



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**Síntese de conjugados de endoperóxido-
polipirrole direcionados ao ADN de
*Plasmodium falciparum***

Lília Isabel Lameirinhas Cabral

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Faro 2012



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**Síntese de conjugados de endoperóxido-
polipirrole direcionados ao ADN de
*Plasmodium falciparum***

Lília Isabel Lameirinhas Cabral

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Faro 2012

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.

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

Lília Isabel Lameirinhas Cabral

Lília Isabel Lameirinhas Cabral

Este trabalho foi publicado nos seguintes formatos:

✓ Integrado numa publicação no jornal ChemMedChem, com o título “Artemisinin Polypyrrole Conjugates; Synthesis, DNA Binding Studies and Preliminary Cytotoxicity Evaluation”.

✓ Em painel, com os seguintes títulos:

- “Design and synthesis of endoperoxide híbridos directed to plasmodial DNA”, Coimbra (Portugal); 28 - 30 Novembro de 2010, no 2º Encontro Nacional de Química Terapêutica.

- “Synthesis of New DNA – Directed Endoperoxides as potencial antimalarial agentes”, Porto (Portugal); 13 - 15 Novembro 2008, no 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica.

- “DNA-Directed endoperoxides”, Viena (Áustria); 31 Agosto - 5 Setembro 2008, no XXth International Symposium on Medicinal Chemistry.

- “New DNA – Directed Endoperoxides”, Lisboa (Portugal); 13 - 14 Outubro 2006, no Medicinal Chemistry in the 21st Century.

✓ Em comunicação oral com o título “New approaches to Antimalarial drug design; Plasmodium DNA-Directed Endoperoxides”, Madrid (Espanha); 17 - 18 Dezembro de 2009, na Plataforma Ibérica de Malária, 2nd Meeting

Agradecimentos

A todos aqueles que acompanharam este trabalho e contribuíram para a sua realização. Obrigada!

Agradeço à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano pela amabilidade, apoio, ensinamento, e encorajamento que sempre demonstrou ao longo destes últimos anos.

Por toda amizade, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou, agradeço à Nuna, pois sem ela trabalhar no laboratório seria bem mais difícil. Ao Amin, Pedro e outros colegas de laboratório, por toda amizade, disponibilidade e apoio que sempre demonstraram, e também pelos momentos de convívio.

Ao departamento de química da Universidade Nova de Lisboa pelas análises de RMN e espectrometria de massa.

Agradeço à minha mãe Joaquina a ternura, a motivação e todo o apoio e incentivo que me deu ao longo destes últimos anos, pois sem isso não seria quem sou hoje... À minha irmã Marina, agradeço a motivação.

A todos os meus amigos, obrigada por terem estado comigo nos bons e principalmente nos maus momentos...

O meu agradecimento final é dedicado ao meu namorado Márcio, pelo amor, carinho, compreensão, e apoio presentes em todos os momentos...

Resumo

A Malária é uma doença tropical infecciosa que ameaça cerca de 3,3 bilhões de pessoas no planeta. É causada por parasitas do género *Plasmodium*, e afeta sobretudo países subdesenvolvidos. Assim sendo, é de vital importância a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes, seguros e com baixo custos de produção.

Tendo em conta que o genoma de *Plasmodium falciparum* é rico em sequências de adenina e timina, propusemo-nos desenvolver, numa perspectiva de terapia de combinação, moléculas alvo que incluam um agente seletivo de ligação ao ADN plasmodial e um peróxido gerador de radicais.

Os compostos alvo foram concebidos de modo a possibilitar diferentes mecanismos de ação farmacológica. Assim, estes alvos incluem um farmacóforo (endoperóxido) que irá ser ativado pelo ferro no interior das células infetadas por *Plasmodium*, acoplado a um agente que permita direcionar o conjunto para o ADN. Estas espécies poderão induzir clivagem do ADN ou alquilação das bases adenina e timina, inibindo a sua replicação.

Neste trabalho, os farmacóforos escolhidos e preparados foram derivados da artemisinina e trioxolanos. O agente de ligação integrado na molécula é um análogo da distamicina A, um polipirrole que interage com o “minor groove” do ADN, rico em adenina e timina. A introdução deste fragmento nas moléculas alvo tem como objetivo aumentar a seletividade do fármaco. Foram desenvolvidas e otimizadas estratégias de síntese dos agentes de ligação ao ADN, os compostos 6, 10, 14 e 18.

