



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Metodologias de síntese de tetraoxanos com potencial utilização em química medicinal

Patrícia Sofia Menalha Amado

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

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

2015



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Metodologias de síntese de tetraoxanos com potencial utilização em química medicinal

Patrícia Sofia Menalha Amado

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

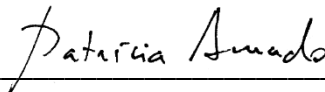
Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de
Lurdes dos Santos Cristiano

2015

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

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

Universidade do Algarve, 24 de setembro de 2015



© 2015 Patrícia Sofia Menalha Amado

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 objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedico este trabalho à minha irmã, Ana Lúcia

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha irmã, Ana Lúcia, pelo amor que demonstrou todos os dias por mim. Agradeço a motivação, compreensão, tolerância, sem os quais a obtenção deste grau não teria sido possível. Obrigada por acreditares nas minhas capacidades.

À Professora Doutora Maria Lurdes Cristiano, minha orientadora de tese, quero expressar a minha admiração e gratidão por si e por todas as oportunidades de valorização e formação científica que me proporcionou. Obrigada pela atenção e apoio prestados, pelo estímulo inculcado e pelos ensinamentos que me prestou ao longo do meu percurso académico. Agradeço ainda a sua amabilidade por me ter facultado a possibilidade de ter realizado o trabalho prático no seu laboratório e ter integrado parte da sua investigação.

À Lília, a minha “orientadora” de laboratório, quero agradecer por toda a sua disponibilidade, ensinamentos e boa disposição que me deu durante a minha jornada no laboratório. Sem ela, a parte experimental teria sido muito complicada de se realizar. Aos meus colegas de laboratório Sara, Amin e Pedro Horta quero deixar um abraço.

Quero agradecer ao meu amigo Jorge pela ajuda que me deu no desenrolar desta dissertação, pela enorme motivação, companhia e conselhos espetaculares. Muito obrigada.

Aos meus amigos, principalmente à Isa, Catarina e Vanda, obrigada pela companhia, motivação e todo o apoio que me deram, ao longo destes anos.

Um especial agradecimento à minha amiga do Canadá, Vivian, pelo apoio e incentivo que me deu mesmo estando tão longe. Muito obrigada.

À minha mãe pela paciência, tolerância ao longo destes tempos.

A todos os que, de algum modo, contribuíram para a minha chegada ao fim desta etapa e que, por falha não intencional, não foram aqui mencionados, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A malária é uma doença tropical infecciosa causada por parasitas do género *Plasmodium*, que são transmitidos pela picada de mosquitos *Anopheles* infetados, afetando, sobretudo, países subdesenvolvidos. Enquanto a quimioterapia continua a ser a única alternativa viável para o tratamento desta doença, existem muitos problemas associados à atual terapêutica. Para além da problemática associada aos efeitos secundários, as resistências estão a aumentar exponencialmente. Isto coloca aos químicos medicinais, o desafio premente da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, facilmente acessíveis, mais eficazes e seguros. Neste contexto, os tetraoxanos podem constituir potenciais candidatos.

Os 1,2,4,5-tetraoxanos são compostos heterocíclicos sintéticos que possuem duas pontes endoperóxido. Estes compostos são muito relevantes em síntese, destacando-se a sua utilização na produção industrial de hidrocarbonetos macrocíclicos e de lactonas. Os tetraoxanos suscitaram especial interesse nas últimas duas décadas, devido à descoberta da sua elevada atividade antimalárica.

Para além da atividade antimalárica, os tetraoxanos podem constituir potenciais candidatos para o tratamento de outras doenças negligenciadas, como a leishmaniose. O potencial farmacológico dos tetraoxanos impulsionou a otimização de estratégias de síntese de novos derivados, de forma a ampliar as bibliotecas de novos compostos para estudos de atividade farmacológica e possibilitar a identificação de novos candidatos a fármacos.

Deste modo, a presente dissertação apresenta uma revisão bibliográfica relativa aos fundamentos teóricos e metodologias da síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos, perspetivando a sua potencial utilização em química farmacêutica. A preparação relativamente económica e a estabilidade associada à função tetraoxano permitem a síntese de derivados com estruturas diversas, alargando a possibilidade de desenvolvimento de novas moléculas-alvo.

No âmbito deste trabalho foram também preparados diversos tetraoxanos que demonstraram ter uma atividade antiparasitária semelhante à miltefosina, um dos fármacos utilizado atualmente no tratamento da Leishmaniose. A grande vantagem dos tetraoxanos relativamente à miltefosina reside no facto de exibirem uma

toxicidade bastante inferior. De entre os compostos preparados destacaram-se os tetraoxanos LC137 e LC140. Estes compostos apresentaram valores de IC₅₀ na região μM baixa, da mesma ordem de grandeza dos obtidos para este fármaco de referência e menor toxicidade.

Palavras-chave: tetraoxanos, malária, leishmaniose, síntese de tetraoxanos, agentes antiparasíticos.

ABSTRACT

Malaria is an infectious tropical disease caused by parasites belonging to the genus *Plasmodium*. It is transmitted *via* the bite of infected mosquitoes of the *Anopheles* genus and affects mainly people living in poor areas of the globe. Although chemotherapy continues to be the only viable alternative for the treatment of this disease, there are many drawbacks arising from current treatments. In addition to the problematic side-effects of currently available drugs, development of resistance is incrementing exponentially. This is proving challenging for medicinal chemists to develop drugs that are easily available, more effective, and safe. In this context, tetraoxanes may turn out to be potential candidates.

1,2,4,5-Tetraoxanes are synthetic compounds which have two heterocyclic endoperoxide bonds. Initially, these compounds were used industrially for the production of macrocyclic hydrocarbons and lactones. The tetraoxanes raised a particular interest in the last two decades, due to the discovery of their high antimalarial activity.

Additionally, tetraoxanes may also constitute potential candidates for the treatment of various neglected infectious diseases such as leishmaniasis. The pharmacological potential of tetraoxanes boosted efforts towards the development and optimization of synthetic strategies and expanded the libraries of new compounds for pharmacological activity studies, allowing the identification of new drug leads.

This thesis presents a bibliographic review on the theoretical foundations and methodologies for the synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes and their potential use in pharmaceutical chemistry. The easy and cheap preparation of tetraoxanes associated to the a higher stability of the tetraoxane function, compared to trioxolanes, allows the synthesis of a library of tetraoxanes with structural diversity, increasing the scope and effectiveness of lead optimization.

This manuscript describes the preparation of a small range of tetraoxanes. The compounds prepared were tested *in vitro* against intramacrophage amastigote forms of *Leishmania donovani* and exhibited anti-leishmania activity, with IC₅₀ values in the same range of miltefosine, one of the drugs currently used in the treatment of leishmaniasis, but with lower toxicity. Among the compounds prepared, tetraoxanes

LC137 and LC140 were the most promising. We consider that these results may be used as a starting point to explore tetraoxanes as tools for Leishmaniasis chemotherapy.

Keywords: *tetraoxanes, malaria, leishmaniasis, synthesis of tetraoxanes, antiparasitic agentes.*

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Malária	1
1.1.1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	1
1.1.2. Controlo da doença	3
1.1.3. Tratamento	4
1.1.3.1. Antimaláricos de base quinolínica	4
1.1.3.2. Antagonistas de folatos.....	5
1.1.3.3. Antibióticos	6
1.1.3.4. Endoperóxidos.....	7
1.1.3.4.1. Artemisinina e análogos.....	7
- Mecanismo de ação	8
i) Formação de radicais centrados em átomos de oxigénio e carbono.....	9
ii) Formação de carbocatiões.....	11
iii) Inibição da proteína PfATP6	11
- Problemas associados à artemisinina e derivados	11
II. ENDOPERÓXIDOS SINTÉTICOS	14
2.1. Introdução aos 1,2,4,-trioxolanos.....	14
2.1.1. A evolução dos trioxolanos como antimaláricos.....	16
2.2. Os 1,2,4,5-tetraoxanos.....	18
2.2.1. Comparação das propriedades de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxolanos.....	18
2.2.2. Aplicação dos tetraoxanos na terapia de outras patologias	20
III. MÉTODOS DE SÍNTESE DOS TETRAOXANOS	22
3.1. Principal intermediário: 1,1-dihidroperóxido	23
3.2. A evolução dos métodos de síntese de dihidroperóxidos e de 1,2,4,5-tetraoxanos.....	26
3.2.1. Trióxido de metilénio (MTO)	27
3.2.2. Iodo molecular	29
3.2.3. Óxido de rénio (VII)	32

3.2.4. Ácido fosfomolibdico (PMA)	34
IV. SÍNTESE E ATIVIDADE DE PERÓXIDOS COM POTENCIAL ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.	37
4.1. Âmbito da parte experimental	37
4.2. Estratégias de síntese e compostos preparados	39
4.2.1. Proteção da amina PA1/LC64, composto (1)	41
4.2.2. Síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos, compostos (2) e (3).....	42
4.2.3. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC153/PA4, composto (4).....	44
4.2.4. Síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5).....	45
4.2.5. Síntese da amida LC176/PA6, composto (6)	47
i) Acoplamento peptídicos usando carbodiimidas.....	48
ii) Uso de aditivos	49
4.3. Resultados e Discussão	52
V. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	56
5.1. Cromatografia	56
5.2. Equipamento.....	56
5.3. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas ao longo do projeto....	57
5.3.1. Síntese do carbamato N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1, composto (1).	57
5.3.2. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2, composto (2).....	57
5.3.3. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3, composto (3).....	58
5.3.4. Síntese do ácido carboxílico LC153/PA4, composto (4).....	59
5.3.5. Síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5).....	59
5.3.6. Síntese do derivado amida, LC176/PA6, composto (6).....	60
VI. CONCLUSÃO	61
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
VIII. ANEXOS	73
7.1. Espectros do composto (1)	73
7.2. Espectros do composto (2)	75
7.3. Espectros do composto (3)	77
7.4. Espectro do composto (4).....	79
7.5. Espectros do composto (5)	80
7.6. Espectros do composto (6)	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1: Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> , no vetor e no hospedeiro	3
Figura I-2: Representação da estrutura do quinino e de alguns outros fármacos de base quinolínicos utilizados para quimioterapia da malária.....	5
Figura I-3: Representação da estrutura de alguns antagonistas de folatos usados na quimioterapia da malária	6
Figura I-4: Representação da estrutura de alguns antibióticos usados na terapêutica da malária	6
Figura I-5: Representação da estrutura da artemisinina e de alguns dos seus derivados semissintéticos usados na terapêutica da malária	8
Figura I-6: Esquema representativo dos mecanismos de bioativação e ação de artemisinina e derivados que envolve a formação de radicais primários e secundários centrados em carbono, após clivagem redutiva mediada por Fe^{2+}	10
Figura I-7: Representação estrutural de alguns endoperóxidos sintéticos com atividade antimalárica.....	13
Figura II-1: Estrutura geral de 1,2,4-trioxolanos	14
Figura II-2: Representação estrutural de compostos modelo para estudo da estabilidade e atividade dos 1,2,4-trioxolanos	16
Figura II-3: Representação da estrutura de OZ-277 ou arterolano	17
Figura II-4: Representação da estrutura do OZ439.....	17
Figura II-5: Representação da estrutura geral de 1,2,4,5-tetraoxanos	18
Figura II-6: Esquema comparativo da estabilidade e reatividade de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxolanos.....	19
Figura II-7: Representação da estrutura do RKA182.....	20
Figura III-1: Representação da estrutura geral dos 1,1,-dihidroperóxidos.....	23
Figura III-2: Produtos secundários associados à decomposição do 1,1-dihidroperóxido.	24
Figura III-3: Representação estrutural de um hexaoxano	25
Figura III-4: Esquema representativo da estratégia de síntese usando MTO como catalisador	27
Figura III-5: Representação da interação de H_2O_2 com HFIP	28
Figura III-6: Esquema representativo da estratégia de síntese do DHPs usando iodo molecular como catalisador	29
Figura III-7: Representação do mecanismo de formação do DHP com participação de iodo molecular.....	30
Figura III-8: Representação da estratégia de síntese do tetraoxanos usando como catalisador o iodo molecular	31
Figura III-9: Representação da estratégia de síntese de DHP usando o Re_2O_7 como catalisador	32

Figura III-10: Representação esquemática da síntese de 1,2,4,5-tetraoxano usando Re_2O_7 como catalisador	33
Figura III-11: Representação da estrutura do ácido fosfomolibdico (PMA)	34
Figura III-12: Representação esquemática da síntese de DHP usando PMA como catalisador	34
Figura III-13: Representação esquemática da síntese de tetroxanos usando PMA como catalisador	35
Figura IV-1: Representação da estrutura geral dos tetroxanos sintetizados.....	39
Figura IV-2: Representação da estratégia de síntese do composto LC157/PA5 (5).	40
Figura IV-3: Representação da estratégia de síntese do composto LC176/PA6 (6).	40
Figura IV-4: Esquema de síntese do carbamato N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1, composto (1).....	41
Figura IV-5: Proposta mecanística da formação do composto N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1 (1).....	41
Figura IV-6: Esquema de síntese dos tetroxanos LC138/PA2, composto (2).....	42
Figura IV-7: Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3, composto (3).....	43
Figura IV-8: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2 (2).	43
Figura IV-9: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3 (3).	44
Figura IV-10: Esquema de síntese do ácido carboxílico LC153/PA4, composto (4).....	44
Figura IV-11: Proposta mecanística para a formação do ácido carboxílico LC153/PA4 (4) por hidrólise do éster (2).	45
Figura IV-12: Esquema de síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5).....	46
Figura IV-13: Proposta mecanística para as reações envolvidas na síntese do composto (5).....	47
Figura IV-14: Representação esquemática da formação de uma ligação amida usando um ácido carboxílico previamente ativado	48
Figura IV-15: Representação da estrutura da EDC, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.....	48
Figura IV-16: Proposta mecanística para o acoplamento peptídico, usando EDC como ativador do ácido carboxílico	49
Figura IV-17: Representação da estrutura do 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt).....	49
Figura IV-18: Esquema de síntese da amida LC176/PA6, composto (6).	50
Figura IV-19: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto (6), por acoplamento peptídico.....	51
Figura IV-20: Representação esquemática da estratégia de desproteção da função amina nos compostos finais do projeto.	52
Figura IV-21: Representação da estrutura molecular da miltefosina.....	53
Figura VIII-1: Espectro de massa obtido para o composto 1.	73
Figura VIII-2: Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 1.	74

Figura VIII-3: Espectro de massa obtido para o composto 2.	75
Figura VIII-4: Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto 2.	76
Figura VIII-5: Espectro de massa obtido para o composto 3.	77
Figura VIII-6: Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto 3.	78
Figura VIII-7: Espectro de massa obtido para o composto 4.	79
Figura VIII-8: Espectro de massa obtido para o composto 5.	80
Figura VIII-9: Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto 5.	81
Figura VIII-10: Espectro de massa obtido para o composto 6.	82
Figura VIII-11: Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto 6.	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela IV-1: Atividade anti-proliferativa dos compostos LC138, LC140 e LC153 em formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania donovani</i> (LV9).....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - ácido desoxirribonucleico

API - Ingrediente farmacologicamente ativo, de *Active Pharmaceutical Ingredient*

ART - Artemisinina

Bn - benzilo

Bz - benzoílo

Boc - Tert-butoxicarbonilo

CH₃CN - Acetonitrilo

DCM - Diclorometano

DCE – Dicloroetano

DHPs – Dihidroperóxido(s)

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Fe - Ferro

H₂O - Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HCl - Ácido clorídrico

HCOOH – Ácido fórmico

HFIP - Hexafluoroisopropanol

HOBT - Hidroxibenzotriazol

IC₅₀ - Concentração necessária para provocar a inibição em 50%

I₂ – Iodo molecular

KOH - Hidróxido de potássio

MeOH - Metanol

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

mol - Mole(s)

mmol - Milimole(s)

MS - Espectrometria de Massa

MTO – Trióxido de metilénio

NaOH - Hidróxido de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization)

P. falciparum - *Plasmodium falciparum*

P.f. – Ponto de fusão

PMA – Ácido fosfomolibdico, de *Phosphomolibdic Acid*

Re₂O₇ – Óxido de rênio (VII)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

ROS - Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

SAR - Structure Activity Relationship (Relação estrutura-atividade)

T.amb – Temperatura ambiente

TFE - 2,2,2-trifluoroetanol

TLC - Thin Layer Chromatography – Cromatografia em Camada Fina

μM – Micromolar

I. INTRODUÇÃO

1.1. Malária

A Malária é uma doença tropical infecciosa causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados e afeta sobretudo países subdesenvolvidos¹. De acordo com o Relatório Mundial da Malária de 2014, da Organização Mundial da Saúde (OMS; do inglês World Health Organization, WHO), a malária é endêmica em 97 países, causou cerca de 584 mil mortes em 2013, principalmente entre crianças africanas, ameaçando no total cerca de 3,2 bilhões de pessoas².

São conhecidas cinco espécies de parasita capazes de infectar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais comuns, sendo a *P. falciparum* responsável pela maioria das infecções letais¹. Nos últimos anos foram identificados alguns casos de malária em seres humanos resultantes de infecção por *P. knowlesi*, uma estirpe anteriormente considerada responsável por infecções em primatas, em países do sudeste da Ásia. Com base nesta evidência a OMS reconheceu o *P. knowlesi* como a quinta espécie de *Plasmodium* causadora da malária no ser humano¹.

No que respeita à sintomatologia nos indivíduos não imunes, os primeiros sintomas aparecem normalmente 7 dias após a inoculação do parasita pelo mosquito infectado. Estes são normalmente febre, cefaleias, calafrios, tremores, vômitos e mal-estar, resultando em complicações graves como anemia, insuficiência renal e malária cerebral. Se não for tratada, principalmente em infecções por *P. falciparum*, a malária progride para um quadro clínico mais severo, sendo frequentemente fatal¹.

1.1.1. Ciclo de vida do *Plasmodium sp.*

O ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, esquematicamente representado na figura I-1³, envolve dois hospedeiros: o ser humano e o mosquito fêmea *Anopheles sp.*

O ciclo de vida do *Plasmodium* pode ser dividido em três fases: a fase sexuada **(C)**, que ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), o ciclo esporogónico, e duas fases assexuadas, que acontecem no hospedeiro humano: o ciclo exoeritrocítico **(A)**, que ocorre no fígado, e o ciclo eritrocítico **(B)**, que se desenvolve no interior dos eritrócitos. A transmissão da malária humana ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles*, durante a sua refeição sanguínea, inocula no hospedeiro as formas infecciosas do parasita, denominadas esporozoítos **(1)**. O *Plasmodium* entra na corrente sanguínea e alcança o fígado do hospedeiro onde, por replicação intracelular, cresce e se multiplica por reprodução assexuada (esquizogonia) **(2)**. Os esporozoítos diferenciam-se em merozoítos, formando células multinucleadas, os esquizontes **(3)**. Posteriormente, os merozoítos rompem a membrana celular dos hepatócitos **(4)**, infetando eritrócitos **(5)**, iniciando o ciclo eritrocítico³.

O ciclo eritrocítico do parasita desenvolve-se em duas fases distintas: multiplicação assexuada por esquizogonia ou diferenciação em estágios sexuais, denominados gametócitos, que irão desenvolver-se no mosquito dando origem aos esporozoítos, aquando de uma nova refeição sanguínea. Durante a esquizogonia hepática são libertados os merozoítos **(4)** que invadem os eritrócitos **(5)**, transformando-se em trofozoítos, os quais, depois de completar o estágio de crescimento vegetativo, se desenvolvem em esquizontes, com merozoítos diferenciados. Posteriormente os eritrócitos parasitados rompem **(6)**, libertando-se novos merozoítos que vão invadir, sucessivamente, novos eritrócitos, mantendo e promovendo o ciclo eritrocítico³. A lise dos eritrócitos, com a consequente libertação de moléculas bioativas do parasita na circulação, e as reações do hospedeiro a estes eventos, estão associadas à patogénese e à sintomatologia característica da doença⁴.

No entanto, alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos masculino e feminino **(7)**³.

Após a picada, o mosquito, ao realizar a sua refeição sanguínea, ingere os gametócitos **(8)**. Inicia-se, posteriormente, um processo dentro do lúmen do intestino médio de exflagelação que resulta na libertação de microgâmetas nucleados. Ocorre fecundação do macrogâmeta pelo microgâmeta **(9)**, com a consequente formação da única forma diplóide do ciclo de vida - o zigoto (ciclo esporogónico ou sexual). O zigoto resultante alonga-se e, após divisão meiótica, dá origem a uma forma móvel e

haplóide denominada oocineto (10) que penetra nas células epiteliais do intestino médio, instalando-se. Posteriormente, transformam-se em oocistos, multiplicando-se estes por um processo de divisão assexuada (11), levando à liberação de esporozoítos que migram até às glândulas salivares do mosquito (12). O mosquito fêmea, ao efetuar uma nova refeição, inocula os esporozoítos na corrente sanguínea do novo hospedeiro, reiniciando o ciclo³.

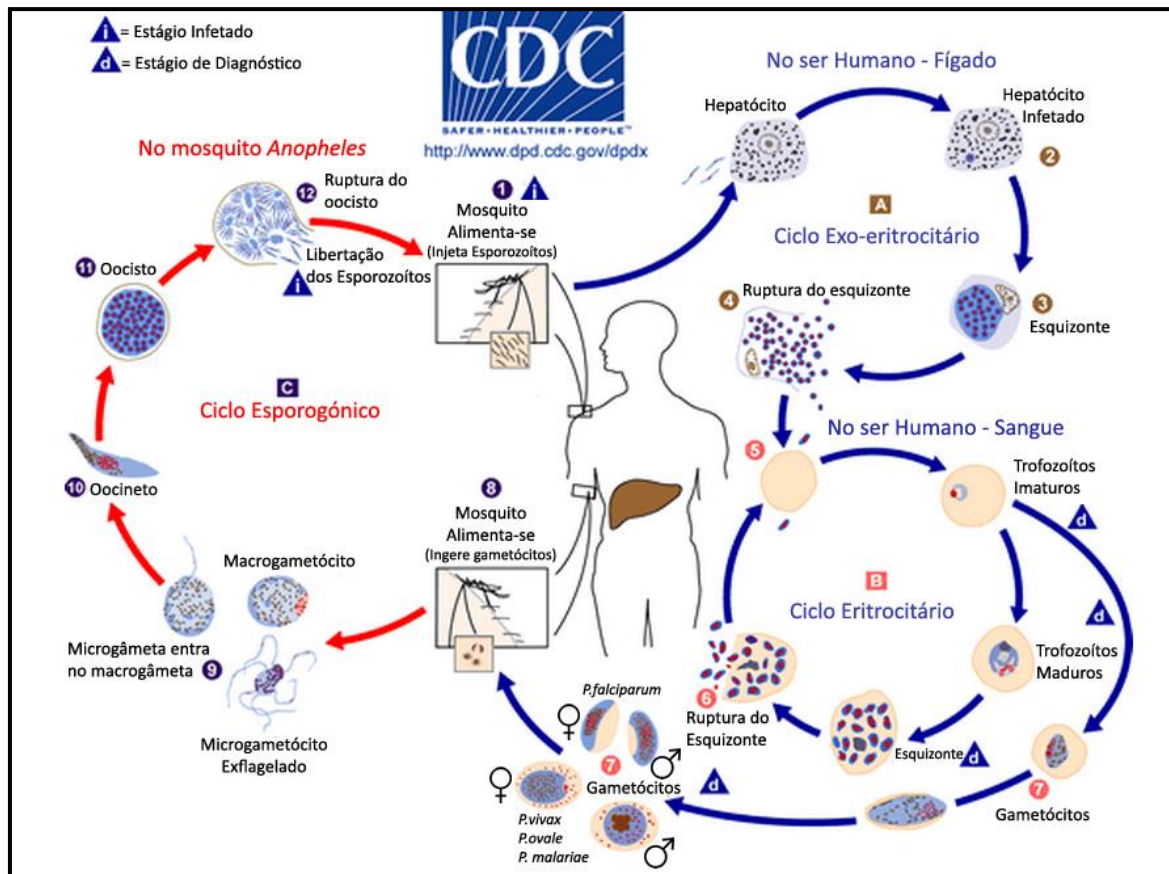


Figura I-1: Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, no vetor e no hospedeiro. (Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention, CDC³).

1.1.2. Controlo da doença

O controlo da malária tem-se baseado em métodos convencionais, como a prevenção da doença e o recurso a diversos fármacos antimaláricos. Porém, as falhas verificadas nos programas de controlo aplicados, entre os quais se destacam as tentativas de erradicação dos vetores do parasita, de desenvolvimento de uma vacina eficaz e de desenvolvimento de novos fármacos, não permitiram o controlo global da

malária⁵. Um fator limitativo importante é o constante aumento dos casos de resistências aos fármacos tradicionais², aumentando a pressão para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos mais eficazes, seguros e baratos.

1.1.3. Tratamento

O tratamento atual para a malária é baseado em quimioterapia. O arsenal terapêutico apresenta vários grupos de fármacos, contudo muitos apresentam várias limitações e fraca eficácia em áreas endêmicas, devido essencialmente à crescente seleção de resistência^{6,7}. Deste modo, o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença é crucial e urgente e, para que tal suceda, existem duas abordagens importantes pelas quais se pode enveredar: i) desenvolvimento de compostos análogos aos fármacos antimaláricos já existentes; ii) identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de fármacos que tenham uma maior afinidade para estes alvos, por forma a produzir uma resposta terapêutica eficaz^{5,8}. Seguidamente apresenta-se uma breve resenha do arsenal terapêutico para o combate desta patologia, englobando as primeiras moléculas que se desenvolveram e também novas moléculas em desenvolvimento que poderão proporcionar respostas terapêuticas eficazes.

1.1.3.1. Antimaláricos de base quinolínica

Os antimaláricos de base quinolínica são largamente utilizados no tratamento e quimioprofilaxia em casos de malária não complicada⁹. Foram descobertos a partir do quinino (figura I-2), um produto natural extraído da casca de árvores do género *Cinchona*. O quinino suscitou o desenvolvimento de novas quinolinas sintéticas, estruturalmente mais simples, dando origem a vários antimaláricos eficazes, como a cloroquina, a primaquina, a mepacrina e a mefloquina, representados na figura I-2¹⁰. A cloroquina constituiu a base da quimioterapia da malária durante as últimas cinco décadas do século passado. Apresenta várias vantagens, incluindo uma baixa toxicidade no hospedeiro, fácil utilização, baixo custo e uma síntese acessível e eficaz. No entanto, devido à crescente seleção de estirpes resistentes a esta classe de

fármacos, a utilização de cloroquina e de outros antimaláricos quinolínicos tem diminuído progressivamente¹¹.

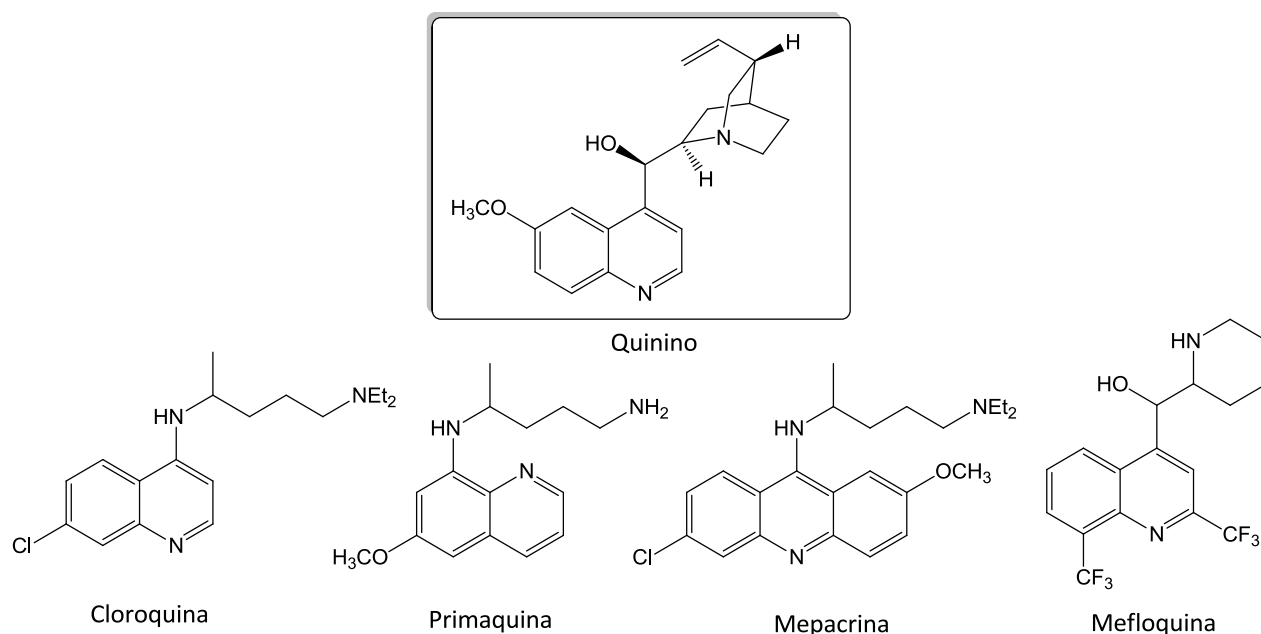


Figura I-2: Representação da estrutura do quinino e de alguns outros fármacos de base quinolínica utilizados para quimioterapia da malária (*Adaptado de* ¹⁰).

