	0.24	141:	234.0761	3.96e3	0.88	0.11	191:	350.1166	9.55e4	21.10	2.57		
42:	112.1217	1.91e4	4.22	0.51	92:	171.1252	5.52e3	1.22	0.15	142:	235.0836	5.30e3	1.17	0.14	192:	351.1209	1.48e4	3.26	0.40		
43:	113.1331	2.07e4	4.58	0.56	93:	173.1311	4.85e3	1.07	0.13	143:	236.0832	3.25e4	7.18	0.87	193:	362.1256	3.43e3	0.76	0.09		
44:	114.0502	3.82e3	0.84	0.10	94:	174.5515	4.66e3	1.03	0.13	144:	237.0898	8.03e3	1.78	0.22	194:	377.1438	3.29e3	0.73	0.09		
45:	116.0509	3.90e3	0.86	0.11	95:	177.1102	3.53e3	0.78	0.10	145:	239.2455	5.75e3	1.27	0.15	195:	415.1758	4.01e3	0.89	0.11		
46:	117.0649	3.47e3	0.77	0.09	96:	179.0712	4.29e3	0.95	0.12	146:	241.0924	4.67e3	1.03	0.13	196:	419.1331	3.71e3	0.82	0.10		
47:	119.0584	9.20e3	2.03	0.25	97:	181.0787	3.53e3	0.78	0.09	147:	241.2167	5.17e3	1.14	0.14	197:	430.2044	3.57e3	0.79	0.10		
48:	120.0470	2.31e4	5.11	0.62	98:	183.2051	4.83e3	1.07	0.13	148:	246.0685	5.29e3	1.17	0.14	198:	465.1929	1.82e4	4.02	0.49		
49:	121.0492	4.22e3	0.93	0.11	99:	185.1495	7.24e3	1.60	0.19	149:	247.0753	1.12e4	2.47	0.30	199:	466.1962	5.77e3	1.28	0.16		
50:	121.0918	6.21e3	1.37	0.17	100:	186.0396	3.39e3	0.75	0.09	150:	248.0829	2.51e4	5.54	0.67	200:	467.4263	4.41e3	0.97	0.12		

Anexo 3b- 1