Na preparação das moléculas alvo seguiu-se uma estratégia de síntese convergente, em que os blocos contendo o peróxido e o agente de ligação foram preparados para posterior acoplamento.

Foram igualmente preparados os blocos contendo o peróxido, os derivados de ART, compostos 22 e 23 e os trioxolanos, compostos 27, 28 e 29. Tentou-se desenvolver estratégias adequadas para o acoplamento dos dois blocos, compostos 30 a 35. O composto 31 acabou por ser sintetizado no nosso grupo. No âmbito da colaboração com a Universidade de Liverpool, o conjugado 31 e outros conjugados preparados, foram testados quanto à sua atividade anti-malárica em eritrócitos infetados por *Plasmodium falciparum*, HL 60 (leucemia) e HT 29 (adenocarcinoma de cólon). Os resultados são apresentados e discutidos.

Palavras-chave: Malária, quimioterapia, agentes de ligação ao ADN, conjugados de endoperóxido-polipirrole.

Abstract

Malaria is a tropical infectious disease that threatens approximately 3.3 billion people, mainly in underdeveloped countries, caused by parasites of the *Plasmodium* genus. In that way, the discovery of new drugs, effective, safe and with low production costs is of crucial importance, for controlling this disease.

Taking in account that the genome of *Plasmodium falciparum* is rich in adenine and thymine sequences, our group (in partnership with the University of Liverpool) proposed to develop target molecules combining a ligand with affinity to plasmodial DNA and a peroxide, in a combination therapy approach.

The targets were designed with structural diversity for structure-activity relationship studies. The conjugates contain an endoperoxide pharmacophore that will be activated by iron inside infected cells and a coupled polipyrrole that allows the conjugate to target DNA. The aim is to induce DNA cleavage or alkylation since the conjugates are designed to have affinity to adenine and thymine sequences, inhibiting DNA replication.

In this work, two sets of endoperoxides were chosen and prepared - artemisinin and trioxolanes derivatives. The binder chosen was an analogue of Distamicyn A, a polypyrrole DNA minor groove binder. The building blocks containing the peroxide and polipyrrole were successfully synthesized. DNA binders 6, 10, 14 and 18 were prepared. Different synthetic strategies to these compounds were developed and optimized.

From the building blocks, preparation of the target conjugate was attempted; conjugate 31 was prepared in our group. Within the collaboration with Liverpool University, conjugate 31 and other conjugates prepared using the same rationale were tested regarding affinity to DNA sequences and activity against *P. Falciparum* infected erithrocites, HL 60 (Leukaemia) and HT 29 (colon adenocarcinoma). Results are presented and discussed.

Keywords: Malaria, quimioterapie binding DNA endoperoxides-polipurrole conjugates

Abreviaturas

Ac₂O - Anidrido acético
ACT - Artemisinin-based combination therapy (Terapia Combinada de Artemisinina)
ADN - Ácido desoxirribonucleico
ART - Artemisinina
CDCl₃ - Triclorometano deuterado
CQ - Cloroquina
DCM - Diclorometano
DDT - Diclorodifeniltricloroetano
DHA - Dehidroartemisinina
DMF - Dimetilformamida
EI - Ionização por impacto eletrônico
H₂O - Água
H₂SO₄ – Sulfato de hidrogénio (Ácido sulfúrico)
HCl 37% - Ácido clorídrico
HNO₃ – nitrato de hidrogénio (Ácido nítrico)
IC₅₀ - Concentração necessária para provocar a inibição em 50%
IV - Infravermelho
K₂CO₃ - Carbonato de potássio
KMnO₄ - Permanganato de potássio
KOH - Hidróxido de potássio
MeOH - Metanol
MS - Espectrometria de Massa
NaCl - Cloreto de sódio
NaHCO₃ - Hidrogenocarbonato de sódio ou bicarbonato de sódio
NaIO₄ - Periodato de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
OMS - Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization)
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
ROS - Reactive Oxygen Species (Espécies Reactivas de Oxigénio)
TC - Terapia de combinação
THF - Tetrahidrofurano
TLC - Thin Layer Chromatography – Cromatografia em Camada Fina