1.1.3.2. Antagonistas de folatos

Os antagonistas de folatos são fármacos que inibem a síntese de pirimidinas, compostos cruciais na síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita. Existem dois grupos de antifolatos, que podem ser administrados em combinação para uma maior eficácia da terapêutica e como forma de retardar a seleção de resistências: i) os que inibem a enzima dihidrofolato redutase, de que são exemplos alguns compostos da família das diaminopiridinas e biguanidinas, como a pirimetamina, o proguanil e o cloroproguanil; e ii) os que inibem a enzima dihidropteroato sintase, de que são exemplo algumas sulfonamidas e sulfonas (por exemplo: sulfadoxina). A utilização destes fármacos é geralmente restrita ao meio hospitalar (Figura I-3)^{9,12}.

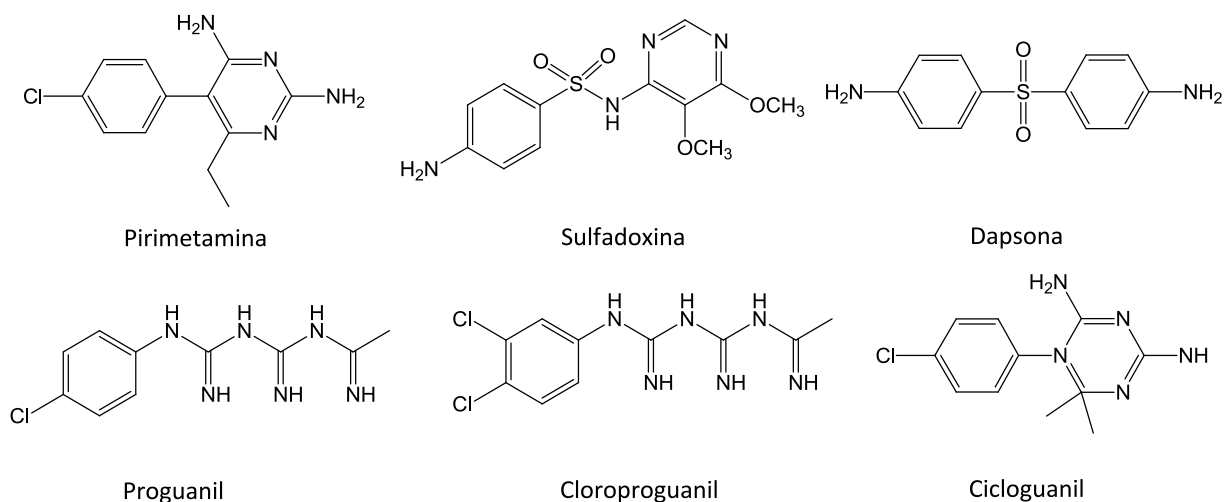


Figura I-3: Representação da estrutura de alguns antagonistas de folatos usados na quimioterapia da malária (*Adaptado de* ⁹).

1.1.3.3. Antibióticos

Alguns compostos com propriedades antibacterianas, usados como antibióticos, também desempenham um papel importante no tratamento da malária. A clindamicina, o cloranfenicol, a tetraciclina e seus análogos, como a doxiciclina (Figura I-4) são úteis na profilaxia e na terapêutica adjuvante da malária por *P. falciparum*^{9,12}. Estes antibióticos atuam por inibição da síntese proteica do parasita¹³.

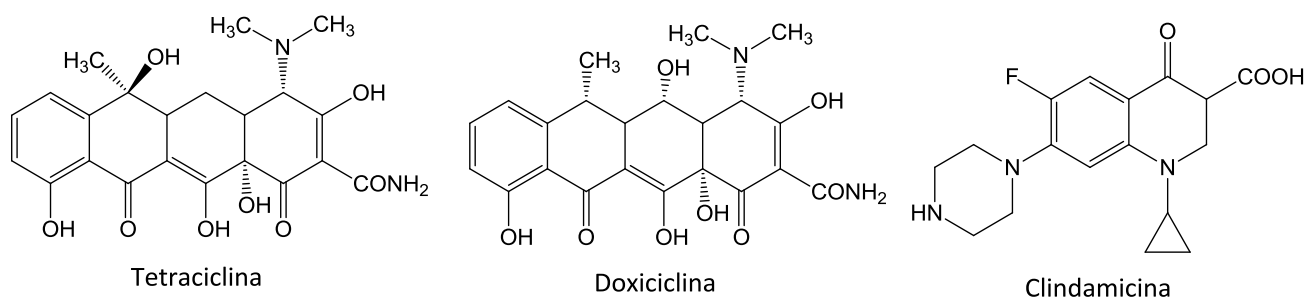


Figura I-4: Representação da estrutura de alguns antibióticos usados na terapêutica da malária (*Adaptado de* ⁹).

1.1.3.4. Endoperóxidos

A ampla disseminação da resistência aos fármacos antimaláricos convencionais por *P. falciparum* exige uma procura constante de novos compostos com atividade antimalárica e que, de preferência, atuem em alvos terapêuticos diferentes dos que são afetados pelos fármacos convencionais. A partir dos anos 80 do século passado, a procura de novos antimaláricos seguros e eficazes tornou-se um dos principais objetivos para o controlo da doença e redução da elevada taxa de mortalidade. Neste âmbito, os endoperóxidos, nomeadamente a artemisinina e alguns dos seus derivados semissintéticos e algumas quinolonas, das quais se destaca a combinação de atovaquona com cloridrato de proguanilo^{11,12}, designada por Malarone, revelaram-se fundamentais no controlo da doença^{11,14,15}.

Os endoperóxidos são uma classe muito promissora de compostos antimaláricos que, administrados em estratégias terapêuticas de combinação, se julga poderem enfrentar o desafio duplo da malária, isto é, a inibição da seleção de resistências e controlo de estirpes resistentes e a reversão da tendência para a rápida progressão da doença. Podemos considerar duas gerações de endoperóxidos: i) a artemisinina e seus análogos semissintéticos e ii) os endoperóxidos sintéticos, que correspondem a todos os compostos sintéticos com função peroxídica e que revelam atividade antiplasmódica¹⁶.

1.1.3.4.1. Artemisinina e análogos

Desde a década de 90 do século passado, a artemisinina e seus derivados semissintéticos foram considerados como uma classe inovadora de antimaláricos no tratamento de casos severos de malária^{9,11}. A artemisinina, (Figura I-5) extraída das folhas da planta *Artemisia annua*¹⁰, é uma lactona sesquiterpénica que contém como farmacóforo uma ponte peroxídica (1,2,4-trioxano), essencial para a sua atividade farmacológica^{15,17}. É um composto termoestável¹⁷ mas que apresenta uma baixa solubilidade tanto em água como em óleo, o que suscitou a procura de novos derivados semissintéticos^{10,17}. A redução da lactona na artemisinina conduziu à dihidroartemisinina que, posteriormente, serviu de composto de partida para a

preparação de éteres da dihidroartemisinina, alguns dos quais são amplamente usados na terapêutica da malária. Alguns apresentam caráter lipossolúvel, como o arteméter e o arteéter, outros apresentam caráter hidrossolúvel, como o artesunato de sódio¹⁸. O arteméter e o artesunato de sódio são os compostos mais utilizados na terapêutica de malária provocada por estirpes de *P. falciparum* resistentes à cloroquina e a antimetabolitos¹⁹. As diferentes estruturas químicas dos fármacos de base peroxídica referenciados, bem como a indicação do farmacóforo deste grupo de moléculas, encontram-se representados na figura I-5.

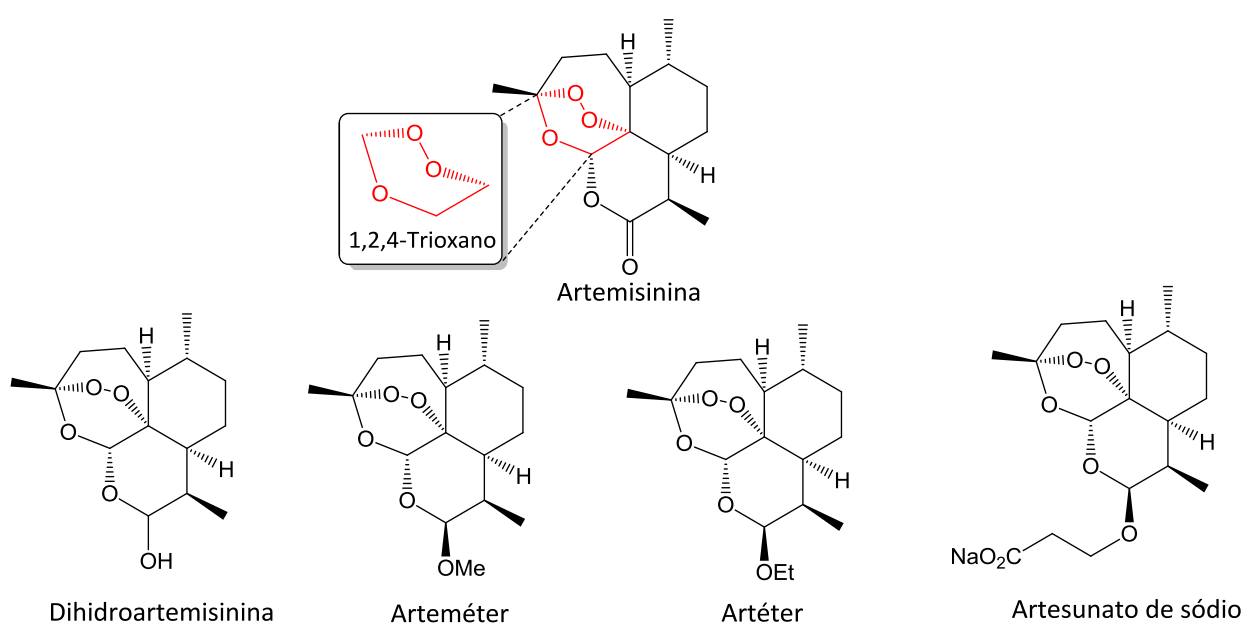


Figura I-5: Representação da estrutura da artemisinina e de alguns dos seus derivados seus semissintéticos usados na terapêutica da malária. (Adaptado de^{10,20}).

- Mecanismo de ação

Desde a descoberta do enorme potencial quimioterapêutico da artemisinina que os mecanismos de bioativação e ação desta classe de fármacos têm sido alvo de intensos estudos. É geralmente aceite que o grupo endoperóxido é o farmacóforo (confere a estes compostos a sua atividade antimalárica), pois foi demonstrado que os compostos em que a ligação peróxido foi reduzida a uma ligação éter não apresentavam atividade^{20,21}.

Existem várias propostas para os possíveis mecanismos de ação da artemisinina e seus derivados: i) bioativação prévia (clivagem redutiva) do peróxido por Fe^{2+} ou heme^{20,21} com formação de radicais centrados em átomos de oxigênio que rearranjam formando radicais centrados em átomos de carbono. Estes radicais podem alquilar o grupo heme e interferir com a ação de proteínas específicas do parasita, atuando como agentes alquilantes; (ii) formação de carbocatiões após clivagem redutiva induzida pelo ácido de Lewis Fe^{2+} ou heme²². Os carbocatiões alquilam biomoléculas por reação com grupos nucleofílicos. iii) a artemisinina pode ainda atuar por inibição da proteína PfATP6²³. Estes processos serão abordados em seguida, de forma mais detalhada. É aceite que esta classe de fármacos pode atuar em vários alvos em simultâneo.

i) Formação de radicais centrados em átomos de oxigênio e carbono

Sabe-se que, na fase eritrocitária, o *Plasmodium*, sob a forma de trofozoíto, recorre às enzimas proteolíticas para degradar a hemoglobina do hospedeiro no seu vacúolo alimentar, disponibilizando deste modo os aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento. No processo de digestão da hemoglobina liberta-se o grupo heme, que é tóxico para o parasita. Como o *P. falciparum* não possui uma enzima específica para degradação do grupo heme²⁴, de forma a evitar a sua toxicidade, o parasita desenvolveu um mecanismo não enzimático de destoxificação do heme que consiste na formação de um polímero não tóxico e insolúvel, denominado hemozoína, conhecido vulgarmente por pigmento malárico^{20,24,25}.

Uma das propostas para o mecanismo de bioativação e ação da artemisinina defende que a molécula é ativada no vacúolo alimentar pelo Fe^{2+} , produzindo espécies radiculares que reagem depois com o grupo heme, impedindo, desde modo, a sua destoxificação²⁰.

Estudos de relação estrutura-atividade, associados a outros estudos, nomeadamente os que envolveram a utilização de sondas fluorescentes e o isolamento e caracterização de produtos resultantes da reação dos peróxidos (ou seus subprodutos) com biomoléculas e heme, apontaram para a relevância da ligação

peróxido na ação farmacológica da artemisinina e seus análogos^{20,21}. É defendido que esta classe é bioativada por clivagem redutiva da ponte peróxido, mediada por Fe^{2+} ou heme.

A ligação do Fe^{2+} presente no grupo heme ou do Fe^{2+} livre não hémico, com o oxigênio 1 da ligação peróxídica da artemisinina (Figura I-6, Via 1) origina uma espécie com um radical centrado no oxigênio, que sofre isomerização, originando um radical centrado num carbono primário, através de uma cisão da ligação C-C adjacente ao radical oxigênio. Alternativamente, a ligação com o oxigênio 2 (Figura I-6, Via 2) produz igualmente uma espécie com um radical centrado em oxigênio, que através de uma migração 1,5 de hidrogênio produz um isômero com um radical centrado em um carbono secundário. Uma vez formados, estes radicais poderiam reagir com alvos intracelulares das células parasitárias, como proteínas e/ou lípidos, resultando na morte do parasita^{20,21,26-30}.

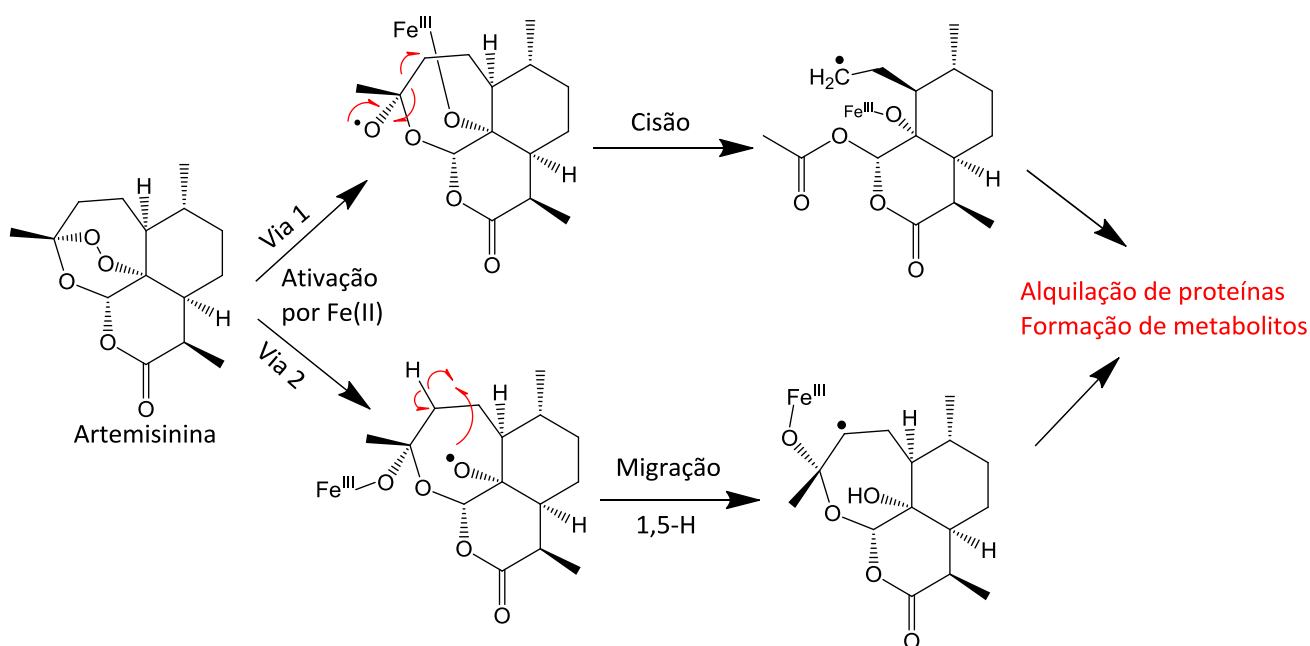


Figura I-6: Esquema representativo dos mecanismos de bioativação e ação de artemisinina e derivados que envolve a formação de radicais primários e secundários centrados em carbono, após clivagem redutiva mediada por Fe^{2+} (Adaptado de ^{20,21,26}).

ii) Formação de carbocatiões

Haynes e colaboradores propuseram outro mecanismo de ação da artemisinina, em que o Fe^{2+} atua como um ácido de Lewis, facilitando a ativação iônica, formando carbocatiões e não radicais da artemisinina, com a consequente abertura do anel. Ocorre assim uma quebra heterolítica, que posteriormente origina espécies radicalares reativas de oxigênio, capazes de oxidar determinados resíduos alvo de aminoácidos e lípidos^{22,28}.

iii) Inibição da proteína PfATP6

Têm surgido ao longo dos últimos anos outras propostas, alternativas e/ou complementares aos mecanismos que envolvem clivagem da ligação peróxido com formação de espécies reativas (radicalares) centradas em oxigênio (ROS) e/ou de espécies alquilantes (radicais ou catiões) centrados em carbono. A mais recente destas propostas, e que tem sido alvo de intensos estudos experimentais, é a possibilidade de a artemisinina poder também exercer a sua atividade antimalárica através da inibição da proteína PfATP6, uma enzima ATPase envolvida no transporte de Ca^{2+} ao nível do retículo sarcoplasmático (SERCA), no plasmódio. O papel do SERCA consiste em reduzir as concentrações de cálcio livre no citosol através do transporte ativo de Ca^{2+} . Contudo, inúmeras questões acerca deste possível mecanismo continuam por esclarecer, nomeadamente as consequências desta ação ao nível celular^{20,27,31,32}.

- Problemas associados à artemisinina e derivados

Recentemente foram identificadas evidências de falência terapêutica dos derivados da artemisinina na fronteira entre a Tailândia e o Camboja. A fronteira entre os dois países mencionados foi também a zona do mundo onde se detetou o aparecimento de multirresistência de *P. falciparum* à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina e mefloquina^{6,7}.

A descoberta recente de estirpes de *P. falciparum* resistentes à artemisinina e seus derivados semissintéticos veio dar força a outros argumentos em favor da necessidade de busca de outros endoperóxidos sintéticos¹¹. As artemisininas são de

origem natural e de acesso limitado. Outra limitação importante da artemisinina e seus derivados semissintéticos é o reduzido tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)¹⁰ (o tempo necessário para que as concentrações plasmáticas ou a quantidade de fármaco no corpo sejam reduzidas em 50%)¹³, tornando indispensável um regime terapêutico regular e periódico, o que pode levar a uma inadequada adesão terapêutica e a recrudescência da parasitemia¹¹. Neste âmbito, com o objetivo de contornar os problemas associados à artemisinina e aos seus derivados semissintéticos, procedeu-se à descoberta e desenvolvimento de novos derivados totalmente sintéticos. Estrategicamente, os análogos substitutos das artemisininas devem incluir pelo menos uma ligação endoperoxídica, que se assume ser fundamental para a atividade antimalárica, devem ser fáceis de preparar a partir de reagentes comercialmente disponíveis e devem ter baixos pesos moleculares. As estruturas modelo devem permitir variabilidade estrutural, de modo a possibilitar a identificação de compostos líder e a otimização das propriedades farmacológicas. Atualmente, os endoperóxidos sintéticos com propriedades antiplasmódicas reconhecidas distribuem-se por quatro classes que diferem na estrutura do farmacóforo peroxídico: 1,2-dioxanos (**1**), 1,2,4-trioxanos (**2**), 1,2,4-trioxolanos (**3**) e 1,2,4,5-tetraoxanos (**4**). A figura I-7 apresenta representações estruturais de moléculas com atividade antiplasmódica demonstrada, pertencentes a estas classes. Espera-se que a variabilidade estrutural existente no conjunto destas classes de compostos seja suficiente para possibilitar a descoberta de fármacos com capacidade para contornar os problemas de resistência e melhorar parâmetros farmacocinéticos. A literatura revela que estes derivados apresentam um mecanismo de bioativação e ação com semelhanças relativamente ao proposto para a artemisinina: são ativados pelo Fe^{2+} livre, ou por heme, e exercem o seu modo de ação através da formação de espécies intermediárias reativas (radicalares ou catiónicas)^{15,18,19,31,33,34}.

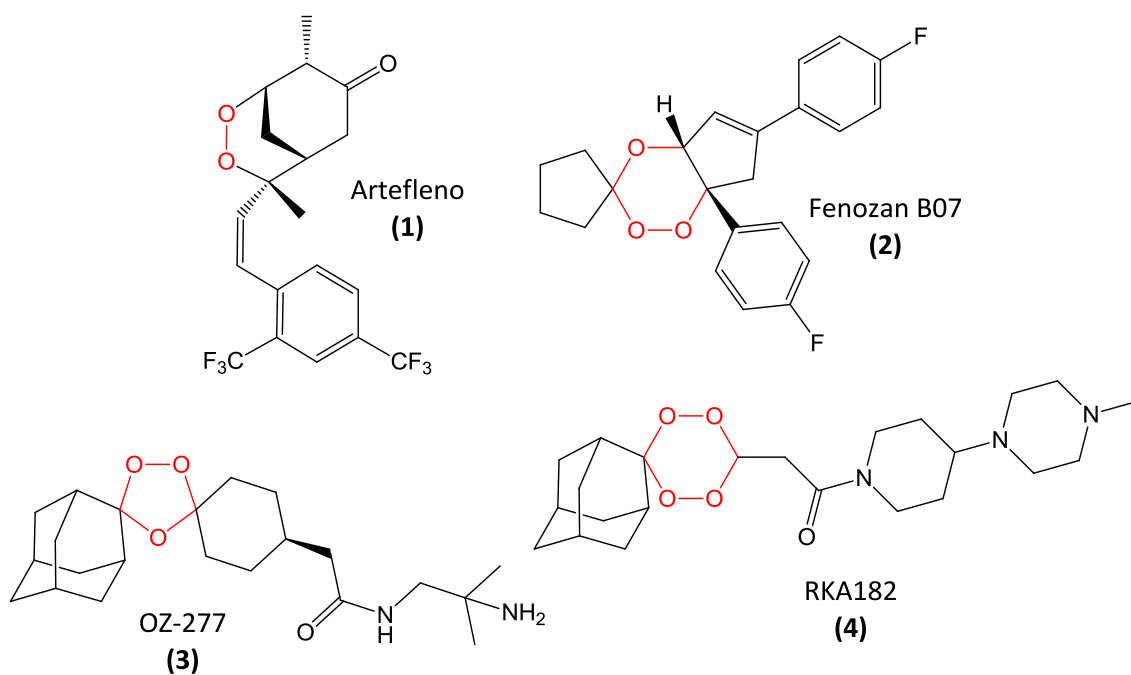


Figura I-7: Representação estrutural de alguns endoperoxídeos sintéticos com atividade antimalárica (*Adaptado de* ^{19,31,34}).

II. ENDOPERÓXIDOS SINTÉTICOS

2.1. Introdução aos 1,2,4,-trioxolanos

Durante as últimas décadas verificou-se um crescimento na procura de endoperóxidos cíclicos sintéticos, devido ao seu potencial para substituir os fármacos de tipo endoperóxido atualmente utilizados no tratamento da malária (artemisinina e derivados). Os ozonídeos, nomeadamente os 1,2,4-trioxolanos (Figura II-1), inicialmente propostos por Vennerstrom, foram intensamente explorados³⁵.

Os 1,2,4-trioxolanos são compostos heterocíclicos sintéticos de 5 átomos que possuem uma ponte endoperóxido (Figura II-1). Alguns destes compostos mostraram ser mais ativos contra *Plasmodium sp.* que o artesunato e arteméter, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de apresentarem melhores características farmacocinéticas, destacando-se o maior tempo de semivida e a maior biodisponibilidade após administração oral^{36,37}. Há evidências de atividade de trioxolanos sintéticos em modelos de *P. falciparum* multirresistentes (incluindo resistência à artemisinina)³⁵.

A estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos está representada na figura II-1, onde os grupos substituintes R, R₁-R₃ representam combinações de grupos funcionais, sistemas de anel e sistemas acíclicos que proporcionam impedimento estéreo no anel de trioxolano, oferecendo maior estabilidade química e metabólica³⁸.

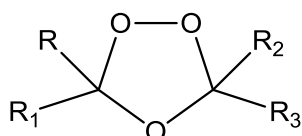


Figura II-1: Estrutura geral de 1,2,4-trioxolanos (Adaptado de ³⁸).

Os ozonídeos podem ser obtidos por ozonólise de alcenos que rearranjam para os 1,2,4-trioxolanos. A estabilidade dos trioxolanos tetra-substituídos pode ser devida, em parte, à ausência de hidrogénio α , o que dificulta as reações de fragmentação heterolítica peróxídica, estimuladas pela formação de produtos carbonílicos mais estáveis³⁹.

Os 1,2,4-trioxolanos, mesmo os tetra-substituídos, são muito reativos e instáveis, de modo que esta classe de compostos dificilmente constituiria uma

primeira escolha para fornecer um potencial candidato para o tratamento da malária. Porém, estudos de relação estrutura atividade realizados numa gama de trioxolanos com ampla variabilidade estrutural, sintetizados por *Vennerstrom et al.*⁴⁰, permitiram extrair informação sobre os requisitos estruturais mais favoráveis para uma boa atividade farmacológica, destacando-se duas observações relevantes:

- i) o anel 1,2,4-trioxolano é estabilizado por um anel de adamantilo e por outro substituinte carbocíclico ou heterocíclico volumoso. O adamantilo é essencial para garantir estabilidade química e metabólica, indispensável para que o composto exerça a sua ação farmacológica. O substituinte carbocíclico ou heterocíclico volumoso promove um aumento do impedimento estéreo em torno do endoperóxido, diminuindo a sua reatividade e retardando a sua decomposição no organismo, tal como representado na figura II-2. Importa também referir a possibilidade de introdução de substituintes neste ciclo, o que garante diversidade estrutural na construção de bibliotecas para estudos de relação estrutura atividade (do inglês: Structure Activity Relationship, SAR) e para os ajustes farmacológicos subsequentes.
- ii) a associação da estrutura do trioxolano com dois grupos adamantilo ou com dois grupos ciclohexilo, também representada na figura II-2, revelou uma atividade antiparasitária residual, ao contrário da associação do trioxolano com um anel adamantilo e um anel ciclohexilo, que apresentou atividade antimalárica. Estas observações permitiram concluir que através de um ajuste na associação de grupos substituintes é possível controlar a reatividade e promover uma atividade seletiva do endoperóxido no alvo terapêutico pretendido^{35,40,41}.

Foi demonstrado que a atividade antiparasítica dos trioxolanos requer bioativação na presença de Fe(II)⁴². Deste modo é possível compreender que se de um lado da estrutura do trioxolano estiver um grupo adamantilo, que dificulta o acesso ao átomo de oxigénio por parte do ferro (II), mas no outro extremo estiver um grupo ciclohexilo que lhe facilita o acesso, o composto reterá atividade antimalárica, pois é

permitida a sua bioativação e, conseqüentemente, a sua ação farmacológica³⁵. A utilização desta combinação de substituintes mostrou ser bastante útil ao permitir um equilíbrio entre um grupo endoperóxido demasiado exposto, sendo muito reativo nessa forma, e um grupo endoperóxido demasiado impedido estericamente, logo praticamente inativo^{35,39-41,43}.

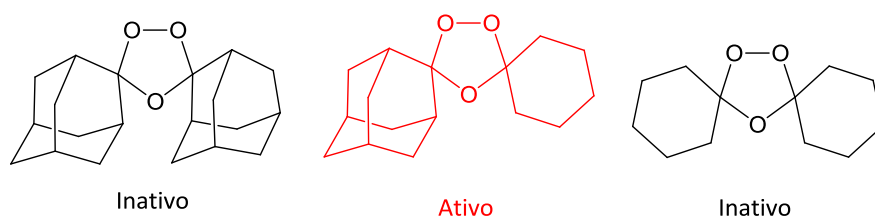


Figura II-2: Representação estrutural de compostos modelo para estudo da estabilidade e atividade dos 1,2,4-trioxolanos (*Adaptado de*³⁵).

2.1.1. A evolução dos trioxolanos como antimaláricos

Os principais problemas encontrados nos possíveis candidatos com grupos funcionais endoperóxido são a solubilidade e a biodisponibilidade. Os primeiros protótipos sintéticos baseados no heterociclo 1,2,4-trioxolano apresentaram problemas devidos à presença de um anel adamantilo nas suas estruturas, que lhes confere características lipofílicas, tornando-os suscetíveis ao metabolismo. Para que um fármaco possua boas características de absorção e biodisponibilidade após administração oral é necessário conjugar uma boa solubilidade em água, favorecida em estruturas com polaridade ou com carga iônica, com uma boa permeabilidade da membrana relativamente ao composto, aumentando esta para compostos menos polares⁴¹. *Vennerstrom et al.* (2002) descreveu a síntese e as propriedades antimaláricas de dezenas de 1,2,4-trioxolanos estruturalmente diferentes, com um amplo espectro de polaridade. Os resultados dos testes de bioatividade permitiram concluir que os 1,2,4-trioxolanos lipofílicos apresentavam melhor atividade antimalárica que os seus homólogos mais polares, quando administrados por via oral⁴⁰. Outros estudos efetuados com bibliotecas extensas de novos 1,2,4-trioxolanos sintetizados permitiram obter parâmetros físico-químicos e reunir informação sobre os

padrões de metabolização e toxicidade desta classe de compostos. Toda a informação reunida permitiu uma otimização estrutural que conduziu à seleção do 1,2,4-trioxolano sintético OZ-277 ou arterolano (Figura II-3) para desenvolvimento. Este composto foi o primeiro endoperóxido antimalárico sintético introduzido em ensaios clínicos, iniciados em 2004³⁵.

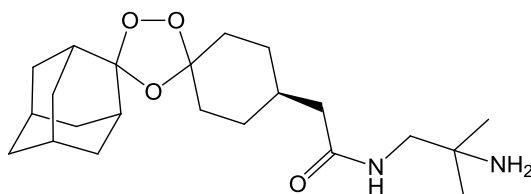


Figura II-3: Representação da estrutura de OZ-277 ou arterolano (*Adaptado de* ³⁵).

Através dos ensaios clínicos de OZ-277 foi possível identificar algumas limitações farmacocinéticas associados aos ozonídeos, anteriormente desconhecidas. Verificou-se que o composto OZ-277 tende a degradar-se rapidamente no sangue, *in vivo*, o que leva à necessidade da administração de uma dose superior para se conseguir obter o efeito antimalárico desejado, o que aumenta o custo da terapêutica e o risco de toxicidade⁴⁴.

Assim, foi necessário, novamente, proceder a otimização estrutural, desta vez com o objetivo de melhorar a estabilidade metabólica. Obtiveram-se 1,2,4-trioxolanos de 2ª geração, que apresentam uma maior estabilidade no sangue sem comprometer a atividade biológica, maior biodisponibilidade oral e boa atividade antimalárica. Os derivados da artemisinina e a primeira geração de 1,2,4-trioxolanos apresentavam deficiências nestas propriedades. De entre os compostos de segunda geração selecionados destaca-se o 1,2,4-trioxolano OZ439 (Figura II-4). Este novo candidato tem a vantagem de apresentar um tempo de semivida vinte vezes superior ao derivado OZ-277, e encontra-se atualmente em estudos clínicos de Fase IIa^{44,45}.

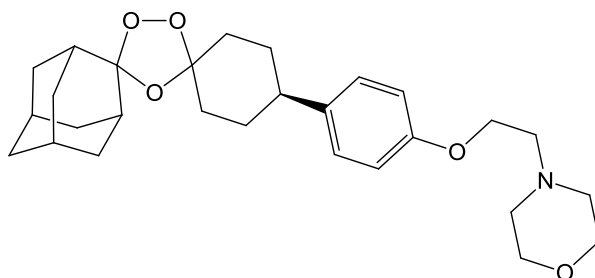


Figura II-4: Representação da estrutura do OZ439 (*Adaptado de* ⁴⁴).

2.2. Os 1,2,4,5-tetraoxanos

Como referido anteriormente, foram observados perfis de atividade antimalárica excelentes em compostos com a função 1,2,4-trioxolano. Porém, a maioria destes compostos tem revelado alguma instabilidade no plasma em doentes, durante a fase II de ensaios clínicos^{46,47}. Tornou-se assim necessário procurar alternativas com maior estabilidade química e metabólica e preservando a atividade antiplasmódica. O uso de 1,2,4,5-tetraoxanos permitiu contornar o problema de estabilidade apresentado pelos 1,2,4-trioxolanos.

Os 1,2,4,5-tetraoxanos (Figura II-5) são compostos heterocíclicos sintéticos que possuem duas pontes endoperóxido. Estes compostos são muito relevantes em síntese, destacando-se a sua utilização na produção industrial de hidrocarbonetos macrocíclicos e de lactonas³⁸.

Os tetraoxanos suscitaram especial interesse nas últimas duas décadas, devido à descoberta do potencial desta classe na preparação de compostos de base peróxídica com elevada atividade antimalárica³⁶. *Vennerstrom et al.* mostraram que alguns tetraoxanos possuem uma atividade muito semelhante à exibida pela artemisinina e seus derivados³⁸.

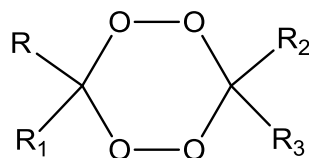


Figura II-5: Representação da estrutura geral de 1,2,4,5-tetraoxanos (*Adaptado de* ³⁸).

2.2.1. Comparação das propriedades de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxolanos

Os estudos de estabilidade e reatividade de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxolanos permitiram obter informação sobre as principais diferenças entre as propriedades destes compostos. No *design* de 1,2,4,5-tetraoxanos para eventual utilização como antimaláricos teve-se como base a informação disponível obtida no estudo dos compostos 1,2,4-trioxolanos. Integrou-se o grupo adamantilo para estabilização adicional da ligação endoperóxídica, garantindo a estabilidade das duas

ligações endoperóxido e a atividade seletiva do composto quando exposto à ação do ferro intracelular, como anteriormente verificado nos ozonídeos^{48,49}.

Sabe-se que quando a estrutura trioxolano se encontra associada a dois grupos adamantilo ou ciclohexilo (Figura II-2), a atividade antiparasitária observada é muito reduzida, enquanto um trioxolano flanqueado por um anel adamantilo e um anel ciclohexilo apresenta uma atividade antimalárica significativa. Foi observado um padrão de atividade antimalárica semelhante nos análogos tetraoxanos, apresentando estes contudo uma maior estabilidade química e, de acordo com os resultados de estudos *in vivo*, também metabólica (Figura II-6)^{48,49}. Desta forma, os tetraoxanos representam uma melhoria na otimização de endoperóxidos antimaláricos.

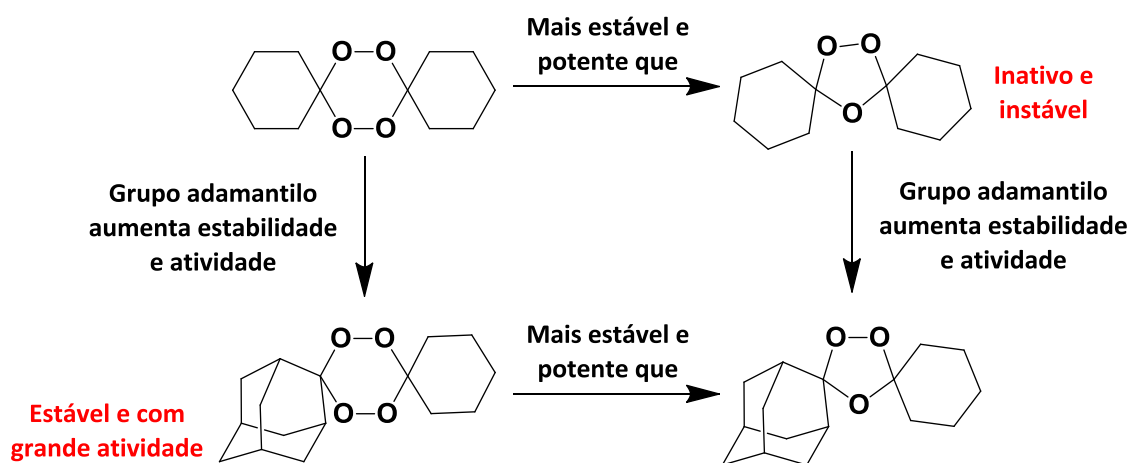


Figura II-6: Esquema comparativo da estabilidade e reatividade de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4- trioxolanos (*Adaptado de* ⁴⁸).

Relativamente aos requisitos estruturais que conferem atividade antiparasitária, os tetraoxanos apresentam semelhanças com aos trioxolanos: têm de ser assimetricamente substituídos e flanqueados pelo grupo adamantilo e ciclohexilo^{46,48,50}.

Foram publicados vários trabalhos acerca desta classe de compostos relativamente ao potencial para utilização em quimioterapia, tendo sido sintetizado um número significativo de novos tetraoxanos, nos quais foram avaliados quanto à sua atividade antimalárica. Alguns destes compostos exibiram atividades antimaláricas *in vivo* muito promissoras⁵⁰, tendo sido selecionado um composto com o núcleo

tetraoxano para ensaios clínicos. Em 2008, O'Neill e seus colaboradores selecionaram o composto RKA182 a partir de uma biblioteca de mais de 150 tetraoxanos sintetizados (Figura II-7). Este composto é considerado um excelente candidato antimalárico⁴⁶.

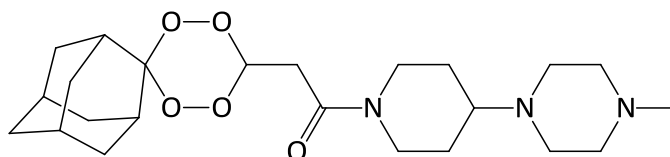


Figura II-7: Representação da estrutura do RKA182 (*Adaptado de* ⁴⁶).

2.2.2. Aplicação dos tetraoxanos na terapia de outras patologias

O 1,2,4,5-tetraoxanos, para além da promissora atividade antimalárica, têm sido mencionados na literatura científica por exibirem uma atividade anti-proliferativa em várias linhas de células cancerígenas^{51,52}. Do mesmo modo, estes compostos também têm sido referidos com destaque em relação à sua capacidade antiparasitária, tornando-os promissores no combate a doenças tropicais negligenciadas^{53,54}.

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) constituem uma classe de doenças infecciosas distintas, que podem ser causadas por parasitas, vírus e bactérias, apresentando características em comum: são incapacitantes, frequentemente crónicas e tradicionalmente ignoradas, pois desenvolvem-se principalmente entre as populações mais pobres. Estas patologias afetam profundamente a qualidade de vida e geram impactos socioeconómicos negativos para a população desses países^{55,56}.

De acordo com o segundo Relatório da OMS sobre Doenças Tropicais Negligenciadas⁵⁷, as DTNs afetam a vida de um bilião de pessoas em todo mundo. O mesmo relatório testemunha que a pobreza e a exclusão social estão relacionadas com este tipo de doenças, que se apresentam, de maneira mais evidente, na realidade sanitária dos países periféricos. Muitas das DTNs são resultado da pobreza e contribuem significativamente para a promover, prejudicando a produtividade agrícola, o desenvolvimento cognitivo e a educação nesses países.

De entre as 17 doenças negligenciadas classificadas pela OMS estão a tuberculose, a dengue e a malária no grupo das menos descuidadas, enquanto no grupo das que recebem menos atenção encontram-se a doença do sono, a doença de chagas, a esquistossomose e a leishmaniose^{56,57}.

De forma a contornar o problema da falta de investimento na descoberta de novas moléculas ativas e com potencial farmacológico para o combate de DTNs, a comunidade científica tem usado uma estratégia de “reciclagem” ou “reutilização” de fármacos, isto é, uma molécula que constitui o ingrediente farmacologicamente ativo (API) de uma formulação que é atualmente indicada para o tratamento de uma doença parasitária, por exemplo a malária, é, posteriormente, escolhida para estudo do seu potencial terapêutico em outras DTNs⁵⁸.

A exploração de fármacos já aprovados para o tratamento de outras doenças é atrativa, pois grande parte da informação relativa ao perfil farmacocinético e toxicológico é conhecida, o que acelera todo o processo. Neste âmbito, os tetraoxanos podem constituir potenciais candidatos. Já foi demonstrado que alguns tetraoxanos possuem atividade antimalárica elevada, também são ativos contra outras doenças, como as provocadas por *Fasciola hepatica*⁵³ e por *Schistosoma mansoni*⁵⁴. Com base nesta evidência, é legítimo estudar o potencial farmacológico destas moléculas contra infeções provocadas por outros parasitas que partilham semelhanças a nível biológico e bioquímico⁵⁹. O desenvolvimento de peróxidos com melhores propriedades farmacocinéticas e que atuem igualmente de forma seletiva, permanece um tópico de investigação muito ativo.

O potencial farmacológico dos tetraoxanos impulsionou a otimização de estratégias de síntese deste quimiotipo, de forma a ampliar as bibliotecas para estudos de atividade farmacológica e possibilitar a identificação de novos candidatos a fármacos.

O trabalho descrito nesta dissertação teve por base os seguintes objetivos principais: i) elaborar uma revisão bibliográfica relativa aos fundamentos teóricos e metodologias da síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos e ii) desenvolver novas moléculas-alvo no sentido de avaliar a sua atividade em parasitas do género *Leishmania*, na perspetiva de avaliar o potencial deste quimiotipo no desenvolvimento de fármacos para o combate desta doença tropical negligenciada.

III. MÉTODOS DE SÍNTESE DOS TETRAOXANOS

O potencial farmacológico dos tetraoxanos impulsionou a otimização de estratégias de construção do heterociclo 1,2,4,5-tetraoxano, de forma a facilitar a preparação de novos derivados e ampliar as bibliotecas para estudos de atividade farmacológica, possibilitando a identificação de novos candidatos a fármacos para várias patologias. Nas últimas duas décadas, estes métodos de síntese têm sido desenvolvidos de uma forma muito ativa⁶⁰. Com o evoluir da tecnologia e do conhecimento, é natural que se procurem novos procedimentos em síntese orgânica com vista a um aumento do rendimento das reações, à redução do tempo destas e otimização de outros fatores igualmente importantes, como a utilização de estratégias “verdes” que possibilitem economia de átomos e redução de solventes orgânicos, condicionando os reagentes utilizados e os produtos obtidos. De referir que, nos nossos dias, as componentes ecológica e económica assumem uma importância cada vez maior na otimização de metodologias de síntese.

Neste capítulo serão apresentadas as principais metodologias para preparação de 1,2,4,5-tetraoxanos publicadas nas últimas décadas.

Os 1,2,4,5-tetraoxanos são considerados, na literatura científica, como uma das classes de endoperóxidos estruturalmente mais simples e podem ser sintetizados a partir de cetonas cíclicas amplamente disponíveis^{46,61,62}. Segundo os estudos realizados por Opsenica *et al.*⁶³, os tetraoxanos são compostos consideravelmente estáveis em condições básicas como ácidas e também na presença de agentes redutores, como por exemplo, NaBH₃CN, NaBH(OAc)₃, NaBH₄, LiAlH₄, entre outros, ampliando as possibilidades de modificação estrutural nestes compostos. Ao possibilitar a introdução de variabilidade estrutural torna-se mais fácil a identificação de compostos líder e a otimização das propriedades farmacológicas para a patologia pretendida.

Do conjunto de procedimentos experimentais descritos na literatura para a síntese de tetraoxanos, é possível concluir que o processo consiste essencialmente em dois passos: i) oxidação do grupo carbonílico por ação de peróxido de hidrogénio, H₂O₂, usando um catalisador específico e ii) posterior ciclização a partir de um dihidroperóxido intermediário^{46,64}.

3.1. Principal intermediário: 1,1-dihidroperóxido

Os 1,1-dihidroperóxidos são derivados instáveis de cetonas e aldeídos e são intermediários importantes na síntese de uma série de classes de peróxidos, incluindo os 1,2,4,5-tetraoxanos. A sua estrutura base encontra-se apresentada na figura III-1³⁸.

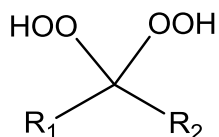


Figura III-1: Representação da estrutura geral dos 1,1,-dihidroperóxidos (*adaptado de*³⁸).

A importância dos 1,1-dihidroperóxidos (DHPs) como compostos intermédios na síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos é deveras marcante, pelo que a otimização da síntese destes intermediários determina a eficiência do processo de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos. Compreender a sua natureza química é fundamental para garantir sucesso no desenvolvimento de novas metodologias.

Os 1,1-dihidroperóxidos são compostos termicamente e quimicamente lábeis e tendem a decompor-se rapidamente à temperatura ambiente, formando produtos secundários, como representado na figura III-2. A instabilidade associada a este composto intermediário condiciona a escolha de metodologias de síntese dos tetraoxanos, pois os reagentes e condições de reação compatíveis são, por norma, limitados^{38,50}.

Assim, as limitações associadas à síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos são sobretudo devidas ao principal composto intermédio na sua síntese. Os 1,1-dihidroperóxidos podem reagir e/ou degradar de distintas formas, originando diversos produtos secundários, o que justifica os baixos rendimentos reportados na literatura nos métodos de síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos, como representado na figura III-2. A otimização de técnicas laboratoriais para permitir o isolamento e purificação dos tetraoxanos merece igualmente um grande destaque nestas metodologias.

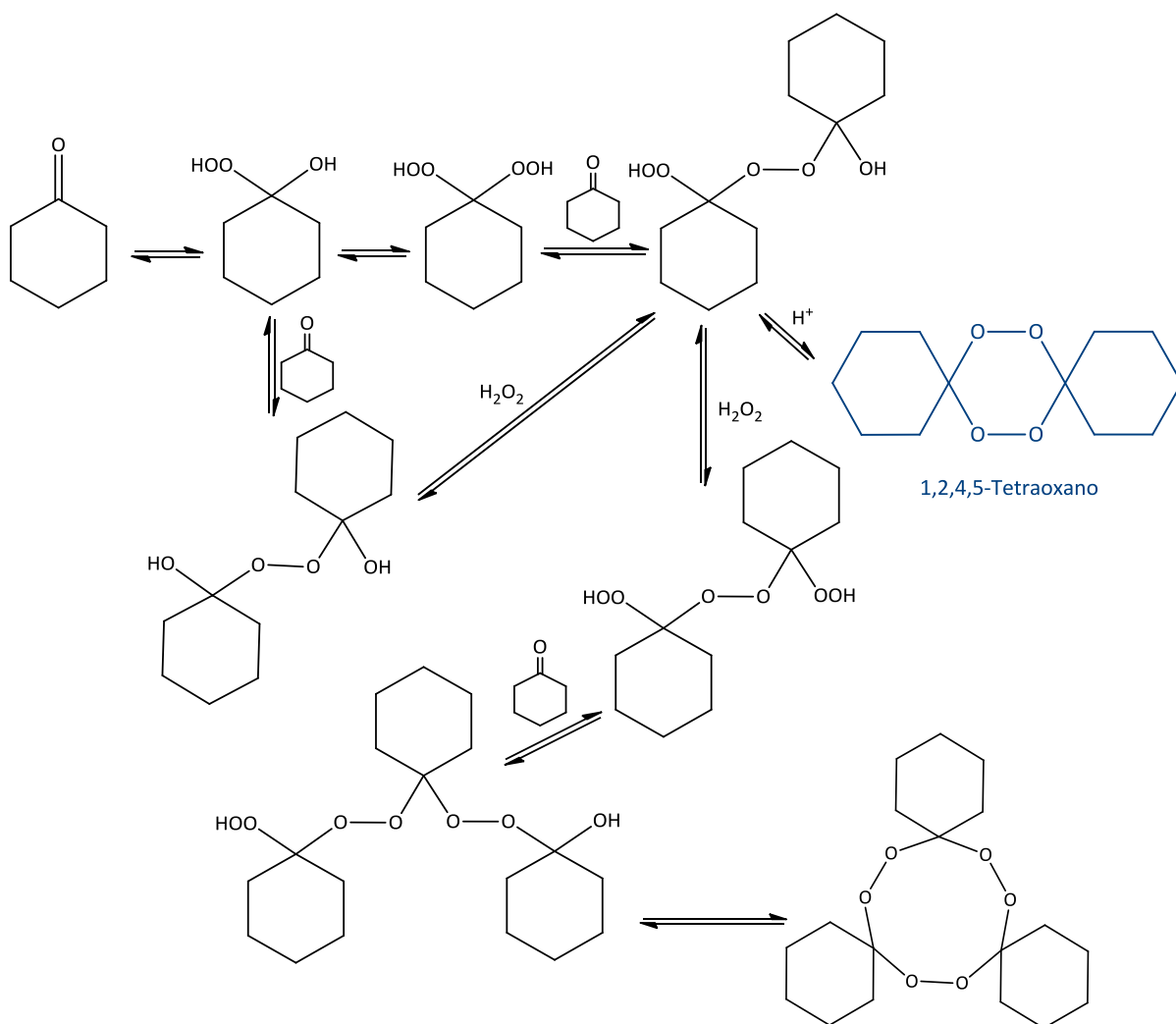


Figura III-2: Produtos secundários associados à decomposição do 1,1-dihidroperóxido. (adaptado de ³⁸).

A formação do núcleo tetraoxano, como representado na figura III-2, começa com a adição de acetona ou aldeído ao dihidroperóxido intermédio. O aduto resultante pode sofrer a ciclocondensação desejada, originando o respetivo tetraoxano ou, em alternativa, pode formar um grande número de subprodutos da reação, como os 1,2,4,5,7,8-hexaoxanos, compostos com 3 pontes endoperóxido⁶⁵ que se encontram representados na figura III-3.

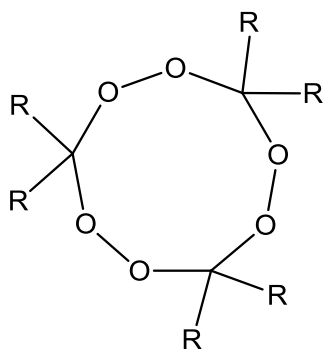


Figura III-3: Representação estrutural de um hexaoxano (*adaptado de* ⁶⁵).

Existem estudos⁶⁵ que comparam a reatividade dos tetraoxanos e dos hexaoxanos com Fe (II), com o principal objetivo de avaliar a suscetibilidade a este catião metálico que, como descrito nesta dissertação, é provavelmente o agente responsável pela ativação da molécula, conferindo a atividade antimalárica. Foi observado⁶⁵ que os tetraoxanos sofreram uma completa degradação em presença de sulfato de ferro (II) (FeSO₄), enquanto os hexaoxanos não apresentaram qualquer reatividade com o mesmo reagente, o que pode justificar a observação da inexistência de atividade antimalárica nestes compostos. O maior bloqueio estérico das pontes endoperóxido nos hexaoxanos, em comparação com os tetraoxanos, é outro aspeto que pode justificar esta falta de atividade antiparasitária⁶⁵.

Dependendo das condições de reação, o rendimento dos tetraoxanos varia consideravelmente e a formação de subprodutos como os hexaoxanos é um fator muito importante a avaliar. Estudos revelaram que a ocorrência da formação destes produtos depende das condições químicas durante o progresso da reação¹⁹. Os processos de purificação têm sido um desafio premente, sabendo-se que impurezas como os hidroperóxidos podem ser eliminadas usando dimetilsulfureto e iodeto de potássio³⁸. Os hexaoxanos também podem ser eliminados por processos de recristalização e, posteriormente, através de uma lavagem com metanol gelado. Aquecendo a mistura com ácido perclórico em ácido acético podem converter-se os hexaoxanos em tetraoxanos³⁸.

Devido à natureza instável dos dihidroperóxidos, a maioria dos métodos de síntese dos tetraoxanos tende a preferir a metodologia em “one-pot”, isto é, um reagente é submetido a sucessivas reações químicas, evitando o isolamento dos

intermediários, e tem como principal objetivo a melhoria da eficiência da reação, evitando a decomposição deste intermediário⁶⁵. O adequado controlo do tipo de substratos, solventes, catalisadores específicos e do pH permite garantir bons rendimentos de reação^{38,65}.

3.2. A evolução dos métodos de síntese de dihidroperóxidos e de 1,2,4,5-tetraoxanos

Vários métodos de síntese dos 1,1-dihidroperóxidos têm sido descritos na literatura nas últimas décadas, sendo as mais comuns:

- i) Reação direta de cetonas com uma concentração adequada de H_2O_2 , na presença ou na ausência de ácido fórmico, levando a moderados rendimentos. A reação de H_2O_2 com etéres enólicos, cetais, aldeídos ou cetonas na presença de ácidos fortes ou ácidos de Lewis é vastamente aplicada em síntese orgânica, porém apresenta alguns inconvenientes como a formação de subprodutos resultantes de isomerizações^{66,67};
- ii) Ozonólise de diversos compostos, como alcenos, na presença de H_2O_2 . Leva à preparação de 1,1-dihidroperóxidos em condições neutras. Porém, neste tipo de reação existe uma grande restrição de substratos, como compatibilidade para a reação de ozonólise⁶⁶.
- iii) Reação de cetais com H_2O_2 na presença de ácido túngstico e $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ⁶⁷⁻⁶⁹.

A necessidade da utilização de grandes concentrações de H_2O_2 , excesso de ácidos fortes e outros fatores contribuem com que a escolha de reagentes compatíveis e das condições de reação mais adequadas sejam aspetos cruciais para garantir um adequado valor de rendimento de reação. Este ajuste é relativamente complicado⁶⁶.

Inúmeros procedimentos para a síntese dos intermediários 1,1-dihidroperóxidos têm sido descritos na literatura científica e gradativamente surgem novas apostas na melhoria destes que poderão, no futuro, desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novos métodos de síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos.

A reação de ciclocondensação de cetonas e aldeídos com peróxido de hidrogénio sob catálise ácida é a via mais simples para a síntese de alguns tetraoxanos

simétricos, com rendimentos muito variados, devido à grande dependência da estrutura molecular dos compostos de partida⁷⁰. O progresso na síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos baseia-se em evitar situações deste género, apostando na procura de métodos que permitam a criação de uma metodologia de âmbito mais alargado, permitindo a construção de moléculas-alvo com bons rendimentos, sem grande dependência de certos reagentes iniciais⁶⁰.

Vários métodos de síntese têm sido descritos, e nesta dissertação serão abordados os mais relevantes, permitindo a escolha da metodologia mais adequada para a síntese destes compostos.

3.2.1. Trióxido de metilrénio (MTO)

Em 2003, Iskra *et al.*⁷¹ reportaram um novo método de síntese de tetraoxanos simétricos e assimétricos com características muito promissoras.

Este método de síntese consiste na combinação de H₂O₂ com trióxido de metilrénio (MTO) e álcool fluorado, geralmente o hexafluoroisopropanol (HFIP), através de uma metodologia “one-pot”, permitindo obter tetraoxanos assimétricos com rendimentos muito satisfatórios. O esquema que representa esta estratégia de síntese encontra-se na figura III-4. O isolamento dos DHPs intermédios não é necessário, devido à situação de “one-pot”, evitando desta forma a sua decomposição⁷¹.

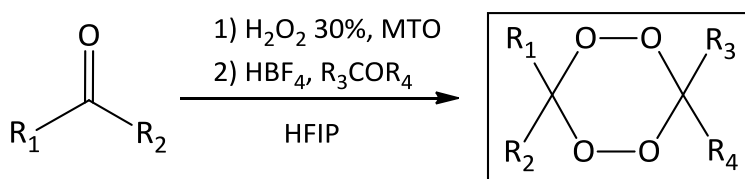


Figura III-4: Esquema representativo da estratégia de síntese usando MTO como catalisador (*Adaptado de* ^{71,72}).

O HFIP desempenha um papel importante na ativação do H₂O₂. Neimann *et al.*⁷³ sugeriram que as propriedades eletroatratoras associadas ao átomo de flúor,

através da interação com O-H do H₂O₂ através de uma ponte de hidrogénio, levam à formação de um intermediário de peróxido de hidrogénio ativo, como representado na figura III-5. A reatividade dos álcoois fluorados é aumentada com o aumento de átomos de flúor no álcool. O HFIP (CF₃CHOHCF₃), também designado por álcool 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropilo, é mais ativo que o 2,2,2-trifluoroetanol, TFE (CF₃CH₂OH)⁷³.

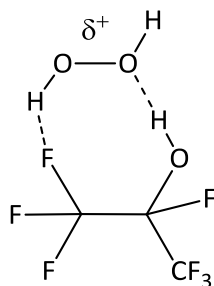


Figura III-5: Representação da interação de H₂O₂ com HFIP (*Adaptado de* ⁷³).

A utilização de álcool fluorado como solvente conduziu a outras vantagens como: i) a diminuição da concentração de H₂O₂ livre, desfavorecendo a formação de subprodutos; ii) a redução da quantidade de catalisador necessária para o sucesso da reação. Por outro lado, o passo da ciclização, formando o 1,2,4,5-tetraoxano desejado, é bastante seletiva, uma vez que a formação de subprodutos como os hexaoxanos é evitada, formando-se tetraoxanos como os únicos produtos de reação. Esta seletividade resulta, por um lado, de os álcoois fluorados funcionarem como catalisadores, além do MTO, que permitem a ativação do H₂O₂ através da formação de pontes de hidrogénio com este reagente, levando, conseqüentemente, à inibição da formação de hexaoxanos⁷¹.

Diversos substratos com diferentes grupos estruturais, como cetonas cíclicas e acíclicas e aldeídos, sujeitos às condições deste novo método, permitiram desenvolver novas moléculas com o núcleo tetraoxano com rendimentos satisfatórios⁷¹.

O desenvolvimento deste procedimento constituiu um grande passo para a criação de um método o mais universal possível, permitindo a construção da molécula-alvo o mais seletivamente possível, sem grande dependência da estrutura dos reagentes iniciais.

3.2.2. Iodo molecular

Em 2006, Žmitek *et al.*⁶⁸ descobriram que as limitações associadas aos métodos convencionais de síntese de tetraoxanos podiam ser contornadas usando o iodo como catalisador para a síntese de 1,1-dihidroperóxidos a partir de compostos carbonílicos em 30% de H₂O₂, de acordo com o esquema representado na figura III-6. Foi demonstrado que o iodo molecular funciona como catalisador do tipo ácido de Lewis na ativação de compostos carbonílicos. Com base nesta informação, este grupo de investigadores postulou que o iodo molecular seria também eficaz em reações de peroxidação. Chegaram a um método extremamente eficiente, com rendimentos na ordem de 70-90% na síntese destes intermediários, essenciais para a formação dos tetraoxanos⁶⁸.

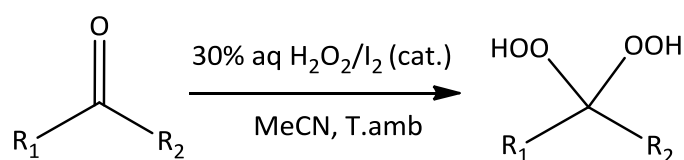


Figura III-6: Esquema representativo da estratégia de síntese do DHPs usando iodo molecular como catalisador (*adaptado de*⁶⁸).

O iodo parece desempenhar um papel duplo como catalisador, aumentando o caráter electrofílico do átomo de carbono do grupo carbonílo e aumentando também o caráter nucleófilo do peróxido de hidrogénio. Além disso, assiste na re-hibridação do átomo de carbono de sp³ para sp² e este fenómeno permite a adição do nucleófilo ou promove um rearranjo, como esquematizado na figura III-7⁶⁶. Na reação, o iodo atua como um ácido de Lewis, interagindo com o peróxido e o carbonilo do substrato inicial. A reação começa com a inserção do I₂ entre o átomo de oxigénio do grupo carbonilo e o nucleófilo (H₂O₂ ou H₂O), formando um estado de transição, TS-A. Ocorre migração de protão, formando um intermediário com hibridação sp³ (I-A), no qual é transformado ou em hidrato ou peroxihidrato. O iodo atua novamente como catalisador através da eliminação do grupo hidroxilo (-OH) e por via do estado de transição TS-B, origina o ião peroxicarbénico I-B. No caso dos DHPs, é captado outra

molécula de H_2O_2 , originando o respetivo 1,1-dihidroperóxido. É evidente que o iodo molecular desempenha um papel essencial no progresso da reação porque, em trabalhos posteriores, Žmitek e colaboradores realizaram o mesmo procedimento sem recorrer ao iodo, verificando que na ausência deste catalisador ocorre perda de seletividade na formação de DHPs, principalmente usando ciclohexanonas como reagente⁶⁶.

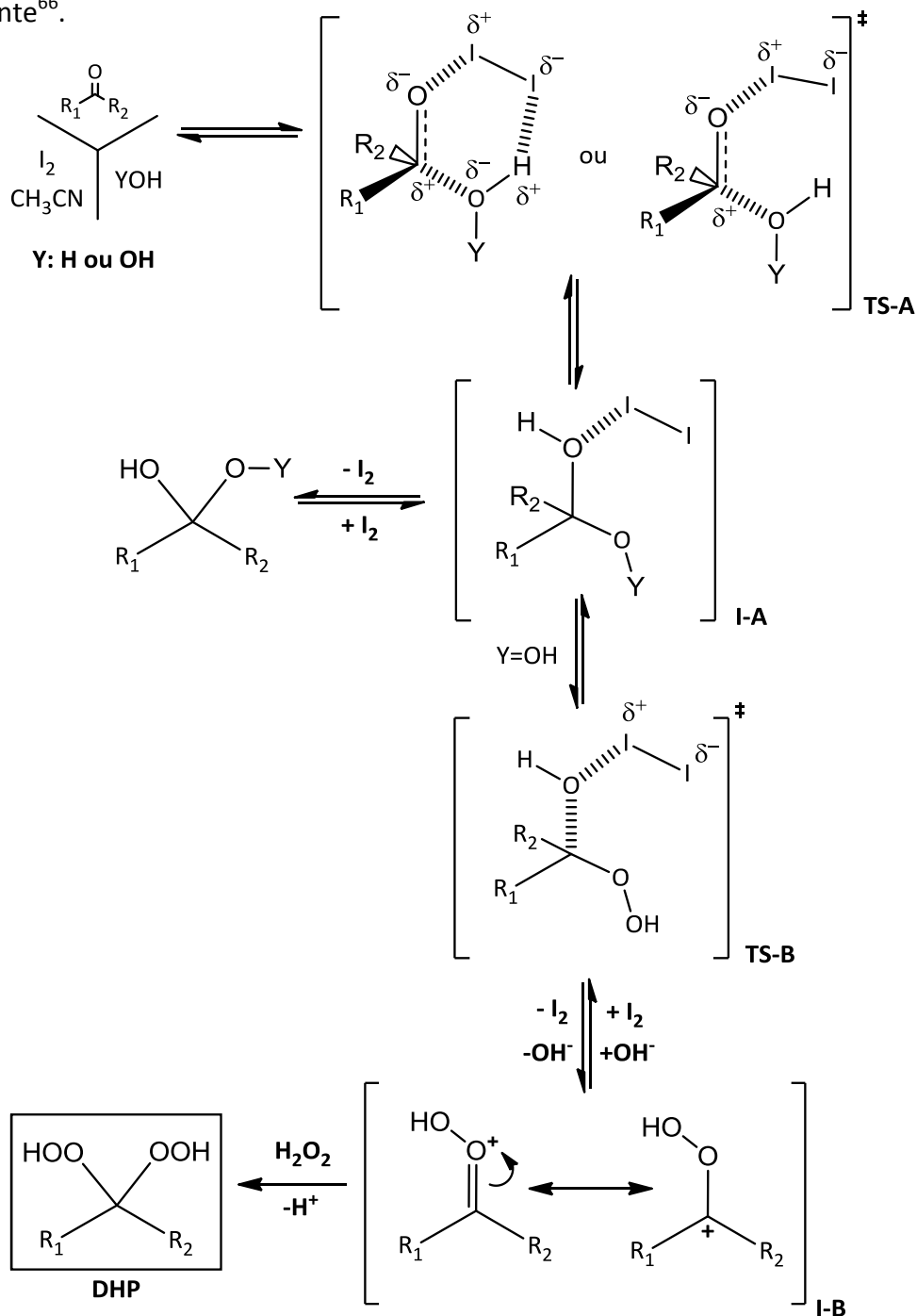


Figura III-7: Representação do mecanismo de formação do DHP com participação de iodo molecular (*adaptado de* ⁶⁶).

O solvente preferencial neste método de síntese é o acetonitrilo (MeCN). Não se pondera outro, pois é um procedimento de síntese em muito afetado pelo meio onde a reação decorre. O metanol (MeOH), por exemplo, interage fortemente com o iodo molecular favorecendo a formação de peroxicetais ao invés dos DHPs intermédios que são os elementos chave na formação dos 1,2,4,5-tetraoxanos⁶⁶.

Posteriormente à publicação destes resultados por Žmitek e colaboradores, em 2009, Kumar *et al.*⁷⁴ consideraram o desenvolvimento de um novo método de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos, em “one-pot”, usando como catalisador, o iodo molecular. O esquema de reação encontra-se apresentado na figura III-8.

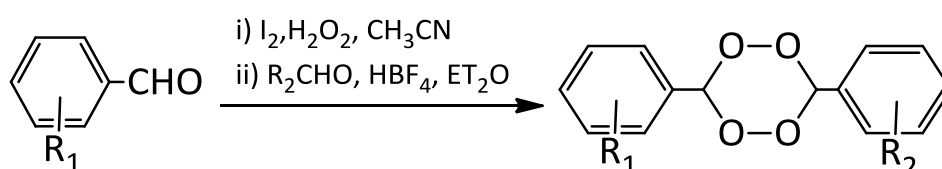


Figura III-8: Representação da estratégia de síntese do tetraoxanos usando como catalisador o iodo molecular (*adaptado de*⁷⁴).

Este novo método de síntese oferece várias vantagens, uma vez que a utilização de iodo e de MeCN, em conjunto e no mesmo ambiente reacional, acessíveis em simultâneo, permite o uso de concentrações de H₂O₂ relativamente baixas e torna desnecessário o uso de ácidos fortes, o que não restringe o uso de certos materiais de partida⁷⁴. Uma desvantagem é o tempo de formação do composto intermédio, que chega a ser de, pelo menos, 24 horas⁷⁵, com outras desvantagens pouco apetecíveis como rendimentos das reações relativamente baixos e o facto de este método estar limitado a substratos saturados e aldeídos aromáticos⁷⁶.

Foram sintetizados, usando esta metodologia, tetraoxanos simétricos e assimétricos. Os tetraoxanos simétricos apresentam algumas limitações, principalmente ao nível da variabilidade estrutural, fator muito importante para garantir especificidade e aumentar a reatividade⁷¹. Como referido anteriormente, nesta dissertação, a informação disponível na literatura indica que somente os tetraoxanos assimétricos exibem atividade antiparasitária. Também os tetraoxanos assimétricos oferecem mais oportunidades para a incorporação seletiva de vários grupos funcionais na molécula-alvo, como na incorporação de vários farmacóforos, em

estratégias de *design* de moléculas híbridas. Os compostos híbridos oferecem a possibilidade de uma única entidade química interagir com diferentes alvos ou diferentes locais num mesmo alvo de ação, sendo menos vulneráveis a resistências adaptativas, uma vez que é mais difícil para o sistema biológico em questão compensar a ação simultânea de dois ou mais farmacóforos⁷¹.

Face ao exposto, na química medicinal os tetraoxanos assimétricos são os de maior interesse. Contudo, em comparação com os tetraoxanos simétricos, apresentam maiores complicações na sua síntese⁶⁰. Este novo método usando iodo molecular permitiu contornar alguns destes problemas associados à síntese de tetraoxanos assimétricos.

3.2.3. Óxido de rénio (VII)

O método de síntese mais utilizado atualmente para a síntese dos tetraoxanos foi desenvolvida por Ghorai e Dussault em 2009⁷⁶ e envolve a utilização de óxido de rénio (VII). Este óxido desempenha um papel fundamental como catalisador, tanto para a reação de formação dos DHPs como para posterior condensação dos intermediários com o composto carbonílico, dando origem ao respetivo 1,2,4,5-tetraoxano.

O desenvolvimento deste método teve origem na observação, por Ghorai e Dussault em 2008⁷⁷, da eficácia de Re_2O_7 como catalisador nas reações de formação de DHPs, possibilitando rendimentos de reação geralmente superiores a 80%, como esquematizado na figura III-9.

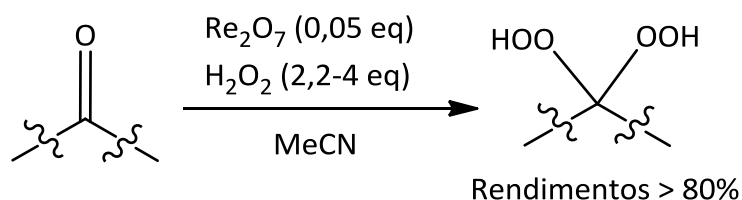


Figura III-9: Representação da estratégia de síntese de DHP usando o Re_2O_7 como catalisador (*adaptado de* ⁷⁷).

Esta metodologia permite optar por um processo em “*one-pot*” ou sequencial, embora, devido à natureza instável dos dihidroperóxidos, o método em “*one-pot*” seja

preferencialmente utilizado, evitando a decomposição do principal intermediário⁷⁶. O esquema da síntese de 1,2,4,5-tetraoxano por este método encontra-se apresentado na figura III-10.

O passo de formação do tetraoxano começa com adição do DHP, anteriormente formado com ativação do Re_2O_7 , à cetona ou aldeído, ocorrendo posteriormente ciclocondensação com formação do núcleo tetraoxano⁷⁶.

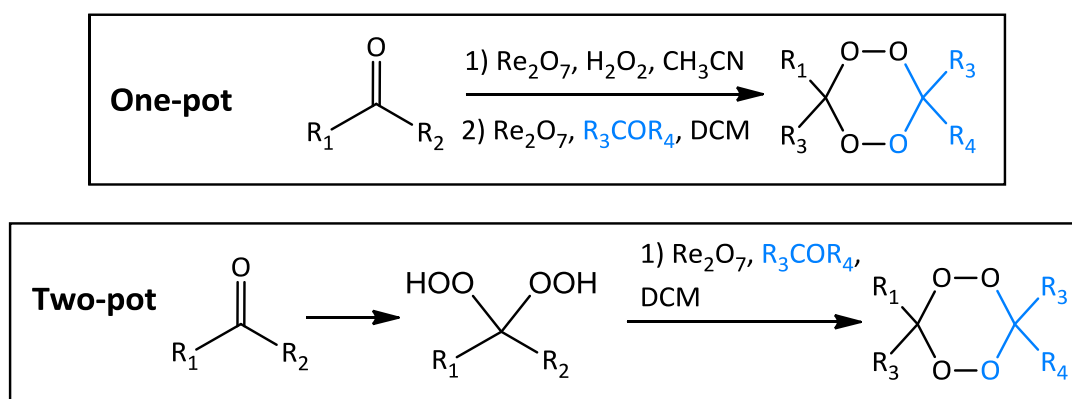


Figura III-10: Representação esquemática da síntese de 1,2,4,5-tetraoxano usando Re_2O_7 como catalisador (adaptado de⁷⁶).

A elevada atividade das espécies Re (VII) e em particular a capacidade de promover a ciclocondensação de peróxidos em condições de reação suaves, pode refletir-se na capacidade de ativar o peróxido, derivado da adição de H_2O_2 ao carbonilo. Esta hipótese foi defendida por Tadpetch *et al*⁷⁸.

Este novo método de síntese, para além garantir um alto rendimento, oferece várias vantagens, algumas semelhantes à do método com iodo molecular, como a utilização de MeCN como solvente, ambientalmente benigno e de fácil acesso. Também não é necessário utilizar concentrações de H_2O_2 elevadas nem ácidos fortes, condições estas que iriam favorecer a formação de subprodutos devido à instabilidade influenciada. Assim, evitando estas condições, não se restringe o uso de certos materiais de partida e, como outra grande vantagem, tem-se um tempo de reação para a formação de tetraoxanos relativamente curto⁷⁶. No entanto, a desvantagem associada a este método é o custo, em particular pelo catalisador Re_2O_7 que é relativamente dispendioso⁷⁹.

3.2.4. Ácido fosfomolibdico (PMA)

Ainda em 2009, Li *et al.*⁷⁹ descreveram um procedimento diferente para a síntese de DHPs, envolvendo o ácido fosfomolibdico (de “Phosphomolibdic Acid”, PMA, figura III-11) como catalisador e peróxido de hidrogénio como agente oxidante, usando o éter etílico como solvente (figura III-12). O PMA apresenta propriedades catalíticas e é usado em muitas reações de síntese orgânica, como por exemplo na desidratação de álcoois, em reações de alquilação de Friedel–Crafts de compostos aromáticos, na síntese de aminas homoalílicas, entre outros⁸⁰.

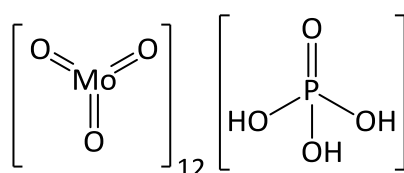


Figura III-11: Representação da estrutura do ácido fosfomolibdico (PMA) (*adaptado de*⁷⁹).

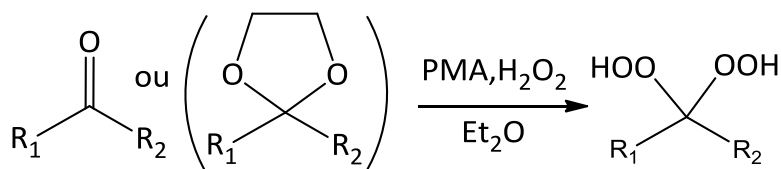


Figura III-12: Representação esquemática da síntese de DHP usando PMA como catalisador (*adaptado de*⁷⁹).

Este novo procedimento, através da combinação de reagentes utilizada, apresenta um conjunto de condições, entre as quais um pH pouco ácido e uma potente atividade catalítica, que permite gerar DHPs através de substratos de cetonas/cetais contendo grupos como benzilo (Bn), benzóilo (Bz), alcenos e outros⁷⁹.

Esta grande compatibilidade química por parte dos reagentes, neste método de síntese, permite o acoplamento de outros grupos funcionais, como por exemplo, ésteres, nitrilos ou alcinos, ao núcleo dos DHPs, garantindo uma maior flexibilidade e diversidade química quando se adicionar os restantes reagentes para posterior formação do núcleo tetraoxano⁷⁹.

Para além das vantagens apresentadas por este método de síntese, o catalisador PMA é economicamente acessível em comparação com o catalisador Re_2O_7 . A maior acessibilidade do ponto de vista económico, associada à evidência de bons rendimentos de reação e compatibilidade química, suscitaram grande interesse junto da comunidade científica pelo desenvolvimento de um método para síntese de tetraoxanos.

Em 2011 Yan *et al.*⁸¹ descreveram o método de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos usando o PMA como catalisador, em diclorometano (DCM) e sulfato de magnésio (MgSO_4) como agente secante. O esquema de reação encontra-se apresentado na figura III-13.

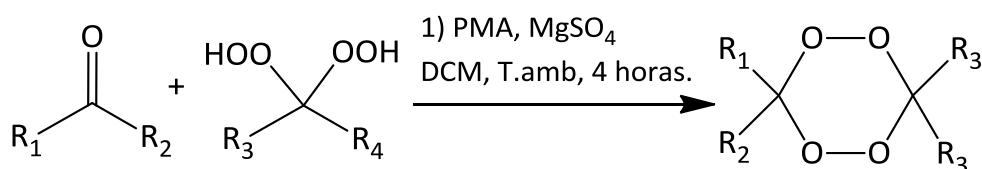


Figura III-13: Representação esquemática da síntese de tetraoxanos usando PMA como catalisador (*adaptado de*⁸¹).

O método de síntese de tetraoxanos utilizando PMA como catalisador é muito eficaz, apresentando valores de rendimento iguais ou superiores aos obtidos utilizando Re_2O_7 . Desta forma, o reagente PMA permite uma metodologia eficiente, prática e económica para a síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos biologicamente ativos.

Em comparação com outros catalisadores utilizados neste tipo de síntese, como Re_2O_7 e MTO, o PMA é menos dispendioso. Também é substancialmente mais estável ao ar e fácil de manusear. Além disso, a tolerância relatada na síntese de DHPs a partir de vários grupos funcionais deve promover o uso deste método de forma quase universal, num futuro próximo.

Novas propostas de metodologias de síntese continuam a surgir na comunidade científica, como por exemplo, a utilização de nitrato de cério⁸² que recentemente foi analisado como potencial catalisador na síntese de DHPs. Uma nova abordagem no que concerne ao grupo de compostos descritos ao longo desta dissertação, é a recente investigação relativa a métodos de síntese para tetraoxanos bicíclicos⁸³ o que vem provar, uma vez mais, a enorme importância destes compostos e a necessidade de se

estudar, em maior detalhe, todas as suas potencialidades e, em particular, o seu potencial farmacológico para o combate a outras patologias, como por exemplo leishmanioses.

IV. SÍNTESE E ATIVIDADE DE PERÓXIDOS COM POTENCIAL ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

No âmbito desta dissertação foi realizada uma componente experimental na área de Química Medicinal, no grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do CCMAR, liderado pela Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano. Este grupo tem vindo a desenvolver vários projetos de investigação centrados na síntese de peróxidos semissintéticos e sintéticos com potencial atividade farmacológica contra infeções causadas por parasitas protozoários. O trabalho de investigação desenvolvido pela autora enquadra-se num destes projetos.

Neste capítulo encontra-se descrito todo o trabalho experimental desenvolvido e respetivo enquadramento.

4.1. Âmbito da parte experimental

A expansão da utilização mundial de artemisinina e derivados no tratamento de malária tem demonstrado a importância de drogas de base peroxídica^{17,84}.

Considerando a existência de outras infeções provocadas por parasitas que partilham um ancestral comum com o *Plasmodium*, por exemplo *Leishmania spp.*, foi proposto investigar a atividade de peróxidos contra outros protozoários responsáveis por patologias. No âmbito deste projeto pretende-se preparar compostos de base peroxídica e avaliar a sua atividade em parasitas do género *Leishmania*, responsáveis pelas leishmanioses.

A leishmaniose é classificada pela OMS como uma doença tropical negligenciada. Esta patologia resulta de uma infeção provocada por parasitas do género *Leishmania*, transmitida através da picada de flebótomos. É uma doença comum em áreas tropicais e subtropicais do mundo^{85,86}, ocorrendo predominantemente em países subdesenvolvidos, onde a maioria dos doentes não tem acesso a um tratamento adequado devido ao elevado custo dos fármacos disponíveis, associado a difícil acessibilidade aos fármacos e/ou longa duração de tratamento, aumentando o risco de resistência à terapêutica⁸⁷. Estas e outras limitações dos fármacos disponíveis para tratamento de Leishmanioses, entre as quais se destaca a toxicidade para o hospedeiro humano e a falha terapêutica em algumas

zonas asiáticas, devido a resistências desencadearam a necessidade da descoberta de novas alternativas farmacoterapêuticas que sejam eficazes, facilmente acessíveis para a população afetada e menos tóxicas que as existentes⁸⁸.

Em 2008, Chollet *et al.*⁸⁹ demonstraram a atividade de uma biblioteca de fluoro-artemisininas contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* (em concentrações micromolares), mas observaram ausência de atividade contra correspondentes formas amastigotas intramacrofágicas.

Tal como referido anteriormente, a artemisinina e seus análogos semissintéticos apresentam baixa biodisponibilidade e uma *clearance* rápida. Com o objetivo de colmatar estas desvantagens, vários derivados têm sido desenvolvidos de modo a obter compostos sintéticos mais estáveis, com tempos de semivida superiores e potencialmente menos tóxicos.

Recentemente, Cortes *et al.*⁹⁰ publicaram resultados de um estudo que demonstra a atividade biológica de trioxolanos sintéticos contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, propondo que um dos trioxolanos testados seja considerado como modelo no desenvolvimento de novas moléculas para terapia de *leishmanioses*.

Foi referido no capítulo II que alguns 1,2,4,5-tetraoxanos demonstraram atividade *in vitro* contra linhas de parasitas do género *Plasmodium*, sendo tidos como muito promissores para o tratamento de malária. Sabendo que os 1,2,4,5-tetraoxanos apresentam uma maior estabilidade face aos seus análogos trioxolanos, o objetivo deste trabalho experimental focou-se no desenvolvimento de novos tetraoxanos com estruturas otimizadas, com o objetivo de avaliar a sua atividade antileishmaniose e potencial utilidade no tratamento da Leishmaniose. Foi preparada uma pequena biblioteca de tetraoxanos com diversidade estrutural, de modo a permitir estudos de relação estrutura-atividade forneçam informações que posterior seleção e otimização de moléculas líder.

4.2. Estratégias de síntese e compostos preparados

Na perspectiva do *design* racional de fármacos contra a Leishmaniose, procedeu-se à síntese de uma pequena biblioteca de compostos da família dos tetraoxanos. Neste projeto pretendeu-se desenvolver novas moléculas com o núcleo tetraoxano, com características estruturais semelhantes mas exibindo algumas diversidade estrutural ao nível dos substituintes do sistema ciclohexilo, para posteriormente avaliar a atividade em modelos de *Leishmania donovani*.

Como referido anteriormente nesta dissertação, a presença de um grupo espiro adamantanona nas posições R1 e R2 e de um grupo ciclohexano nas posições R3 e R4 aumentou significativamente a estabilidade dos tetraoxanos e também a sua atividade antiplasmódica. No sentido da otimização e diversificação estrutural, e face à informação bibliográfica disponível, foram preparados no decurso deste trabalho de investigação, 1,2,4,5-tetraoxanos com a estrutura base representada na figura IV-1.

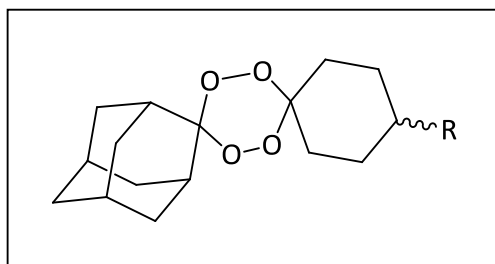


Figura IV-1: Representação da estrutura geral dos tetraoxanos sintetizados (R = O; NH(CH₂)₄NHBoc; COOEt; COOH; CONH(CH₂)₄NHBoc).

O esquema reacional ilustrativo da estratégia de síntese dos tetraoxanos, com indicação das estruturas dos compostos intermédios envolvidos no processo da síntese das moléculas-alvo, identificadas por LC157/PA5 e LC176/PA6, encontram-se apresentados nas Figuras IV-2 e IV-3. Um dos compostos apresenta um grupo amina (**LC157/PA5**) e outro uma ligação amida (**LC176/PA6**). Por ter sido anteriormente sugerido que um substituinte amida ligado ao carbono 4 do ciclohexano favorece a absorção oral e melhora as propriedades farmacocinéticas³⁴, um dos tetraoxanos preparados apresenta a função amida. As vias sintéticas adotadas e a identificação estrutural dos compostos sintetizados serão apresentadas e discutidas neste capítulo.

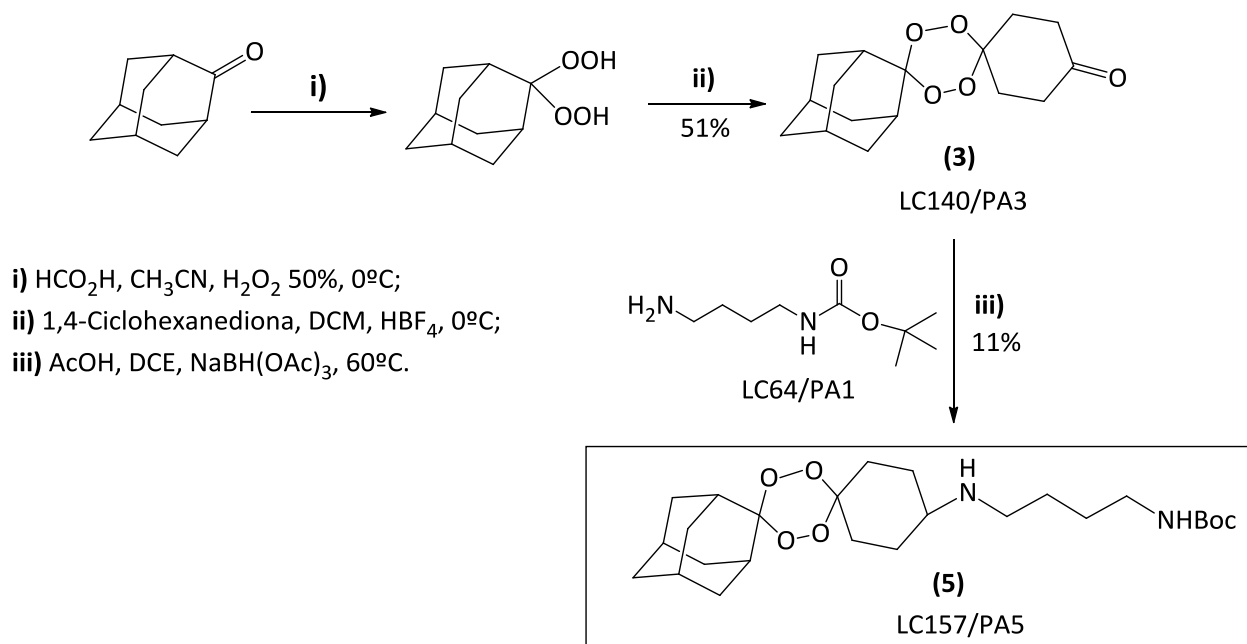


Figura IV-2: Representação da estratégia de síntese do composto LC157/PA5 (5).

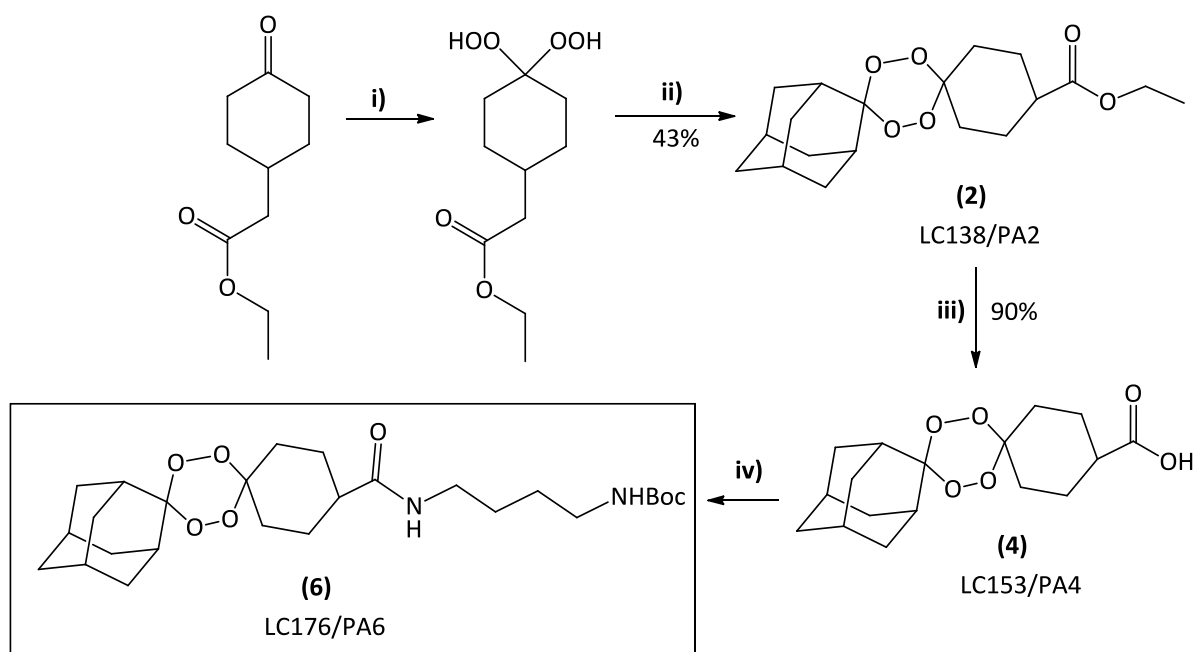


Figura IV-3: Representação da estratégia de síntese do composto LC176/PA6 (6).

4.2.1. Proteção da amina PA1/LC64, composto (1)

Na preparação das moléculas-alvo seguiu-se uma estratégia de síntese convergente. Assim, vários compostos foram preparados separadamente para posterior acoplamento, formando as moléculas-alvo pretendidas.

A primeira etapa consistiu na síntese dos blocos intermédios, nomeadamente o composto LC64/PA1, uma amina primária seletivamente protegida com o tert-butoxicarbonilo (Boc), representada na figura IV-4. Esta amina serviu de reagente para a formação dos compostos finais do projeto. O procedimento experimental efetuado encontra-se descrito no capítulo V. Foi obtido um rendimento de 64%.

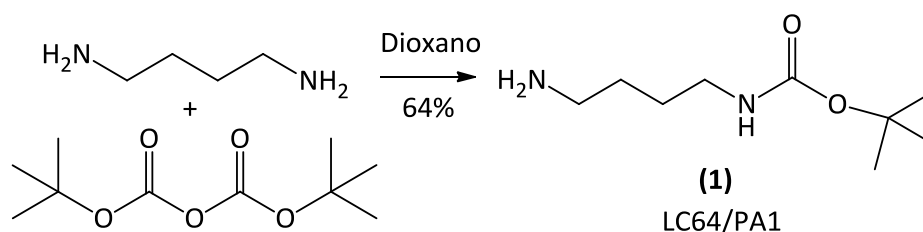


Figura IV-4: Esquema de síntese do carbamato N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1, composto (1).

- **Proposta mecanística para a reação de proteção da amina, formando o composto (1)**

O mecanismo proposto para a formação amina primária seletivamente protegida, encontra-se esquematizado na figura IV-5.

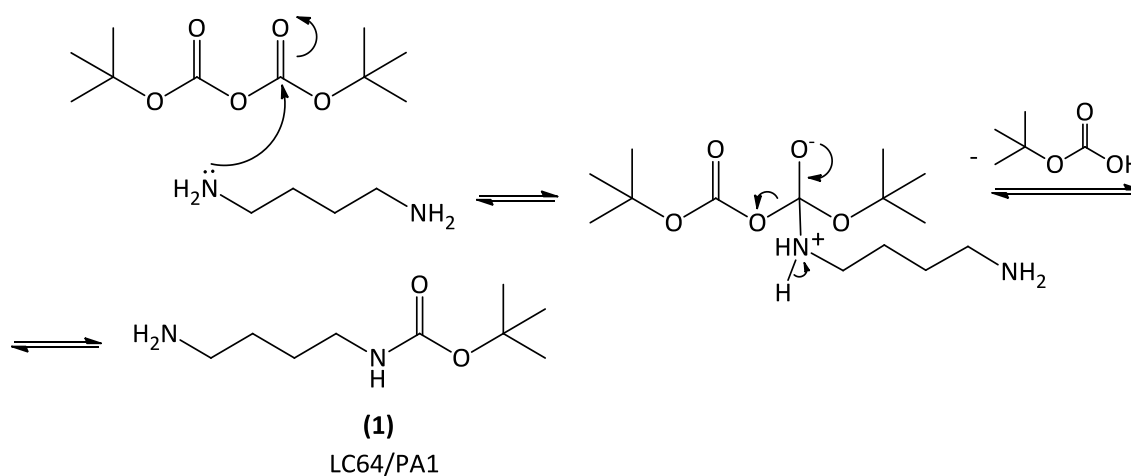
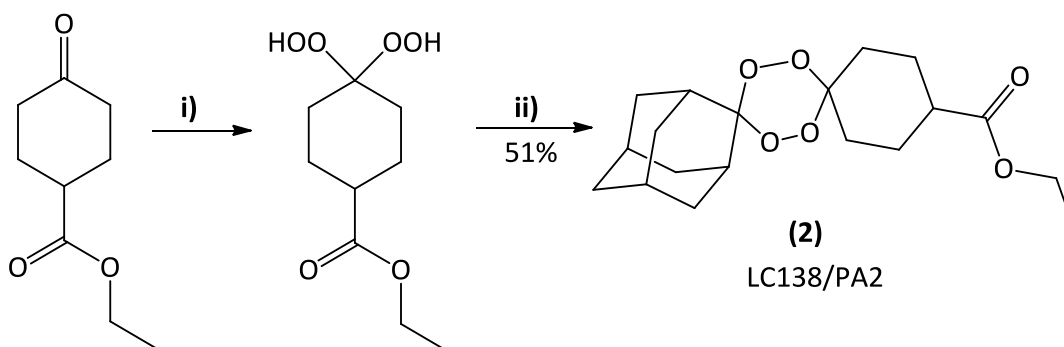


Figura IV-5: Proposta mecanística da formação do composto N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1 (1).

4.2.2. Síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos, compostos (2) e (3)

Do conjunto de procedimentos experimentais descritos na literatura para a síntese de tetraoxanos, é possível concluir que o passo fundamental consiste na oxidação do composto de partida e posterior conversão do dihidroperóxido intermédio obtido num peróxido cíclico. O dihidroperóxido intermédio é relativamente instável, pelo que a escolha dos reagentes e de condições de reação compatíveis é, por norma, limitada. Dos inúmeros procedimentos referidos na literatura, decidiu-se basear o método de síntese utilizado neste trabalho experimental no reportado por O'Neill *et al.*⁴⁶ A síntese consiste essencialmente em dois passos: i) oxidação do grupo carbonílico por ação de peróxido de hidrogénio, H₂O₂, por um catalisador específico e ii) posterior ciclização a partir de um dihidroperóxido intermediário^{46,64}.

Para obter o alvo LC138/PA2 fez-se reagir inicialmente o composto cicloéster com peróxido de hidrogénio a 50% e ácido fórmico (HCO₂H), em acetonitrilo (CH₃CN), a 0°C. No dihidroperóxido formado, foi adicionado a uma mistura reacional que continha adamantanona e ácido fluorobórico (HBF₄) em diclorometano (DCM). Formou-se o 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2 (2), representado na Figura IV-6, com um rendimento de 51%.

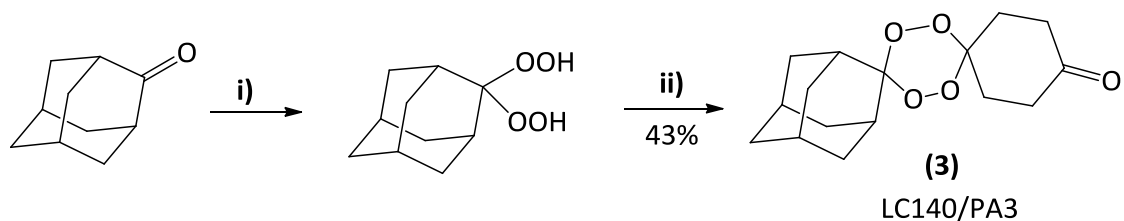


i) HCO₂H, CH₃CN, H₂O₂ 50%, 0°C ii) Adamantanona, DCM, HBF₄, 0°C

Figura IV-6: Esquema de síntese dos tetraoxanos LC138/PA2, composto (2).

Para obter o alvo LC140/PA3, o procedimento utilizado foi semelhante ao procedimento para obtenção do tetraoxano LC138/PA2. Fez-se reagir adamantanona, com H₂O₂ a 50% e HCO₂H, em CH₃CN, a 0°C. Posteriormente, adicionou-se o dihidroperóxido formado a uma mistura de 1,4-ciclohexanediona e HBF₄ em DCM. O

1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3 (**3**), representado na Figura IV-7., foi obtido com 43% de rendimento.



i) HCO_2H , CH_3CN , H_2O_2 50%, 0°C ; ii) 1,4-Ciclohexanediona, DCM, HBF_4 , 0°C ;

Figura IV-7: Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3, composto (3).

- **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 2**

O mecanismo proposto para as etapas envolvidas na formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2, encontra-se esquematizado na figura IV-8.

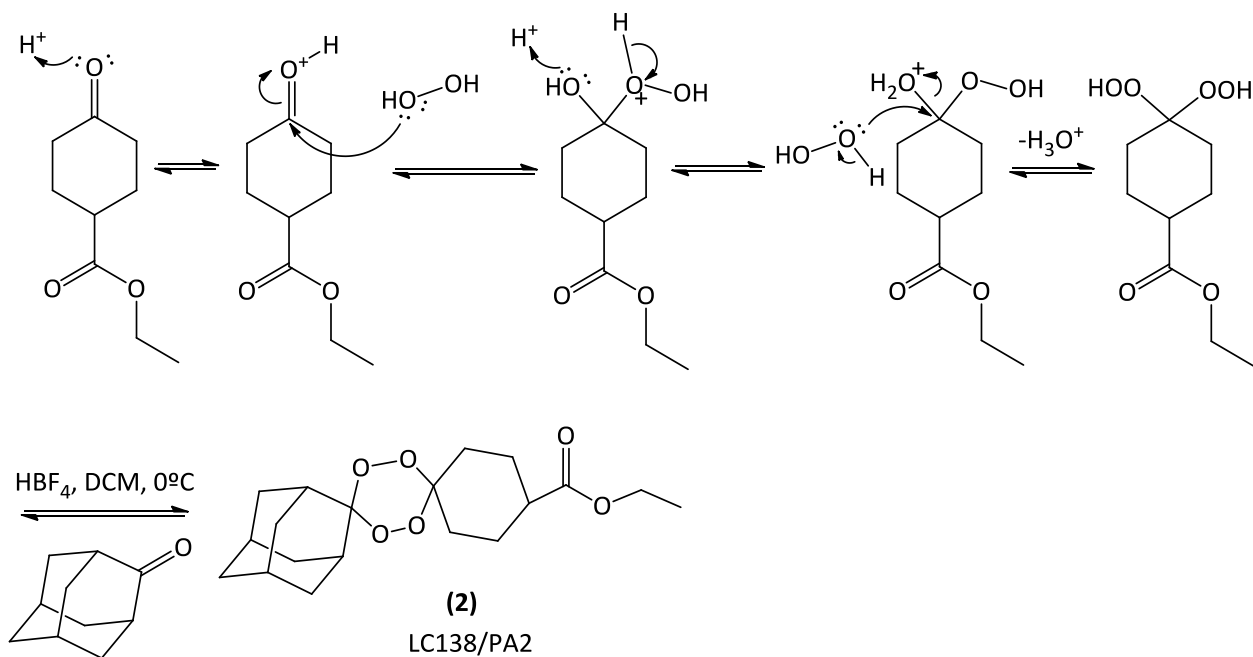


Figura IV-8: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2 (2).

- **Proposta mecanística da formação do composto 3**

O mecanismo proposto para a formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3, encontra-se esquematizado na figura IV-9.

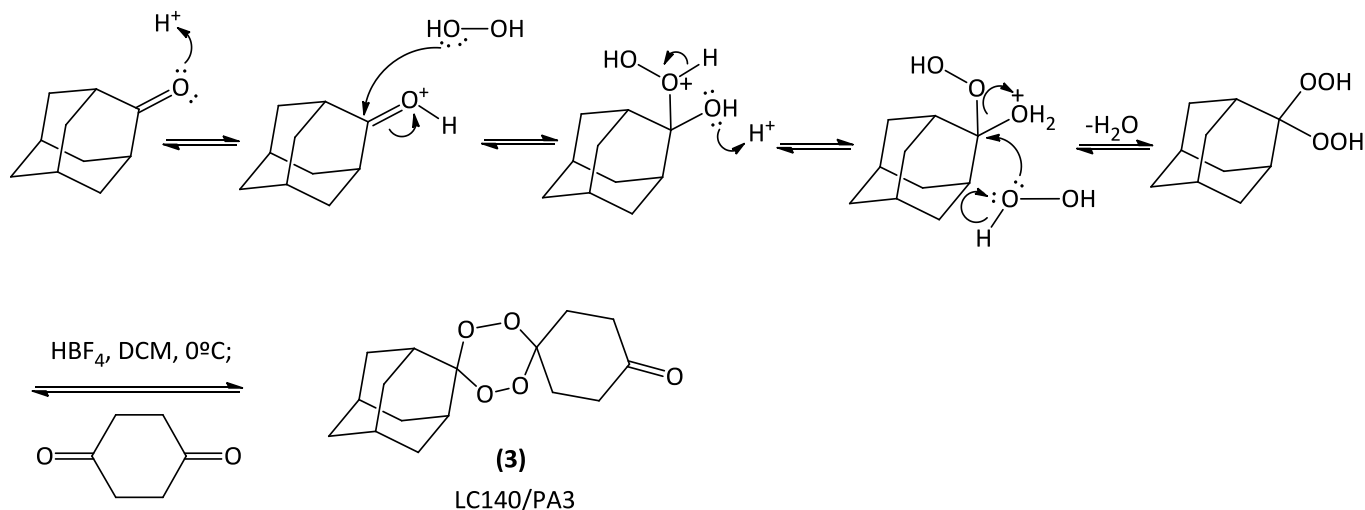
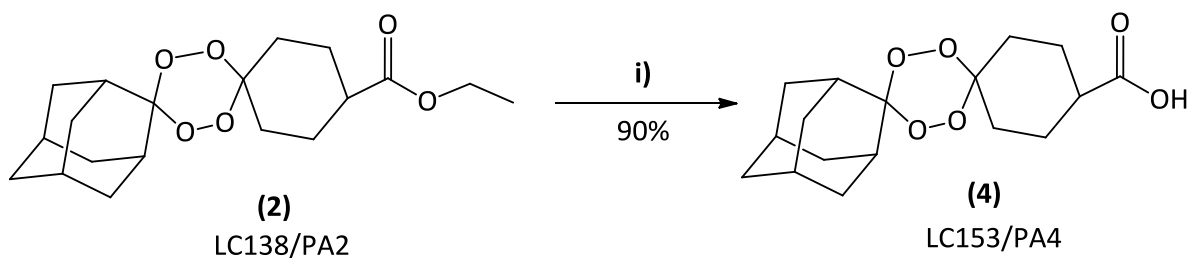


Figura IV-9: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3 (3).

4.2.3. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC153/PA4, composto (4)

Para se proceder ao acoplamento da amina seletivamente protegida à estrutura do tetraoxano e de modo a obter um dos endoperóxidos finais (ver estratégia esquematizada na Figura IV-3), é necessário hidrolisar a função éster do composto (2), obtendo o ácido carboxílico (4). Segundo os estudos realizados por Opsenica *et al.*⁶³, os tetraoxanos são compostos consideravelmente estáveis, tanto em condições básicas como ácidas, tornando possível a aplicação de um procedimento de hidrólise que envolva uma base forte como o hidróxido de potássio (KOH). O processo de hidrólise encontra-se representado na figura IV-10.



i) MeOH, KOH, $40^\circ C$

Figura IV-10: Esquema de síntese do ácido carboxílico LC153/PA4, composto (4).

- **Proposta mecanística da reação de hidrólise do éster 2 com formação do ácido 4**

O mecanismo proposto para a formação do ácido carboxílico LC153/PA4, encontra-se esquematizado na figura IV-11.

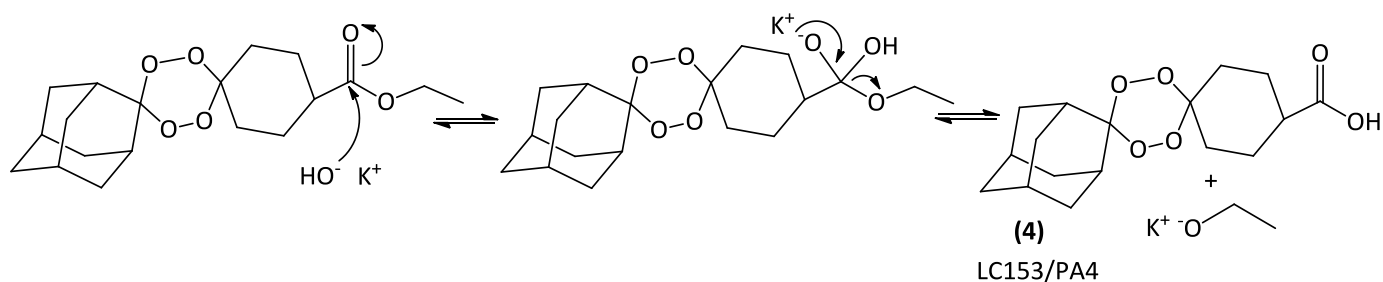


Figura IV-11: Proposta mecanística para a formação do ácido carboxílico LC153/PA4 (4) por hidrólise do éster (2).

4.2.4. Síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5)

Encontram-se descritos na literatura vários procedimentos para a preparação de aminas. Um dos métodos mais utilizados inclui a redução de grupos funcionais contendo o átomo de N, tais como grupos imina ($-\text{N}=\text{CR}_2$), nitro ($-\text{NO}_2$), ciano ($-\text{CN}$) e amidas ($-\text{CO}-\text{NH}_2$). Para a síntese do composto pretendido, o 1,2,4,5-tetraoxano LC157/PA5 (5), preparou-se o composto intermédio imina e esta foi posteriormente submetida a uma aminação redutiva. De um modo geral, a reação de aminação redutiva envolve a formação inicial de um intermediário carbinolamina o qual, por desidratação, origina uma imina, também denominada por base de Schiff. A imina, nas condições da reação (pH ligeiramente ácido, controlado), é protonada formando o ião imínio. Usando um agente redutor apropriado, este ião sofre redução, obtendo-se a amina como produto final. A escolha do agente redutor é um passo muito importante para garantir o sucesso da reação, dado que este composto deve reduzir seletivamente as iminas sem reagir com grupos funcionais que contenham um carbono carbonílico

que estejam presentes na mistura reacional, evitando-se assim a formação de outros produtos⁹¹⁻⁹³.

Para a síntese do composto final pretendido usou-se como agente redutor o triacetoxiborohidreto de sódio, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, representado na Figura IV-12. O facto de apresentar propriedades redutoras moderadas e uma notável seletividade faz deste composto o agente redutor escolhido para procedimentos de aminação redutiva⁹¹⁻⁹³.

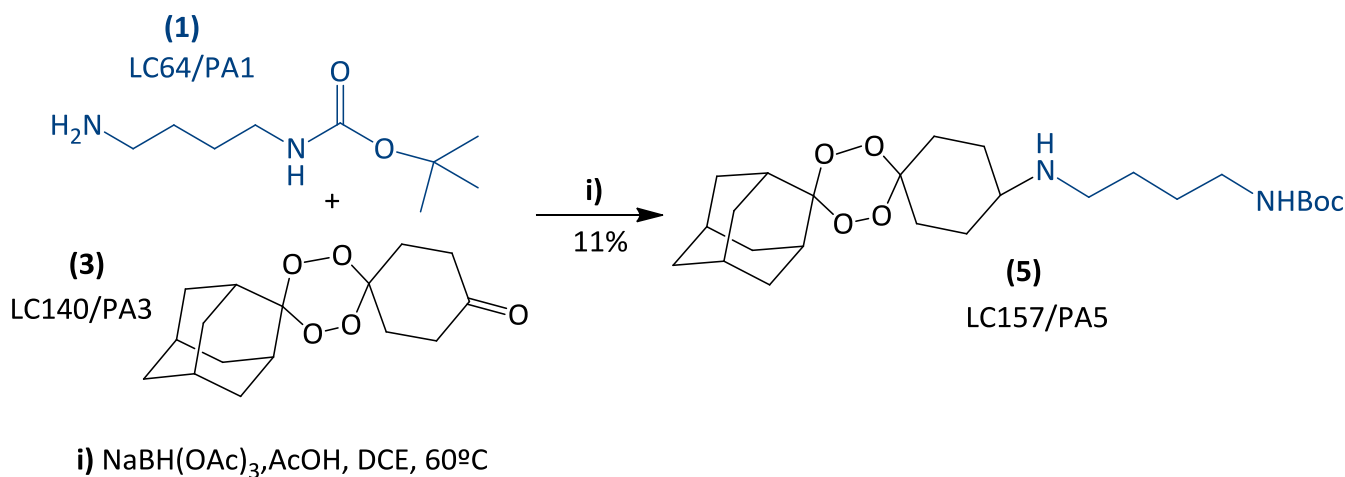


Figura IV-12: Esquema de síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5).

- **Proposta mecanística para os passos reacionais envolvidos na formação do composto (5)**

A estratégia de síntese proposta para a síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC157/PA5 (5), envolve o acoplamento do derivado cetona (3) com a amina seletivamente protegida (1), seguido de aminação redutiva na presença de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ como agente redutor. Os mecanismos propostos para as reações envolvidas encontram-se descritos na Figura IV-13.

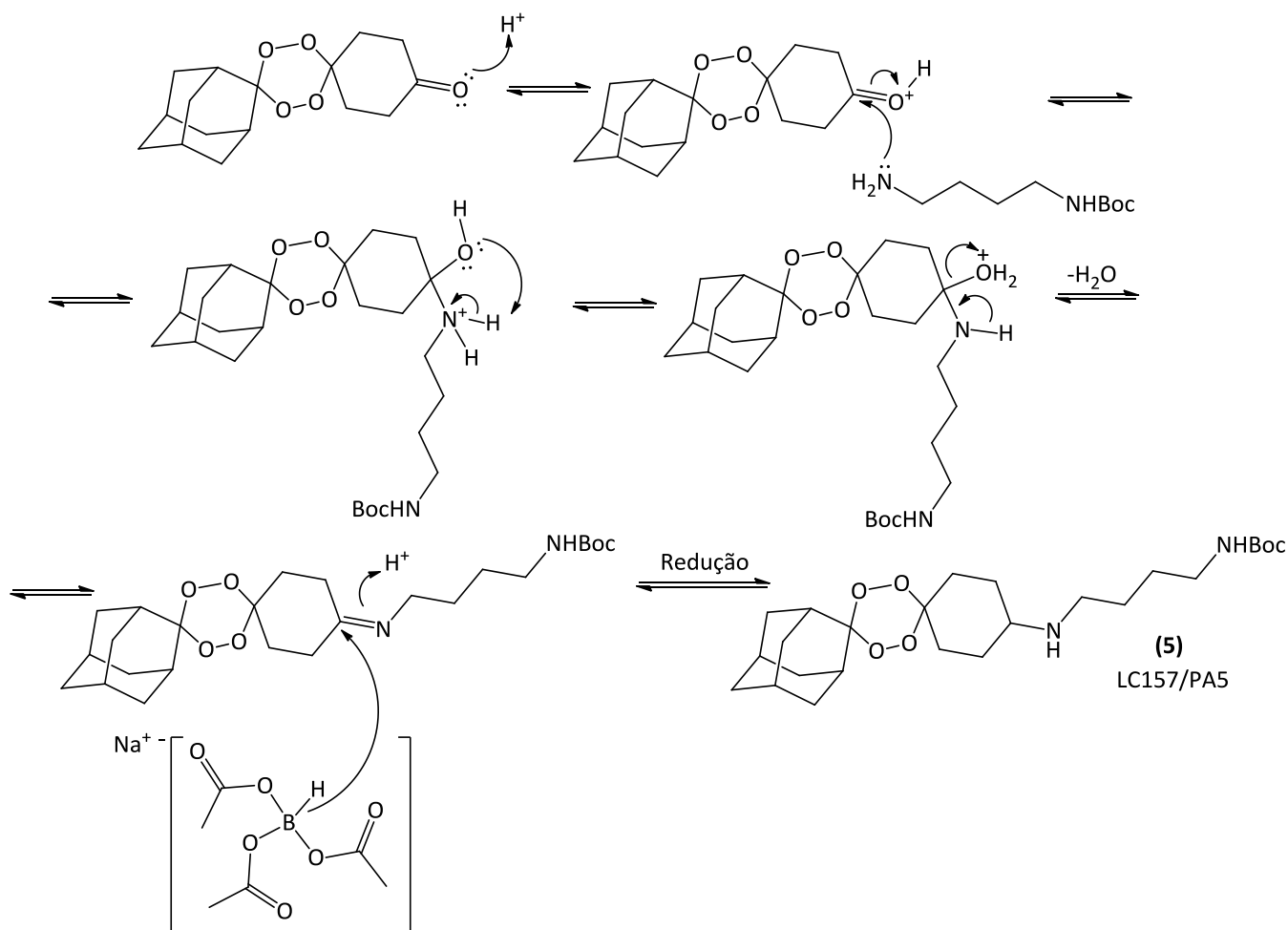


Figura IV-13: Proposta mecanística para as reações envolvidas na síntese do composto (5).

4.2.5. Síntese da amida LC176/PA6, composto (6)

As funções amida desempenham um papel importante nos sistemas biológicos como na ligação dos aminoácidos para a produção de péptidos, dando origem posteriormente às proteínas. Porém, as funções amida não são exclusivas das proteínas, estando presentes em muitos fármacos atualmente comercializados⁹⁴.

Existem vários procedimentos para a preparação de amidas descritos na literatura. A síntese de amidas não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente, requerendo em geral temperaturas elevadas (por vezes superiores a 200°C)⁹⁵ o que

pode comprometer a integridade dos substratos. Por esta razão, na preparação de compostos com funcionalidades amida para fins farmacêuticos, a acilação de aminas é efetuada com ácidos carboxílicos ativados. O processo, geralmente designado por acoplamento peptídico, envolve uma condensação da amina com o ácido carboxílico previamente convertido num éster ativo^{96,97}, como representado na figura IV-14.

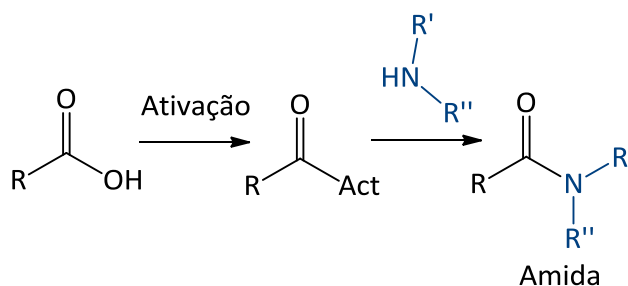


Figura IV-14: Representação esquemática da formação de uma ligação amida usando um ácido carboxílico previamente ativado (*Adaptado de* ^{96,97}).

i) Acoplamento peptídicos usando carbodiimidas

As carbodiimidas foram os primeiros reagentes de acoplamento usados para a formação de ligações peptídicas. Continuam a ser bastante utilizados na síntese de péptidos, pois apresentam uma atividade moderada e são relativamente baratas^{98,99}.

No âmbito do trabalho descrito nesta tese usou-se para a síntese da molécula-alvo pretendida a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), representada na figura IV-15. A EDC permite a ativação do grupo carboxilo para que a reação seja mais rápida com a amina primária⁹⁹.

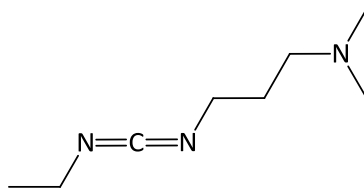


Figura IV-15: Representação da estrutura da EDC, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (*Adaptado de* ⁹⁹).

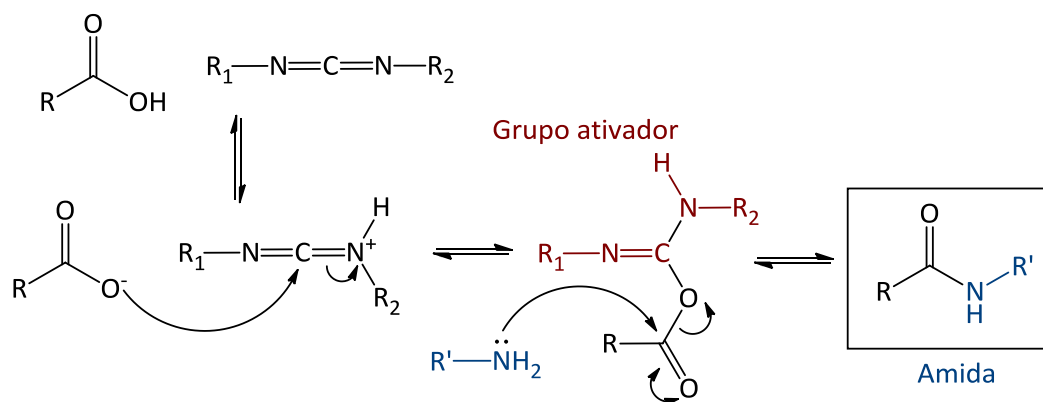


Figura IV-16: Proposta mecanística para o acoplamento peptídico, usando EDC como ativador do ácido carboxílico (*Adaptado de* ⁹⁴).

O EDC também funciona como agente de desidratação pois, ao reagir com a água, forma ureia. Deste modo, a água é removida à medida que se forma, evitando-se assim a formação de produtos secundários e promovendo um deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do produto desejado ^{94,99}.

ii) Uso de aditivos

A fim de reduzir o nível de epimerização resultante da utilização das carbodiimidas como reagentes de acoplamento, foi introduzido por Koenig e Geiger o composto 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBT) como aditivo neste tipo de reações. Este aditivo, representado na Figura IV-17, reduz também a reatividade do intermediário ativado, evitando a ocorrência de reações secundárias e aumentando assim o rendimento da reação ^{94,100}.

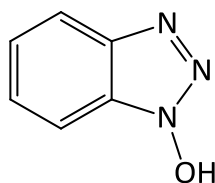
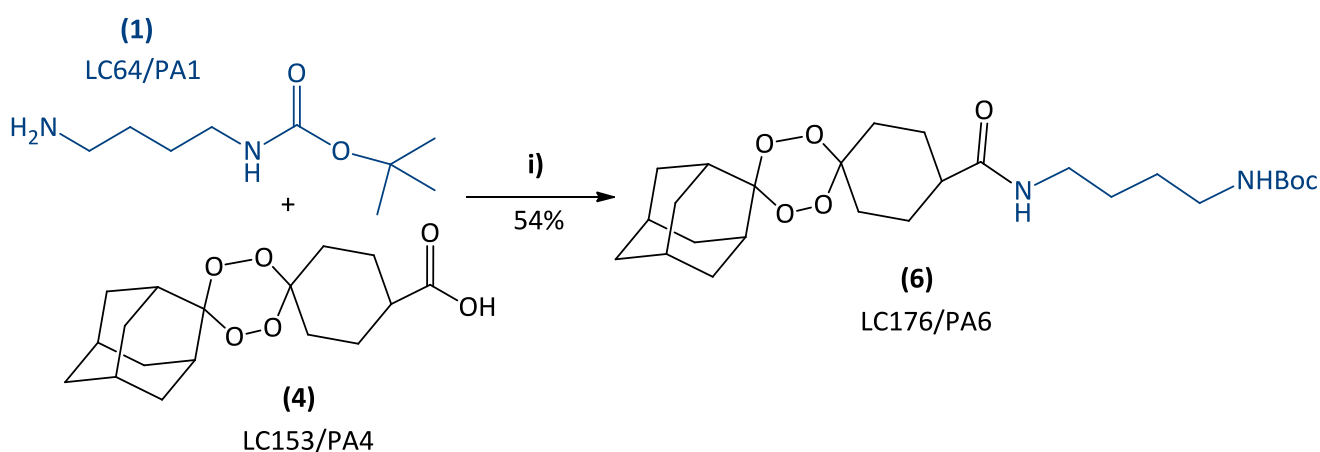


Figura IV-17: Representação da estrutura do 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBT) (*Adaptado de* ⁹⁴).

Para além dos reagentes mencionados anteriormente, para obter o alvo LC176/PA6 utilizou-se a N-metilmorfolina, que funciona como base, permitindo a remoção do protão do grupo carboxílico, o que facilita a reação com o EDC.

Durante a preparação de amidas, é essencial a existência de um ambiente anidro no meio reacional para evitar a formação de produtos não esperados, uma vez que a água pode atuar como nucleófilo, comprometendo o sucesso da reação^{94,100}. A síntese da amida LC176/PA6 encontra-se representada na figura IV-18.



i) EDC, HOBT, N-metilmorfolina, 40°C

Figura IV-18: Esquema de síntese da amida LC176/PA6, composto (6).

- **Proposta mecanística da formação do composto 6**

O mecanismo proposto para a formação da amida LC176/PA6, partindo do ácido carboxílico (4), encontra-se esquematizado na figura IV-19.

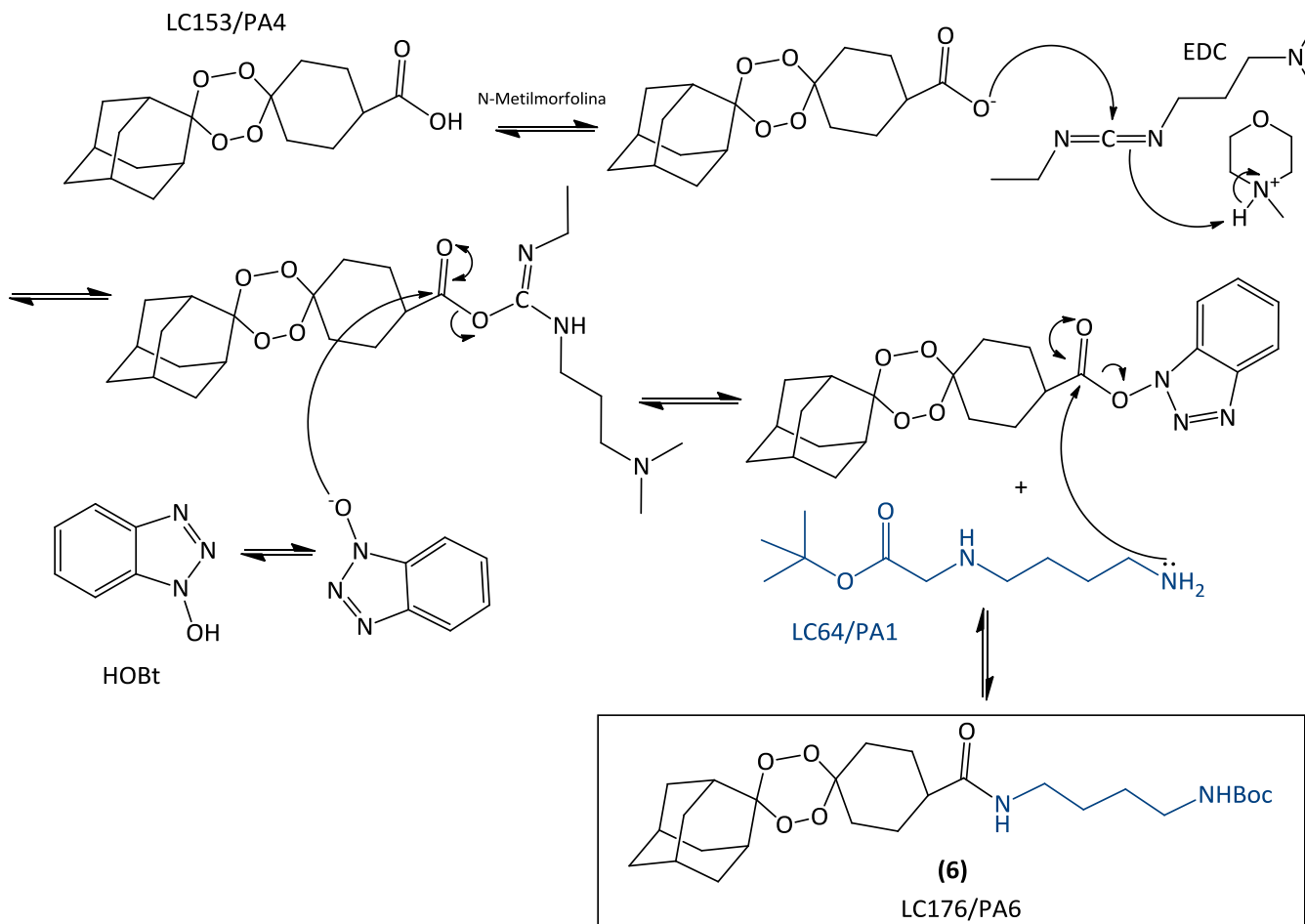


Figura IV-19: Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto (6), por acoplamento peptídico.

Após a síntese destes compostos, estava previsto remover o grupo protetor Boc para posterior avaliação da atividade destes compostos contra *Leishmania donovani*, um parasita causador da leishmaniose. A remoção do grupo protetor Boc pode ser feita por catálise ácida, como representado na Figura IV-20. No entanto, a escassez do tempo disponível para a conclusão do trabalho prático tornou impossível a realização destas últimas reações, que poderão vir a ser realizadas em trabalhos futuros. Da mesma forma, no futuro, poder-se-á sintetizar outros compostos desta classe com algumas modificações a nível de grupos funcionais, partindo dos compostos preparados, no sentido de se aprofundar a investigação da influência de alterações estruturais na atividade farmacológica.

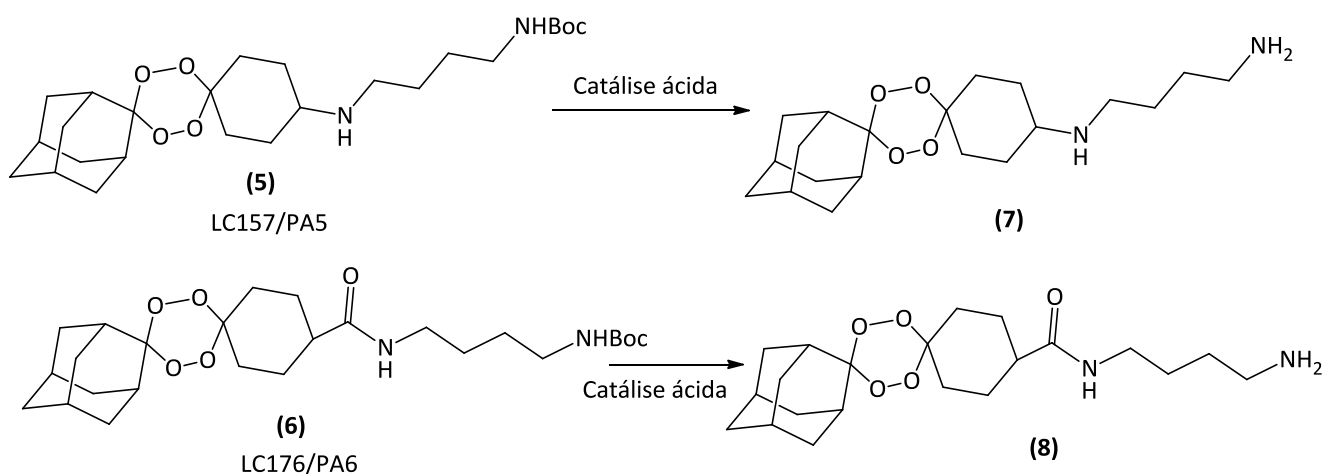


Figura IV-20: Representação esquemática da estratégia de desproteção da função amina nos compostos finais do projeto.

4.3. Resultados e Discussão

Alguns dos compostos sintetizados já foram submetidos a ensaios *in vitro* em macrófagos infectados com amastigotas da estirpe de *Leishmania donovani* LV9 (tabela IV-1)¹⁰¹. Esta espécie é uma das responsáveis pela forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral, afetando os órgãos internos, nomeadamente, o baço, o fígado, gânglios linfáticos e a medula óssea. Se não devidamente tratada, é geralmente letal¹⁰².

Os valores de IC₅₀, isto é, a concentração necessária para inibição em 50% do crescimento celular na estirpe LV9, para os compostos LC138, LC140 e LC153 foram, respetivamente: não definido (ND); 2,52 ± 0,65 μM; 17,33 ± 2,02 μM¹⁰¹. A eficácia dos compostos referidos foi comparada com a do fármaco padrão miltefosina, um análogo da fosfocolina que foi inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico para o tratamento tópico de metástases cutâneas do cancro da mama. A estrutura da miltefosina encontra-se representada na figura IV-21. Foi demonstrado que a miltefosina exibe atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*¹⁰³, tendo sido comprovado que o composto, administrado por via oral, é útil no tratamento de certas formas de leishmaniose, como a visceral e a cutânea^{104,105}.

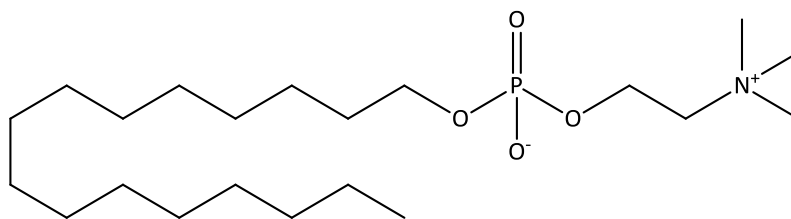
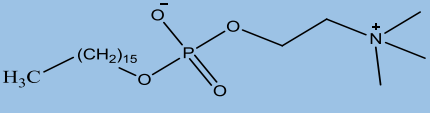
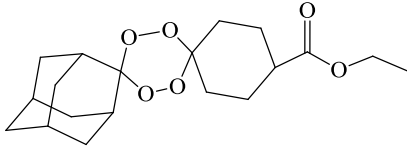
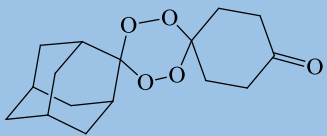
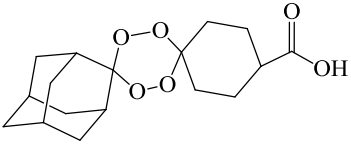


Figura IV-21: Representação da estrutura molecular da miltefosina (Adaptado de ¹⁰³).

Os tetraoxanos LC140 e LC153 apresentam atividade anti-proliferativa in vitro contra as formas amastigotas de *Leishmania donovani* (LV9) em concentrações micromolares (μM) baixas. Os valores de IC_{50} para os compostos LC140 e LC153, sobre a estirpe LV9, são da mesma ordem de grandeza dos obtidos para a miltefosina, embora ligeiramente superiores ao observado para este fármaco de referência¹⁰¹. De referir no entanto que o fármaco miltefosina apresenta toxicidade elevada para o hospedeiro humano, ao contrário dos tetraoxanos que apresentam valores de toxicidade baixos. O composto LC138 não originou diferença na proliferação parasitária. As diferenças de atividade observadas para estes 3 compostos no modelo considerado indicam claramente que o grupo substituinte afeta a performance dos compostos, podendo ser efetuado um ajuste para otimização das propriedades com base na alteração da natureza deste substituinte. Os valores de IC_{50} para os tetraoxanos testados e para o fármaco padrão miltefosina encontram-se compilados na tabela IV-1.

Tabela IV-1: Atividade anti-proliferativa dos compostos **LC138**, **LC140** e **LC153** em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania donovani* (LV9). A miltefosina foi usada como padrão (Adaptado de ¹⁰¹).

		Amastigotas <i>Leishmania donovani</i> LV9 intramacrofágicos	
Estruturas	Compostos	IC₅₀ (μM)	SD (μM)
	Miltefosina	0.71	0.20
	LC138	ND	ND
	LC140	2,52	0,65
	LC153	17,33	2,02

Encontram-se em progresso mais estudos no sentido de avaliar a atividade antiparasitária dos outros compostos propostos neste projeto científico, nomeadamente, a análise dos compostos LC157/PA5 e LC176/PA6. Estes compostos serão testados em modelos de *Leishmania* (formas amastigotas) e em modelos de *Plasmodium*. O objetivo é recolher informação sobre as estruturas mais promissoras para desenvolvimento como agentes quimioterapêuticos para a leishmaniose e também para malária.

A atividade antileishmaniose é testada no grupo de investigação do professor Philippe Loiseau, em Paris. Futuramente, tem-se como objetivo obter informação relativamente à toxicidade destes compostos, nomeadamente em relação aos valores da dose letal para 50% das células, LD₅₀. A correta otimização no *design* de moléculas

com potencial em química medicinal depende destas informações. A informação toxicológica disponível para a artemisinina e seus derivados indica que a ponte peróxido é o farmacóforo e também é responsável pela toxicidade, ou seja, o toxóforo^{106,107}. A informação recolhida neste projeto poderá contribuir para a otimização estrutural que conduza à descoberta de moléculas mais eficazes, menos tóxicas, logo mais seguras, com aplicabilidade no tratamento da leishmaniose e noutras doenças parasitárias.

V. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo é destinado à descrição de todo o trabalho experimental efetuado durante o projeto de investigação.

A caracterização dos compostos sintetizados efetuou-se recorrendo às seguintes técnicas: espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (RMN) e ponto de fusão.

A identificação de compostos já conhecidos e caracterizados foi realizada por comparação dos espectros de ressonância magnética nuclear ou de massa.

Em geral, os compostos de partida foram utilizados tal como comercialmente fornecidos. Um dos solventes usados, o metanol, foi submetido a secagem com magnésio e iodo, tendo sido seguidos os procedimentos descritos na literatura.

Quase todas as reações foram realizadas em ambiente anidro, sob uma atmosfera de azoto.

5.1. Cromatografia

O acompanhamento e controlo das reações foram efetuados por cromatografia em camada fina (“Thin Layer Chromatography”, TLC), usando placas de sílica gel e recorrendo a um sistema eluente apropriado à reação em causa.

5.2. Equipamento

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram obtidos num aparelho “Melting Point Apparatus SMP3, da Bibby Stuart Scientific”.

Os dados de análises por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de protão (H^1 -RMN) e espectrometria de massa foram fornecidos pelo serviço de análises do laboratório REQUIMTE existente no departamento de química e bioquímica da Universidade Nova de Lisboa.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (H^1 -RMN) foram traçados usando clorofórmio ou metanol deuterados como solventes. Os valores de desvio químico, δH , encontram-se de acordo com a seguinte norma: desvio químico (δ em ppm relativamente ao TMS), multiplicidade do sinal, apresentando-se como s (singuleto), sl (singuleto largo) d (duplete), dl (duplete largo), dd (duplo duplete), ddl

(duplo duplete largo), t (triplete), q (quarteto) ou m (multiplete) e constante de acoplamento (J em Hz). Os espectros foram obtidos recorrendo ao software MestReNova® V6.0.2-5475 e ChemDraw® V12.0.2.1076.

As análises por espectrometria de massa (EM) foram efetuadas num espectrómetro Micromass LCT Mass Spectrometer.

As estruturas químicas apresentadas referentes às reações realizadas foram desenhadas utilizando o software ChemDraw® V12.0.2.1076.

5.3. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas ao longo do projeto

5.3.1. Síntese do carbamato N-tert-butil-N-4-aminobutílico, composto LC64/PA1, composto (1).

Uma solução de carbonato de di-tert-butilo (5,47 g, 25 mmol) em 1,4-dioxano (25 mL), sob agitação, foi adicionada, com uma cânula, durante 3 horas, a uma solução de 1,4-diaminobutano (13,06 g; 0,15 mol) em 1,4-dioxano (25 mL). A mistura permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, à temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). Após cerca de 23 horas verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao carbonato de di-tert-butilo. Evaporou-se o solvente. Adicionou-se água e filtrou-se. O filtrado foi extraído com DCM (5 x 30 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo transparente (3,00g; 0,016 mol; 64%). ¹H RMN (400MHz; CDCl₃) ppm: δ 1.37 (s, 9H), 1.44 (s, 4H), 2.66 (s, 2H), 3.04 (s, 2H). MS (MALDI-TOF) m/z: [M⁺] Calculado para C₉H₂₀N₂O₂: 188,15; Encontrado: 189,17 [M+H]⁺.

5.3.2. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC138/PA2, composto (2)

A uma solução, arrefecida até aos 0°C, de ciclo éster (2,80 mL; 17,6 mmol) em acetonitrilo (35 mL), sob agitação, adicionou-se muito lentamente ácido fórmico (22,2 mL) e peróxido de hidrogénio (50%, 12 mL). A mistura permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (4:6). Após cerca de 20 horas evaporou-se até à secura. Esta mistura (A) é dissolvida em DCM (30 mL). A adamantanona (4,00 g;

26,7 mmol) foi dissolvida em DCM (20 mL), e arrefecida a 0°C. Adicionou-se BHF₄ (0.28 mL; 4,4 mmol) e deixou-se a reagir durante aproximadamente 15 min (balão B). A mistura (A) foi adicionada muito lentamente ao balão B. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 48 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (4:6). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9), para separar os componentes orgânicos. Obteve-se o produto desejado, um sólido branco (2.67g; 7,6 mmol, 43%). Ponto de fusão: 74-75°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.25 (s, 3H), 1.74-2.11 (m, 21H), 3.08 (t, 2H, J=5.8Hz), 4.48 (m, 2H). MS (MALDI-TOF): m/z [M⁺] Calculado para C₁₉H₂₈O₆: 352,19; Encontrado: 393,47 [M+K]⁺.

5.3.3. Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano LC140/PA3, composto (3)

A uma solução de adamantanona (2,00 g, 13,3 mmol) em ACN (25 mL), arrefecida até aos 0°C, sob agitação, adicionou-se muito lentamente ácido fórmico (15 mL) e peróxido de hidrogénio (50%, 8 mL). A mistura permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (4:6). Após cerca de 3 horas evaporou-se até à secura. Esta mistura (A) foi dissolvida em DCM (10 mL). 1,4-Ciclohexadiona (1,507 g, 13,4 mmol) foi dissolvido em DCM (30 mL), e a solução resultante foi arrefecida a 0°C. Adicionou-se BHF₄ (1,82 mL, 28,6 mmol) e deixou-se a reagir durante aproximadamente 15 min (balão B). A mistura (A) foi adicionada muito lentamente ao balão B. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 30 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9) para separar os componentes orgânicos. Obteve-se o produto desejado, um sólido (2,00g; 6,78 mmol; 51%). Ponto de fusão: 156-158°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.67 (s, 5H), 1.85-2.04 (m, 14H), 3.01 (t, 3H, J=5.8Hz). MS (MALDI-TOF): m/z Calculado para C₁₆H₂₂O₅: 294,15; Encontrado: 318,28 [M+Na]⁺.

5.3.4. Síntese do ácido carboxílico LC153/PA4, composto (4)

Dissolveu-se o éster (1 g; 2.84 mmol) em metanol (30 mL) e adicionou-se uma solução de KOH (3M). A reação permaneceu a 40°C, sob agitação. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Após 24 horas de reação, verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao éster. A extração do composto foi efetuada com DCM (2 x 30 mL). Acidificou-se o pH até ao valor de 1 e extraiu-se novamente com DCM (2 x 30 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (8,5:1,5) como mistura de eluição. Obteve-se um sólido beije (0,83g; 0,256 mmol; 90%). Ponto de fusão: 179-182°C. MS (EI), m/z Calculado para C₁₇H₂₄O₆: 324,16; Encontrado: 359.33 [M+Cl]⁻.

5.3.5. Síntese do derivado amina, LC157/PA5, composto (5)

Dissolveu-se o carbonilo (1,00 g; 3,4 mmol) em 1,2-dicloroetano (DCE, 15mL), adicionou-se a amina (0.784g; 4,2 mmol), ácido acético (AcOH, 0,5 mL) e triacetoxiborohidreto de sódio (NaBH(OAc)₃; 2.634 g; 12,4 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu num banho a 60°C, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 3 dias. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). No final da reação evaporou-se o solvente alcalinizou-se o meio com uma solução de NaOH (pH=13-14) e efetuou-se uma extração com DCM (2 x 30 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente até à secura. Recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7) para separar os componentes orgânicos. Obteve-se um óleo (0,169g; 0,362 mmol; 11%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (s, 16H), 1.49-1.98 (m, 13H), 2.07 (s, 2H, J=5.8Hz), 2.94 (t, 2H, J=7.2Hz), 3.10 (t, 2H, J=9.6Hz), 3.27 (m, 1H). MS (MALDI-TOF): m/z Calculado para C₂₅H₄₂N₂O₆: 466,30; Encontrado: 502,45 [M+Cl]⁻.

5.3.6. Síntese do derivado amida, LC176/PA6, composto (6)

Dissolveu-se o ácido carboxílico (0,696g; 2,1 mmol), EDC (0.647g; 4,2 mmol) e HOBt (0,434g; 3,2 mmol) em DCM (10 mL) e N-metilmorfolina (0.37 ml; 3,3 mmol) Deixou-se a mistura sob agitação e controlou-se a reação durante cerca de 4 horas, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), até ao desaparecimento da mancha correspondente ao ácido carboxílico. Adicionou-se a amina LC64/PA1 (0,593 g; 3.15 mmol) dissolvida em DCM (10 mL) à mistura anterior, muito lentamente. A mistura reacional permaneceu sob agitação, em atmosfera de azoto, durante cerca de 72 horas. Controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (2:8), até ao aparecimento da mancha correspondente ao produto. Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (9:1) como mistura de eluição. Obteve-se um sólido (0,6 g; 1,214 mmol; 54%). Ponto de fusão: 110-112°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.19 (s, 9H), 1.34-1.40 (m, 6H), 1.98-2.04 (m, 5H), 2.16-2.20 (m, 5H), 2.28-2.35 (m, 6H), 2.41-2.46 (m, 5H), 2.75 (t, 4H, J=9.5Hz), 4.15 (t, 2H, J=5.9Hz). MS (MALDI-TOF): m/z Calculado para C₂₆H₄₂N₂O₇ 494,30; Encontrado a 519,31 [M+Na]⁺.

VI. CONCLUSÃO

As terapêuticas existentes contra a malária têm-se revelado ineficazes, dado que a emergência de resistências por parte do *P. falciparum* é cada vez maior. Deste modo, a busca de novos fármacos passíveis de serem utilizados em monoterapia ou em regimes de combinação é fundamental para contornar este fenómeno de seleção de resistências. O OZ439 e o RKA 182, um trioxolano e um tetraoxano, respetivamente, estão em fase final de ensaios clínicos para determinar se podem ser utilizados em protocolos de quimioterapia da malária, devido às suas excelentes características farmacológicas. Acresce que estes compostos apresentam baixos custos de produção quando comparados com a artemisinina.

Foi referido ao longo desta dissertação que os tetraoxanos podem ser explorados como potenciais candidatos para o tratamento de várias doenças negligenciadas. O potencial farmacológico dos tetraoxanos impulsionou a otimização de estratégias de síntese de novos derivados, de forma a ampliar as bibliotecas de novos compostos para estudos de atividade farmacológica e possibilitar a identificação de novos candidatos a fármacos.

Nesta dissertação apresentou-se uma revisão bibliográfica relativa aos fundamentos teóricos e metodologias da síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos publicados nas últimas décadas.

A contribuição dos 1,1-dihidroperóxidos (DHPs) na síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos é muito importante pelo que a otimização da síntese destes compostos intermédios garante a eficiência para posterior desenvolvimento de um novo método de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos.

Os métodos atualmente disponíveis para a síntese dos tetraoxanos são baseados no uso de catalisadores para garantir o acoplamento do dihidroperóxido intermédio para formação do tetraoxano. Procurou-se ver quais os mais adequados para a síntese de tetraoxanos assimétricos, visto estes serem os que apresentam maior atividade antiparasitária e também por oferecerem mais oportunidades para a incorporação seletiva de vários grupos funcionais na molécula-alvo, como na incorporação de outros farmacóforos, originando as moléculas híbridas que são menos vulneráveis a resistências adaptativas.

A otimização das condições de reação é fundamental para garantir um rendimento aceitável, pelo que o controlo adequado do tipo de substratos, solventes, catalisadores específicos e do pH é extremamente importante. Dos vários métodos descritos para a síntese destes endoperóxidos, os mais comuns e eficazes são os que usam como catalisadores os reagentes Re_2O_7 e MTO. Porém, estes métodos apresentam como principal desvantagem o elevado custo dos catalisadores. Recentemente têm sido apresentadas novas propostas mais económicas, como o uso de iodo molecular, porém existem algumas restrições neste método de síntese. A descoberta do potencial de PMA como catalisador para a síntese de tetraoxanos foi muito importante. Em comparação com outros catalisadores utilizados neste tipo de síntese, como Re_2O_7 e MTO, o PMA é menos dispendioso. Também é substancialmente mais estável e fácil de manusear. Além disso, a tolerância relatada na síntese de DHPs com vários grupos funcionais deve promover o uso deste método num futuro próximo.

No âmbito deste trabalho também foram preparados vários tetraoxanos, tendo sido alguns testados *in vitro* em linhagens de *Leishmania donovani*, cuja eficácia foi comparada com o fármaco padrão miltefosina. De entre os compostos preparados, destacam-se os tetraoxanos LC137 e LC140, apresentando valores de IC_{50} na região μM baixa, embora ligeiramente superiores ao observado para a miltefosina, sendo, os resultados obtidos, da mesma ordem de grandeza dos obtidos para este fármaco de referência. As diferenças de atividade observadas para estes compostos no modelo considerado indicam claramente que o grupo substituinte afeta a *performance* dos compostos, indicando que pode ser efetuado um ajuste para otimização das propriedades com base na alteração da natureza deste substituinte. Embora interessantes, os resultados obtidos fornecem apenas informação preliminar, havendo por isso necessidade de mais investigações para esclarecer as características intrínsecas à atividade antileishmaniose destes compostos.

Encontram-se em progresso mais estudos no sentido de avaliar a atividade antiparasitária dos outros compostos propostos neste projeto científico, nomeadamente, a análise dos compostos LC157/PA5 e LC176/PA6, em modelos de *Leishmania* (formas amastigotas) e em modelos de *Plasmodium*. O objetivo é recolher informação sobre as estruturas mais promissoras para posterior desenvolvimento como agentes quimioterapêuticos para a leishmaniose e também para a malária. A

correta otimização no *design* de moléculas com potencial em química medicinal depende destas informações.

Futuramente na síntese destes compostos também se pretende avaliar qual será o melhor método de síntese para garantir um maior rendimento de reação destes compostos. A utilização de R_2O_7 e MTO como catalisadores na reação são boas apostas, porém, a melhor opção poderá ser a utilização do PMA ou I_2 como catalisador, devido ao seu baixo custo e boa eficácia, cumprindo os principais objetivos da otimização de moléculas-alvo para o tratamento de doenças negligenciadas como a garantia da sua síntese a partir de reagentes comercialmente disponíveis e baratos.

Novos métodos de síntese têm sido desenvolvidos para a preparação desta classe de compostos, indicando que a descoberta de novos tetraoxanos mais potentes e com grande acessibilidade na sua síntese será uma realidade nos próximos anos.

As observações aqui descritas permitem antever que os endoperóxidos sintéticos, principalmente no caso dos tetraoxanos, vão, no futuro, desempenhar um papel preponderante no combate a várias doenças negligenciadas, possibilitando o acesso a terapêuticas eficazes e seguras às populações mais pobres e mais afetadas por estas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Malaria. em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>
2. OMS. Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2014. em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/>
3. Prevention, C.-C. for D. C. and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. em <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>
4. Weatherall, D. J. *et al.* Malaria and the red cell. *Hematology* **1**, 35–57 (2002).
5. Rosenthal, P. J. Proteases of malaria parasites: New targets for chemotherapy. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 49–57 (1998).
6. Ashley, E. a *et al.* Spread of Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N. Engl. J. Med.* **371**, 411–423 (2014).
7. Dondorp, A. M. & Ringwald, P. Artemisinin resistance is a clear and present danger. *Trends Parasitol.* **29**, 359–360 (2013).
8. Sahu, N. K., Sahu, S. & Kohli, D. V. Novel molecular targets for antimalarial drug development. *Chem. Biol. Drug Des.* **71**, 287–297 (2008).
9. Rudrapal, M. A brief review on malaria and current antimalarial drugs. *Curr. Pharma Res.* **1**, 286–292 (2011).
10. Kumar, V., Mahajan, A. & Chibale, K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 2236–2275 (2009).
11. Muregi, F. W. & Ishih, A. Next-generation antimalarial drugs: Hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Dev. Res.* **71**, 20–32 (2010).
12. Osswald W, Caramona M, Esteves AP, Gonçalves J, Macedo T, M. J. *Prontuário Terapêutico 2013*. (INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Ministério de Saúde, 2013), p. 73.
13. Katzung, S. B. M. A. T. B. G. *Katzung's Basic & Clinical Pharmacology*. (McGraw-Hill Medical, 2012), p. 42 e 810.
14. Butler, A. R. & Wu, Y.-L. Artemisinin (qinghaosu): a new type of antimalarial drug. *Chem. Soc. Rev.* **21**, 85 (1992).

15. O'Neill, P. M. & Posner, G. H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J. Med. Chem.* **47**, 2945–2964 (2004).
16. Meshnick, S. R., Taylor, T. E. & Kamchonwongpaisan, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **60**, 301–315 (1996).
17. Ho, W. E., Peh, H. Y., Chan, T. K. & Wong, W. S. F. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacol. Ther.* **142**, 126–139 (2014).
18. Ploypradith, P. Development of artemisinin and its structurally simplified trioxane derivatives as antimalarial drugs. *Acta Trop.* **89**, 329–342 (2004).
19. Tang, Y., Dong, Y. & Vennerstrom, J. L. Synthetic peroxides as antimalarials. *Med. Res. Rev.* **24**, 425–448 (2004).
20. O'Neill, P. M., Barton, V. E. & Ward, S. a. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. *Molecules* **15**, 1705–1721 (2010).
21. Posner, G. H. & O'Neill, P. M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc. Chem. Res.* **37**, 397–404 (2004).
22. Olliaro, P. L., Haynes, R. K., Meunier, B. & Yuthavong, Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends Parasitol.* **17**, 122–126 (2001).
23. Krishna, S., Pulcini, S., Moore, C. M., Teo, B. H. Y. & Staines, H. M. Pumped up: Reflections on PfATP6 as the target for artemisinins. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 4–11 (2014).
24. Egan, T. J. Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets* **2**, 115–124 (2003).
25. Pandey, A. V. *et al.* Hemozoin formation in malaria: A two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 736–743 (2003).
26. Van Agtmael, M. a., Eggelte, T. a. & Van Boxel, C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: From medicinal herb to registered medication. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 199–205 (1999).

27. Haynes, R. K. & Krishna, S. Artemisinins: Activities and actions. *Microbes Infect.* **6**, 1339–1346 (2004).
28. Haynes, R. K. *et al.* The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: The unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *ChemMedChem* **2**, 1480–1497 (2007).
29. Robert, A. & Meunier, B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? *Chem. Soc. Rev.* **27**, 273 (1998).
30. Meunier, B. & Robert, A. Heme as Trigger and Target for Trioxane-Containing Antimalarial Drugs. *Acc. Chem. Res.* **43**, (2010).
31. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2**, 944–986 (2007).
32. Li, J. & Zhou, B. Biological actions of artemisinin: Insights from medicinal chemistry studies. *Molecules* **15**, 1378–1397 (2010).
33. Robert, A., Benoit-Vical, F. & Meunier, B. The key role of heme to trigger the antimalarial activity of trioxanes. *Coord. Chem. Rev.* **249**, 1927–1936 (2005).
34. Marti, F. *et al.* Second generation analogues of RKA182: synthetic tetraoxanes with outstanding in vitro and in vivo antimalarial activities. *Med. Chem. Commun* **2**, 661–665 (2011).
35. Vennerstrom, J. L. *et al.* Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **430**, 900–904 (2004).
36. Opsenica, D. M. & Šolaja, B. A. Antimalarial peroxides. *J. Serbian Chem. Soc.* **74**, 1155–1193 (2009).
37. Tang, Y. *et al.* Weak base dispiro-1,2,4-trioxolanes: Potent antimalarial ozonides. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **17**, 1260–1265 (2007).
38. Kumar, N., Singh, R. & Rawat, D. S. Tetraoxanes: synthetic and medicinal chemistry perspective. *Med. Res. Rev.* **32**, 581–610 (2010).
39. Dong, Y. *et al.* Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides: Charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes. *J. Med. Chem.* **48**, 4953–4961 (2005).

40. Vennerstrom, Jonathan; Chollet, Jacques; Dong, Yuxiang; Matile, Hugues; Padmanilayam, Maniyan; Tang, Yuanqing; Charman W. Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials. Switzerland; PCT/US02/19767, 2003.
41. Dong, Y. *et al.* Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 6368–6382 (2006).
42. Garah, F. B. *et al.* Comparison of the Reactivity of Antimalarial 1 , 2 , 4 , 5-Tetraoxanes with 1 , 2 , 4-Trioxolanes in the Presence of Ferrous Iron Salts , Heme , and Ferrous Iron Salts / Phosphatidylcholine. *J. Med. Chem.* **54**, 6443–6455 (2011).
43. Dong, Y. *et al.* The structure - Activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277). *J. Med. Chem.* **53**, 481–491 (2010).
44. Charman, S. a *et al.* Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4400–4405 (2011).
45. Hartwig, C. L. *et al.* Investigating the antimalarial action of 1,2,4-trioxolanes with fluorescent chemical probes. *J. Med. Chem.* **54**, 8207–8213 (2011).
46. O'Neill, P. M. *et al.* Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 5693–7 (2010).
47. Olliaro, P. & Wells, T. N. C. The global portfolio of new antimalarial medicines under development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **85**, 584–595 (2009).
48. Ellis, G. L. *et al.* Two-step synthesis of achiral dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes with outstanding antimalarial activity, low toxicity, and high-stability profiles. *J. Med. Chem.* **51**, 2170–2177 (2008).
49. Amewu, R. *et al.* Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes; synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 4431–4436 (2006).
50. Kim, H. S. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of novel medium-sized 1,2,4,5-tetraoxacycloalkanes. *J. Med. Chem.* **44**, 2357–2361 (2001).
51. Opsenica, D. *et al.* Antimalarial and antiproliferative evaluation of Bis-Steroidal tetraoxanes. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2761–2768 (2003).

52. Opsenica, D., Kyle, D. E., Milhous, W. K. & Olaja, B. A. Antimalarial , antimycobacterial and antiproliferative activity of phenyl substituted mixed tetraoxanes. *J. Serbian Chem. Soc.* **68**, 291–302 (2003).
53. Meister, I. *et al.* Efficacy and pharmacokinetics of OZ78 and MT04 against a natural infection with *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet. Parasitol.* **198**, 102–110 (2013).
54. Cowan, N., Yaremenko, I. a., Krylov, I. B., Terent'ev, A. O. & Keiser, J. Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine derivatives against *Schistosoma mansoni*. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 5175–5181 (2015).
55. Neglected Diseases. em <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>
56. Liese, B. H., Houghton, N. & Teplitskaya, L. Development assistance for neglected tropical diseases: progress since 2009. *Int. Health* **6**, 162–171 (2014).
57. Segundo Relatório da OMS sobre Doenças Tropicais Negligenciadas. em <http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>
58. Goupil, L. S. & McKerrow, J. H. Introduction: Drug Discovery and Development for Neglected Diseases. *Chem. Rev.* **114**, 11131–11137 (2014).
59. Portela, J. *et al.* Antischistosomal activity of trioxaquines: In vivo efficacy and mechanism of action on *schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 1–18 (2012).
60. Terent'ev, a. O., Borisov, D. a. & Yaremenko, I. a. General methods for the preparation of 1,2,4,5-tetraoxanes - Key structures for the development of peroxidic antimalarial agents. *Chem. Heterocycl. Compd.* **48**, 55–58 (2012).
61. Kim, H. S. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of cyclic peroxides, 1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetroxanes. *J. Med. Chem.* **42**, 2604–2609 (1999).
62. Fisher, L. C. & Blackie, M. A. L. Tetraoxanes as Antimalarials : Harnessing the Endoperoxide. *Mini-Reviews Med. Chem.* **14**, 123–135 (2014).
63. Opsenica, I., Opsenica, D., Smith, K. S., Milhous, W. K. & Šolaja, B. A. Chemical Stability of the Peroxide Bond Enables Diversified Synthesis of Potent Tetraoxane. *J. Med. Chem.* **51**, 2261–2266 (2008).

64. Amewu, R. *et al.* Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes; synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 4431–4436 (2006).
65. Dong, Y. *et al.* Comparative antimalarial activities of six pairs of 1,2,4,5-tetraoxanes (peroxide dimers) and 1,2,4,5,7,8-hexaoxonanes (peroxide trimers). *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3033–3035 (2007).
66. Žmitek, K., Zupan, M., Stavber, S. & Iskra, J. The effect of iodine on the peroxidation of carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **72**, 6534–6540 (2007).
67. Terent'ev, A. O. *et al.* Synthesis of peroxide compounds by the BF₃-catalyzed reaction of acetals and enol ethers with H₂O₂. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **53**, 681–687 (2004).
68. Žmitek, K., Zupan, M., Stavber, S. & Iskra, J. Iodine as a catalyst for efficient conversion of ketones to gem-dihydroperoxides by aqueous hydrogen peroxide. *Org. Lett.* **8**, 2491–2494 (2006).
69. Hamann, H. J., Hecht, M., Bunge, A., Gogol, M. & Liebscher, J. Synthesis and antimalarial activity of new 1,2,4,5-tetroxanes and novel alkoxy-substituted 1,2,4,5-tetroxanes derived from primary gem-dihydroperoxides. *Tetrahedron Lett.* **52**, 107–111 (2011).
70. Solaja, B. A. *et al.* Mixed steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes: Antimalarial and antimycobacterial activity. *J. Med. Chem.* **45**, 3331–3336 (2002).
71. Iskra, J., Bonnet-Delpon, D. & Bégué, J.-P. One-pot synthesis of non-symmetric tetraoxanes with the H₂O₂/MTO/fluorous alcohol system. *Tetrahedron Lett.* **44**, 6309–6312 (2003).
72. Terent'ev, A. O., Borisov, D. a, Vil', V. a & Dembitsky, V. M. Synthesis of five- and six-membered cyclic organic peroxides: Key transformations into peroxide ring-retaining products. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 34–114 (2014).
73. Neimann, K. & Neumann, R. Electrophilic activation of hydrogen peroxide: selective oxidation reactions in perfluorinated alcohol solvents. *Org. Lett.* **2**, 2861–2863 (2000).
74. Kumar, N., Khan, S. I., Sharma, M., Atheaya, H. & Rawat, D. S. Iodine-catalyzed one-pot synthesis and antimalarial activity evaluation of symmetrically and asymmetrically substituted 3,6-diphenyl[1,2,4,5]tetraoxanes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1675–1677 (2009).

75. Das, B., Krishnaiah, M., Veeranjanyulu, B. & Ravikanth, B. A simple and efficient synthesis of gem-dihydroperoxides from ketones using aqueous hydrogen peroxide and catalytic ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Lett.* **48**, 6286–6289 (2007).
76. Ghorai, P. & Dussault, P. H. Broadly applicable synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Org. Lett.* **11**, 213–216 (2009).
77. Ghorai, P. & Dussault, P. H. Mild and efficient Re(VII)-catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides. *Org. Lett.* **10**, 4577–4579 (2008).
78. Tadpetch, K. & Rychnovsky, S. D. Rhenium (VII) Catalysis of Prins Cyclization Reactions. *Org. Lett.* **10**, 4839–4842 (2008).
79. Li, Y., Hao, H., Zhang, Q. & Wu, Y. A Broadly Applicable Mild Method for the Synthesis of gem -Diperioxides from Corresponding Ketones or 1,3-Dioxolanes. *Org. Lett.* **11**, 1615–1618 (2009).
80. Nagaiah, K., Sreenu, D., Rao, R. S., Vashishta, G. & Yadav, J. S. Phosphomolybdic acid-catalyzed efficient one-pot three-component aza-Diels-Alder reactions under solvent-free conditions: a facile synthesis of trans-fused pyrano- and furanotetrahydroquinolines. *Tetrahedron Lett.* **47**, 4409–4413 (2006).
81. Yan, X., Chen, J., Zhu, Y. T. & Qiao, C. Phosphomolybdic acid catalyzed synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Synlett* **19**, 2827–2830 (2011).
82. Khosravi, K. & Weaver, G. Cesium nitrate: As an efficient catalyst for synthesis of gem -dihydroperoxides from aldehydes and ketones using aqueous 30% H₂O₂. *Cogent Chem.* **1**, 1–9 (2015).
83. Terent'ev, A. O. *et al.* Phosphomolybdic and phosphotungstic acids as efficient catalysts for the synthesis of bridged 1,2,4,5-tetraoxanes from β -diketones and hydrogen peroxide. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 2613–2623 (2013).
84. Creek, D. J. *et al.* Iron-Mediated Degradation Kinetics of Substituted Dispiro-1,2,4-trioxolane Antimalarials. *J. Pharm. Sci.* **96**, 2945–2956 (2007).
85. Davis, A. J., Murray, H. W. & Handman, E. Drugs against leishmaniasis: A synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol.* **20**, 73–76 (2004).
86. Rajasekaran, R. & Chen, Y.-P. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov. Today* **20**, 958–968 (2015).

87. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. & Siqueira-Neto, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2**, 11–19 (2012).
88. Esavand Heydari, F., Ghaffarifa, F., Soflaei, S. & Dalimi, A. Comparison Between in Vitro Effects of Aqueous Extract of *Artemisia seiberi* and Artemisinin on *Leishmania major*. *Pharm. Prod.* **8**, 70–75 (2013).
89. Chollet, C., Crousse, B., Bories, C., Bonnet-Delpon, D. & Loiseau, P. M. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* **62**, 462–465 (2008).
90. Cortes, S. *et al.* In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to Artemisinin derivatives and selected trioxolanes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5032–5035 (2015).
91. Abdel-Magid, A. F. & Mehrman, S. J. A Review on the Use of Sodium Triacetoxyborohydride in the Reductive Amination of Ketones and Aldehydes. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 971–1031 (2006).
92. Carlson, M. W., Ciszewski, J. T., Bhatti, M. M., Swanson, W. F. & Wilson, A. M. A Simple Secondary Amine Synthesis: Reductive Amination Using Sodium Triacetoxyborohydride. *J. Chem. Educ.* **77**, 270–271 (2000).
93. Abdel-Magid, A. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. a. & Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.* **61**, 3849–3862 (1996).
94. Valeur, E. & Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 606–631 (2009).
95. Jursic, B. S. & Zdravkovski, Z. A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture. *Synth. Commun.* **23**, 2761–2770 (1993).
96. Gotor, V. Non-conventional hydrolase chemistry: Amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorganic Med. Chem.* **7**, 2189–2197 (1999).
97. Van Rantwijk, F., Hacking, M. a. P. J. & Sheldon, R. a. Lipase-catalyzed synthesis of carboxylic amides: Nitrogen nucleophiles as acyl acceptor. *Monatshefte für Chemie* **131**, 549–569 (2000).

98. Han, S. Y. & Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **60**, 2447–2467 (2004).
99. Carpino, L. a. & El-Faham, A. The diisopropylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly. *Tetrahedron* **55**, 6813–6830 (1999).
100. Montalbetti, C. a G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
101. Cabral, L., Cojean, S., Loiseau, P. M. & Cristiano, L. S. Synthesis and anti-leishmanial activity of selected tetraoxanes. Poster: Referência P289 (2015).
102. Prevention, C.-C. for D. C. and. CDC - Leishmaniasis. em <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>
103. Carneiro, G., Aguiar, M. G., Fernandes, A. P. & Ferreira, L. A. M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 1083–1097 (2012).
104. Soto, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1266–1272 (2004).
105. Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K. & Rai, M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, S26–33 (2006).
106. Meshnick, S. R. Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1655–1660 (2002).
107. Gordi, T. & Lepist, E. I. Artemisinin derivatives: Toxic for laboratory animals, safe for humans? *Toxicol. Lett.* **147**, 99–107 (2004).

VIII. ANEXOS

7.1. Espectros do composto (1)

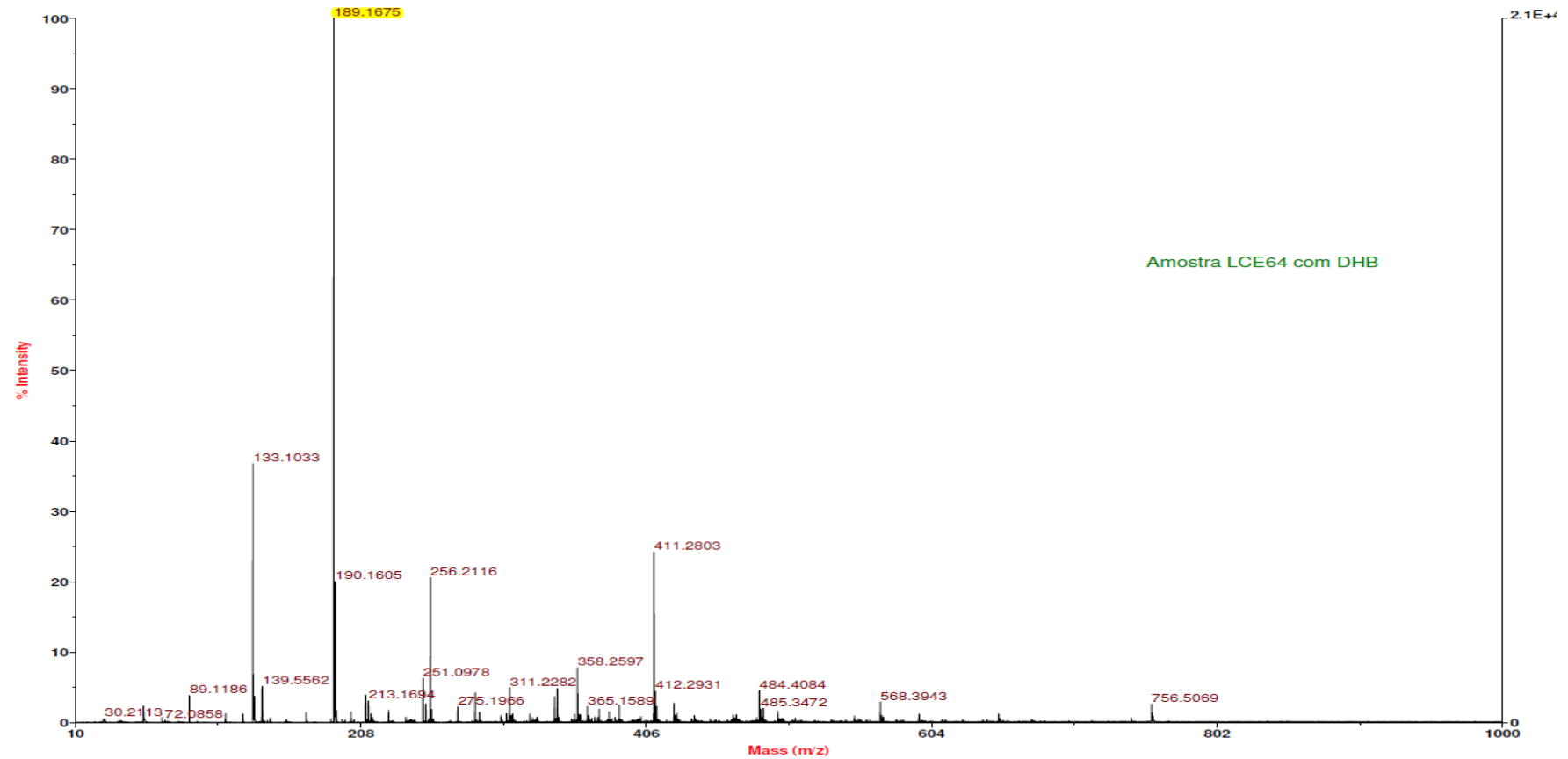


Figura VIII-1: Espectro de massa obtido para o composto (1).

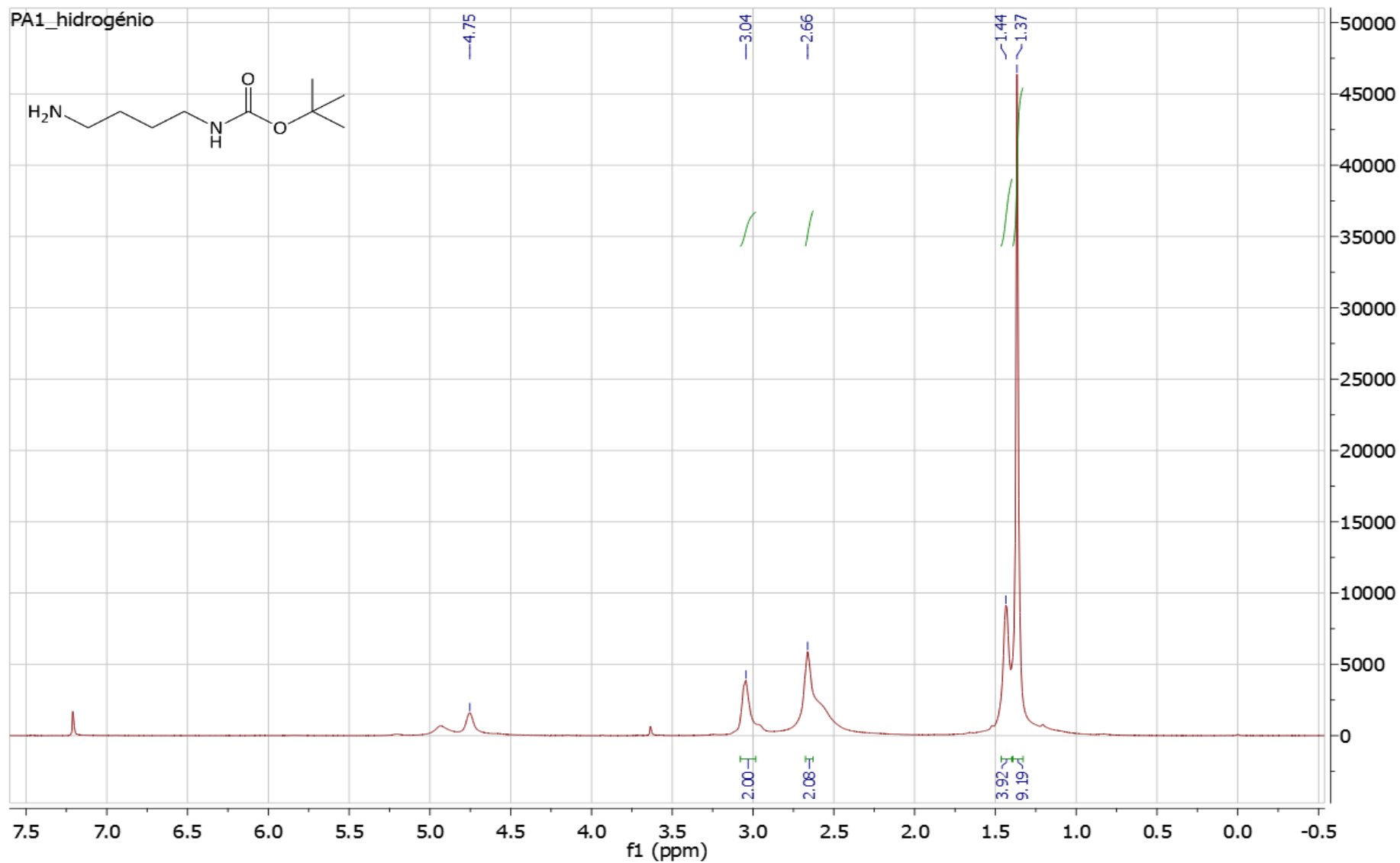


Figura VIII-2: Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto (1).

7.2. Espectros do composto (2)

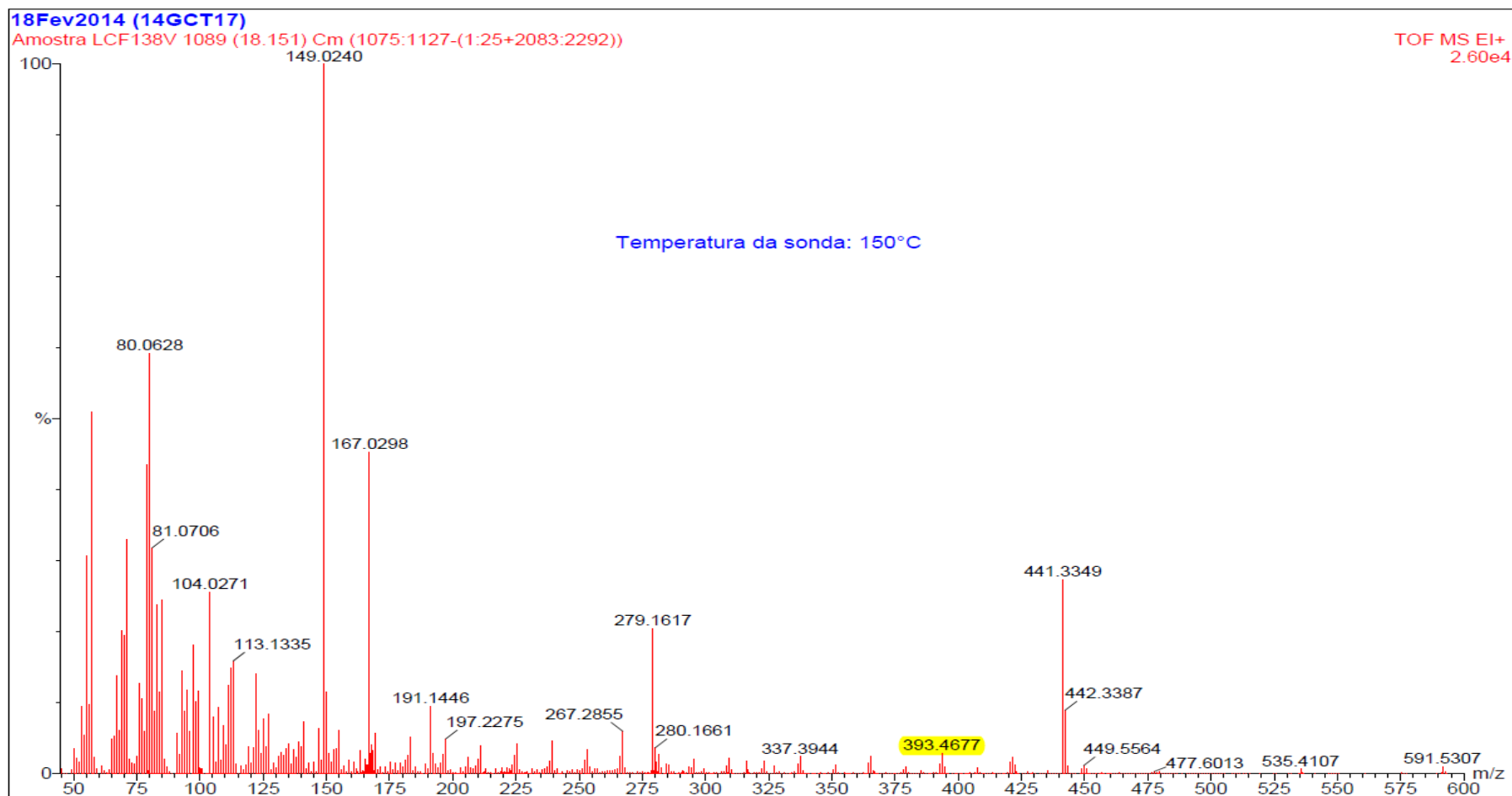


Figura VIII-3: Espectro de massa obtido para o composto (2).

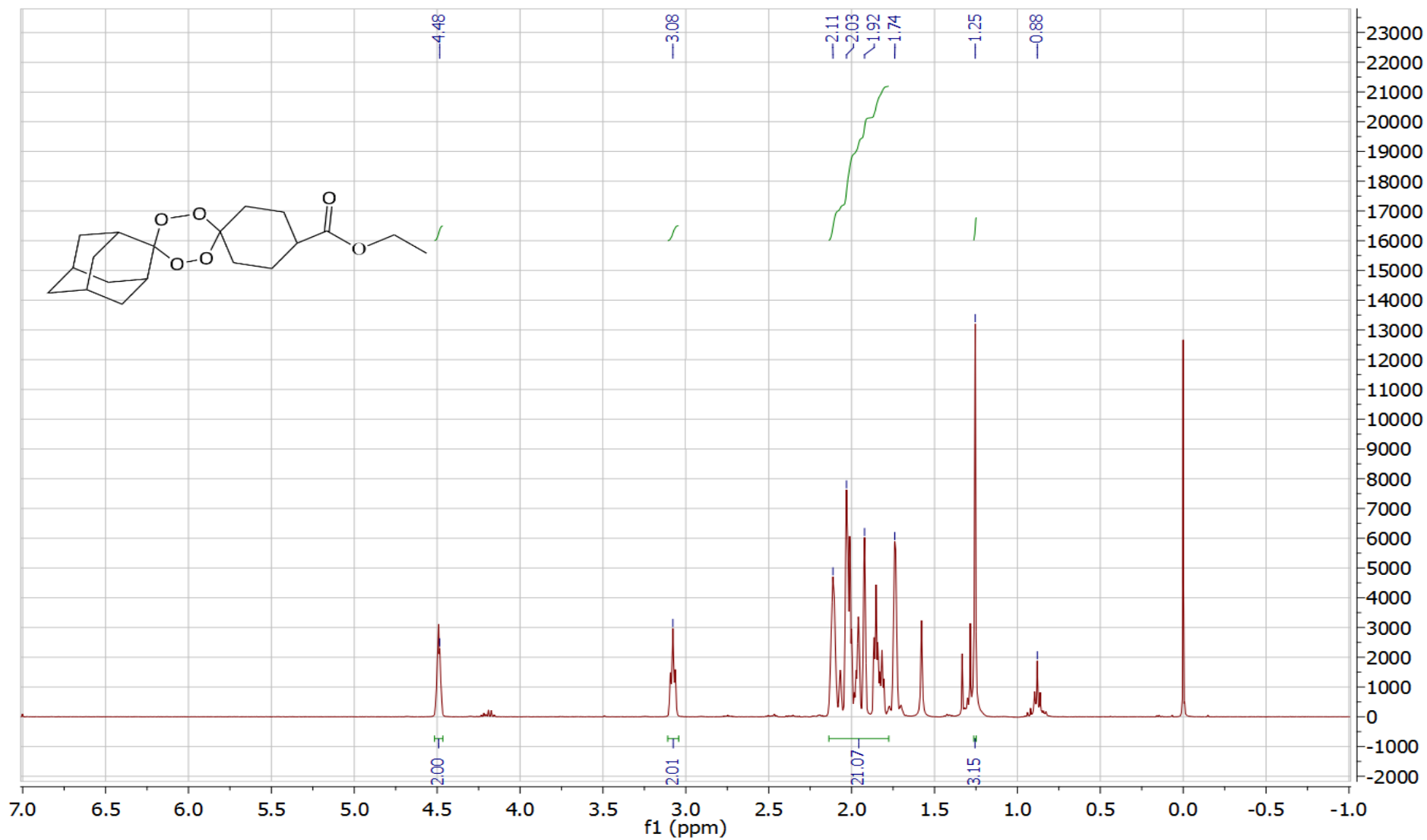


Figura VIII-4: Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (2).

7.3. Espectros do composto (3)

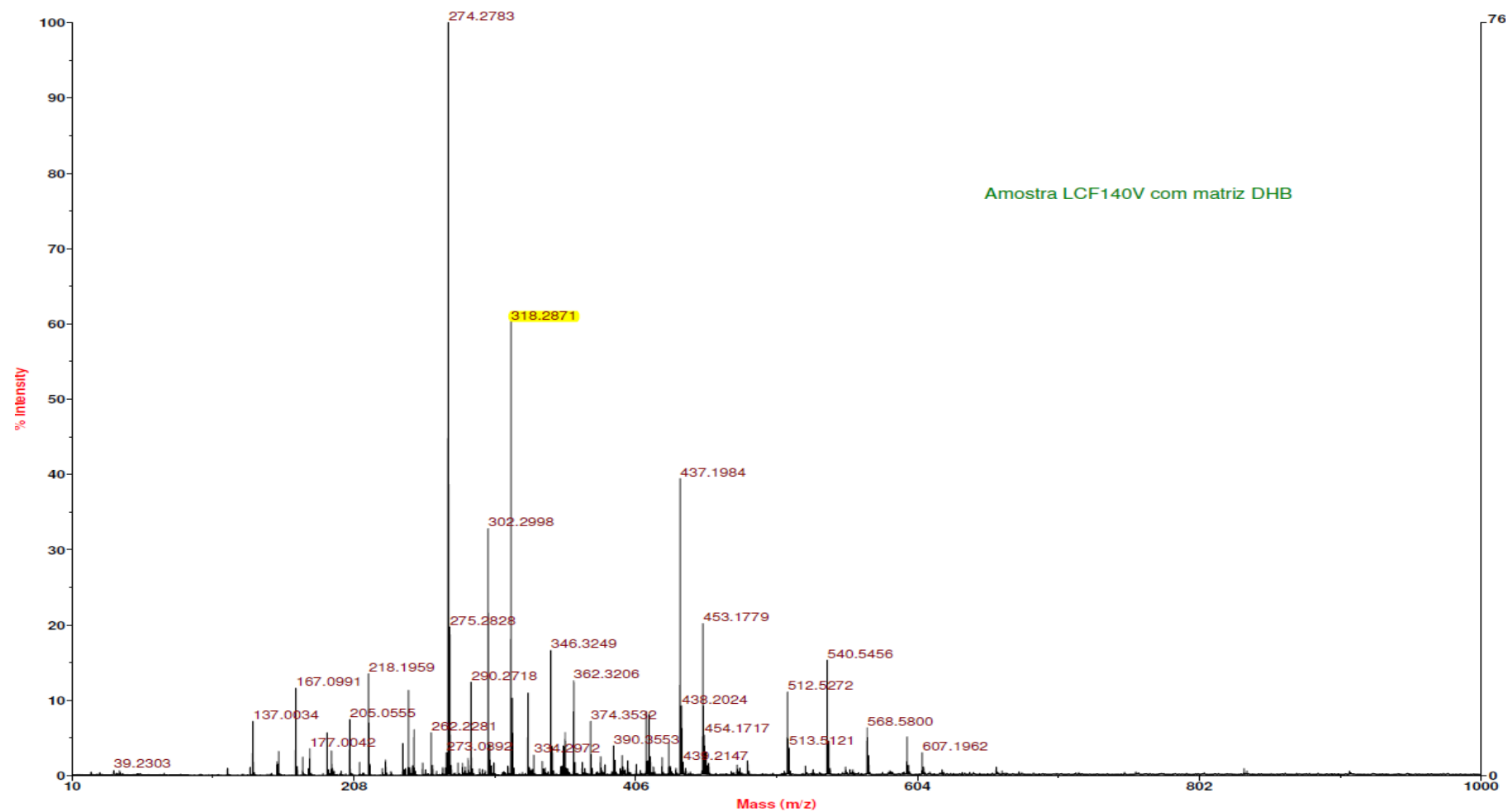


Figura VIII-5: Espectro de massa obtido para o composto (3).

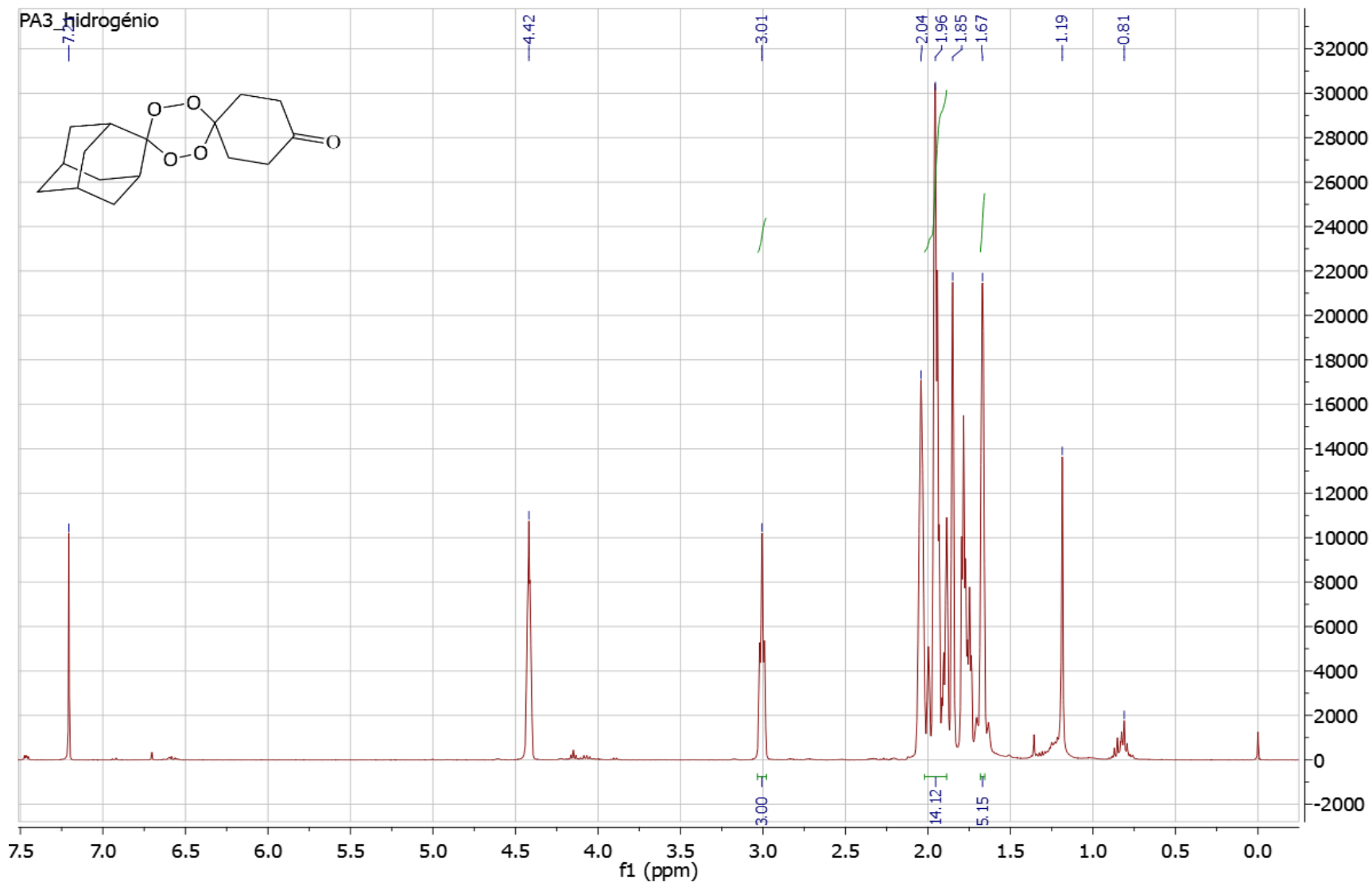


Figura VIII-6: Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (3).

7.4. Espectro do composto (4)

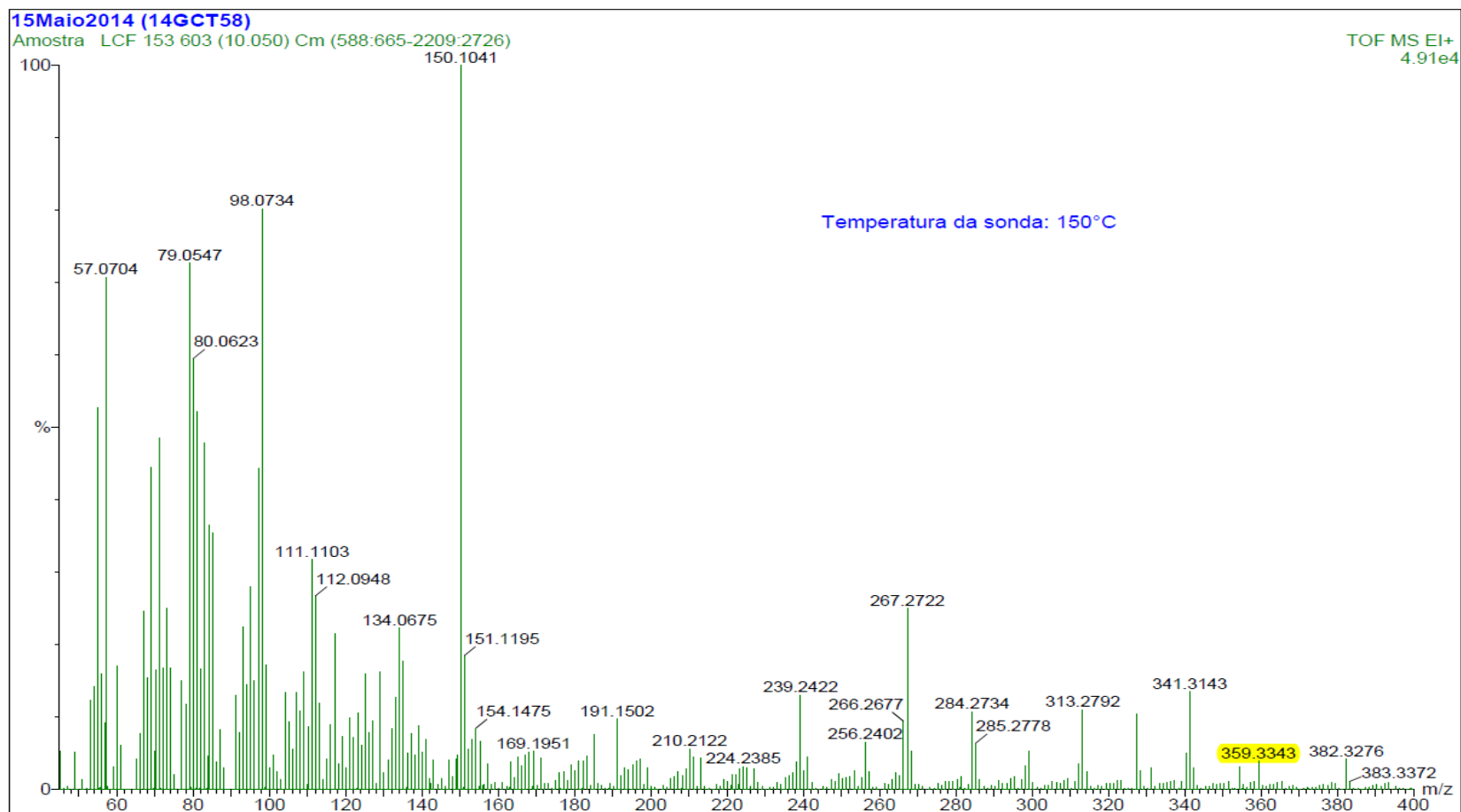


Figura VIII-7: Espectro de massa obtido para o composto (4).

7.5. Espectros do composto (5)

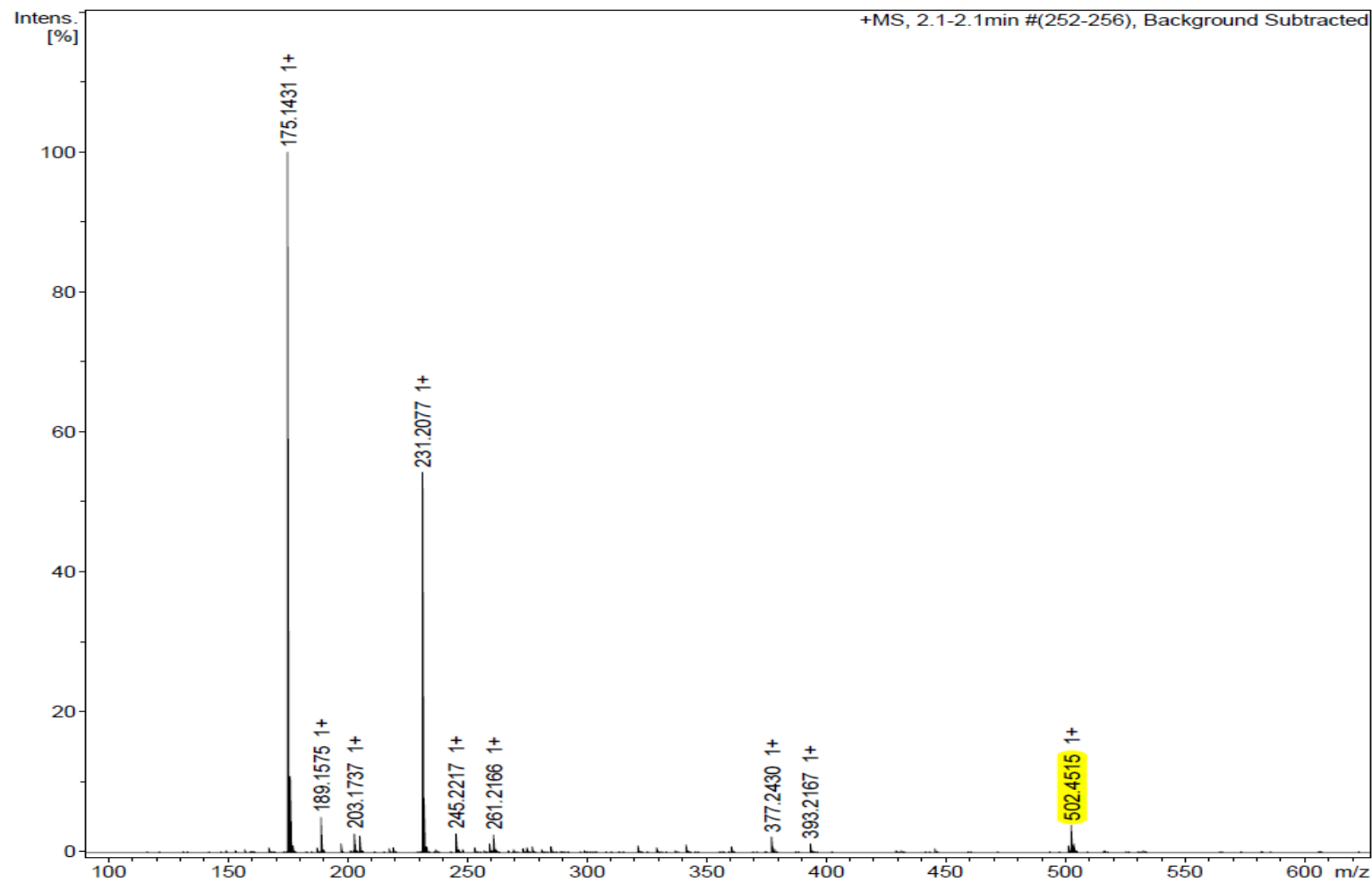


Figura VIII-8: Espectro de massa obtido para o composto (5).

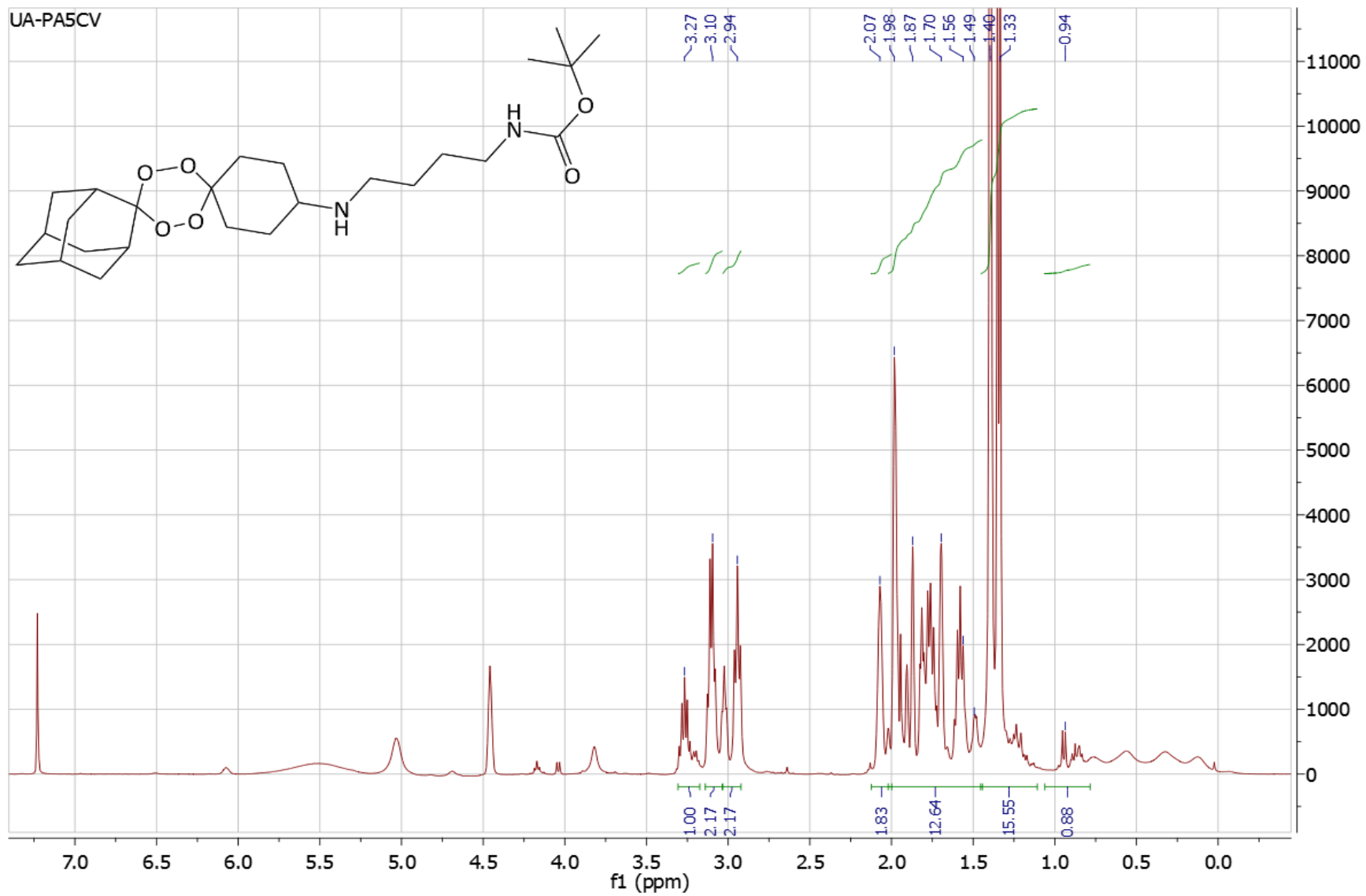


Figura VIII-9: Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (5).

7.6. Espectros do composto (6)

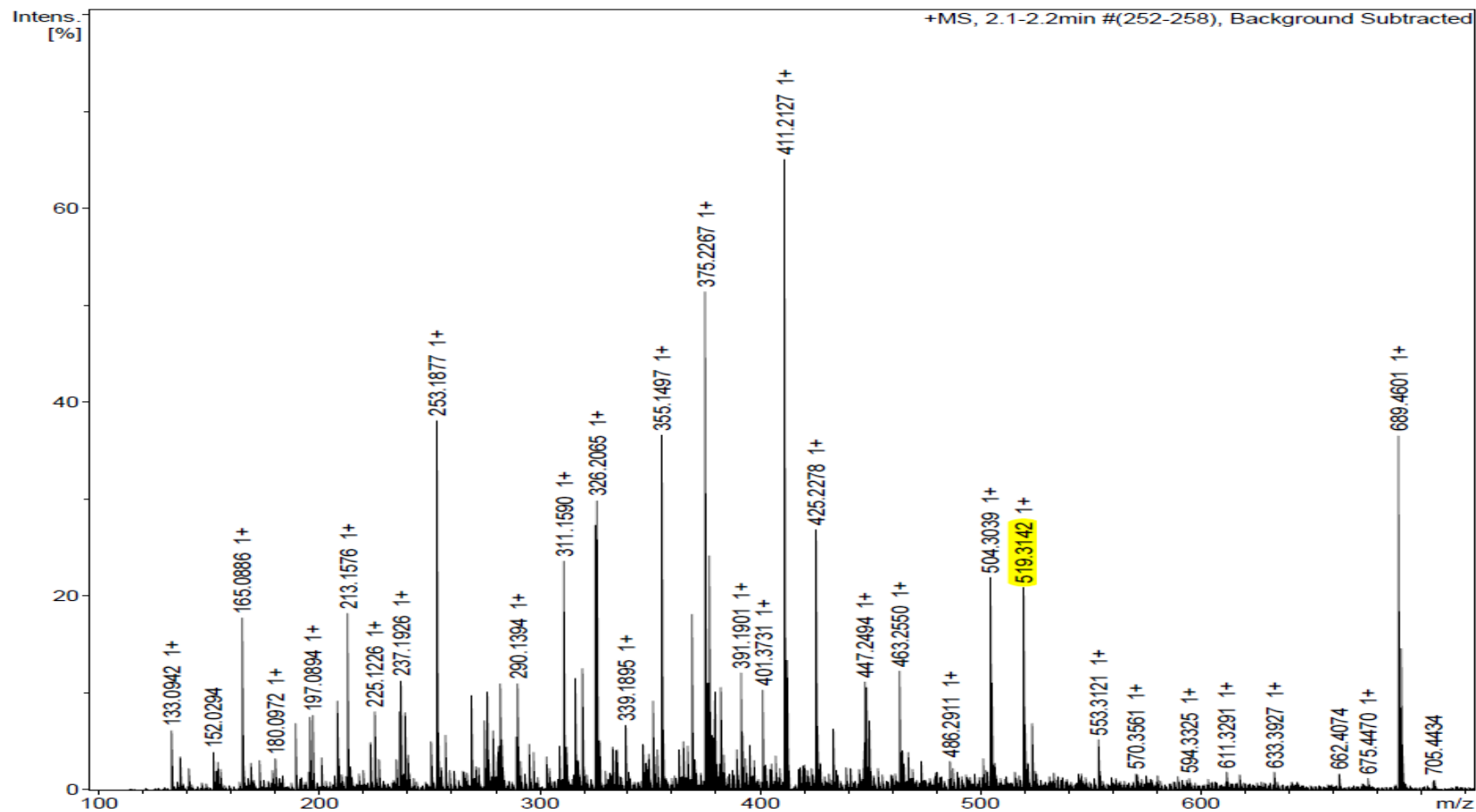


Figura VIII-10: Espectro de massa obtido para o composto (6).

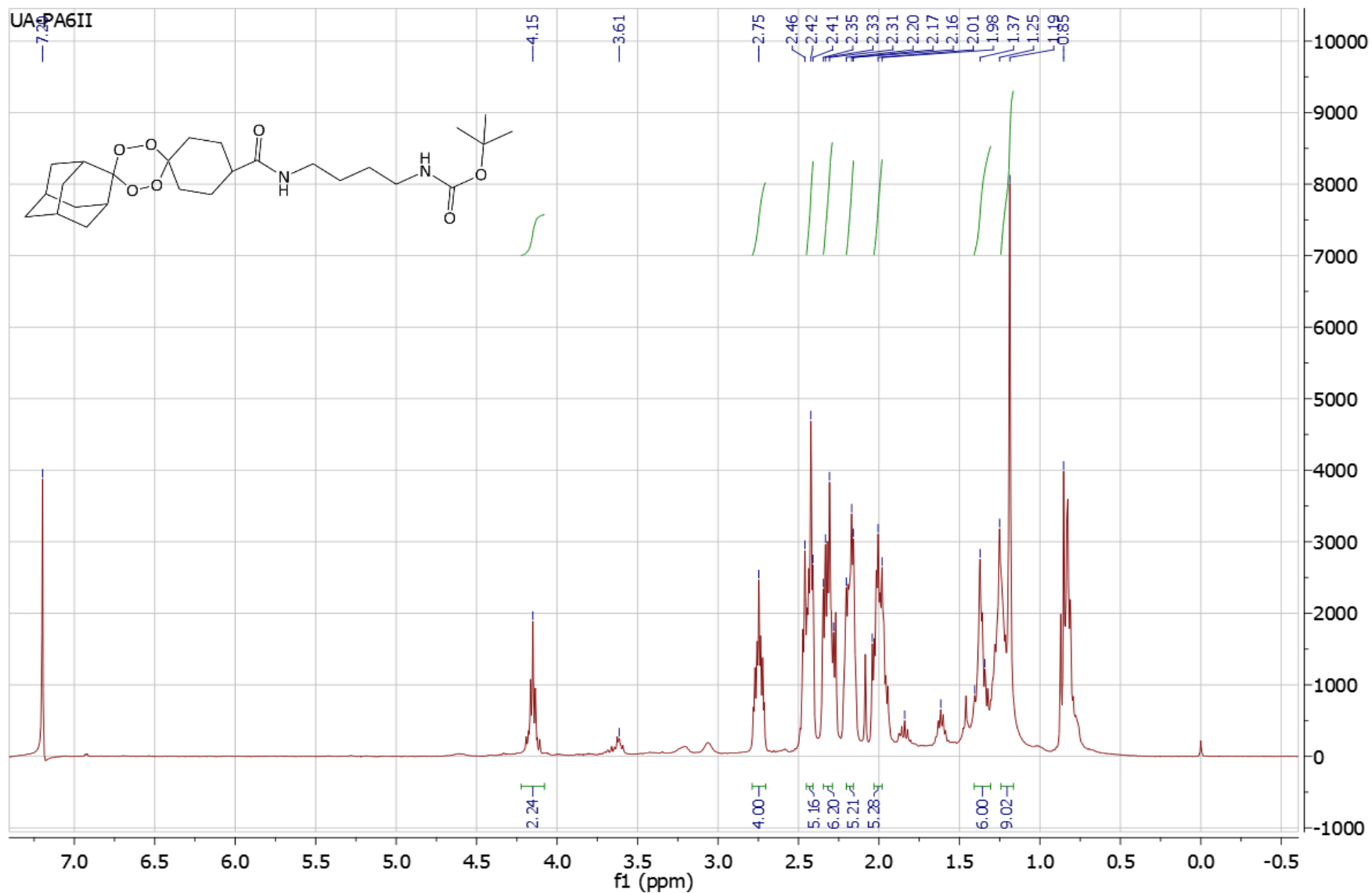


Figura VIII-11: Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (6).