Índice de matéria

I.Introdução	1
Malária	1
1.1.1. A abrangência da doença.....	1
1.1.2. O agente infeccioso	2
1.1.3. Ciclo de vida do parasita	3
1.1.4. Vacina contra a malária.....	5
Estratégias disponíveis na quimioterapia da malária	5
1.1.1. Fármacos clássicos e sua evolução.....	5
1.1.2. Artemisinina e derivados.....	8
1.1.3. Endoperóxidos sintéticos.....	10
1.1.4. Tetraoxanos	12
1.1.5. 1,2-Dioxanos	13
1.1.6. Agentes de ligação ao ADN	14
Objetivos	15
II. Síntese desenvolvida e discussão dos resultados obtidos	17
2.1. Sínteses desenvolvidas e propostas mecanísticas.....	17
2.2. Discussão dos resultados obtidos	31
2.3. Conclusão	43
III. Procedimento experimental.....	45
3.1. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas ao longo do projeto	46
□ Síntese de 1-metil-2-tricloroacetilpirrole, composto 2.....	46
□ Síntese de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, composto 3.....	46
□ Síntese de N-(3-dimetilaminopropil)-1-metil-4-nitropirrol-2-carboxamida, composto 4	47
□ Síntese de 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido) pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, composto 6	47
□ Síntese de tert-butil 4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida) butilcarbamato, composto 7	48
□ Síntese de tert-butil 4-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)-1H-pirrole-2-carboxamido]butilcarbamato, composto 9	49
□ Desproteção da amina; preparação de 4-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)-1H-pirrole-2-carboxamido]butilamina, composto 10.....	50
□ Síntese de 1-metil-4-nitro-2-acetilpirrole, composto 12	50

<input type="checkbox"/> Síntese de N-(5-acetil-1-metilpirrole-3-il)-1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida, composto 14	51
<input type="checkbox"/> Síntese de 1-metilpirrole-2-carboxilato de metilo, composto 15	51
<input type="checkbox"/> Síntese de 1-metil-4-nitropirrol-2-carboxilato de metilo, composto 16.....	52
<input type="checkbox"/> Síntese de 5-(1-metil-4-nitropirrol-2-carboxamido)-1-metil-1H-pirrol-2-carboxilato de metilo, composto 18	53
3.1.2- Síntese dos blocos de construção contendo o peróxido como farmacóforo	53
<input type="checkbox"/> Síntese do 10-benzoato de artemisinina, composto 20	53
<input type="checkbox"/> Síntese do 10-alil-artemisinina, composto 21	54
<input type="checkbox"/> Síntese do ácido 10-artemisinina etanoico, composto 22.....	54
<input type="checkbox"/> Síntese do cloreto de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 23.....	55
<input type="checkbox"/> Síntese de adamantil-metiloxima, composto 25.....	55
<input type="checkbox"/> Ozonólise para a formação do composto 26	55
<input type="checkbox"/> Síntese do ácido carboxílico, composto 27	56
<input type="checkbox"/> Conversão do composto 27 no correspondente cloreto de ácido, 28	56
<input type="checkbox"/> Ozonólise para a formação do composto 29	56
3.1.3- Tentativas de síntese dos diferentes conjugados alvo.....	57
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 6 ao peróxido 20, para obter o composto 30	57
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 6 aos peróxidos 22 e 23, composto 31 ...	58
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 6 aos peróxidos 27 e 28, composto 32 ...	59
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 6 ao trioxolano 29, composto 33.....	60
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 10 aos peróxidos 27 e 28, composto 34.	61
<input type="checkbox"/> Tentativa de acoplamento do ligando 10 aos peróxidos 22 e 23, composto 35.	61
IV.Referências bibliográficas.....	64
V.Anexos.....	68

Índice de figuras

Figura 1.2. Distribuição da malária no mundo.....	2
Figura 1.3. Ciclo de vida do parasita <i>P. falciparum</i> , no homem e mosquito.....	3
Figura 1.4. Estruturas de alguns dos anti-maláricos mais utilizados.....	7
Figura 1.5. Representação das estruturas da artemisinina e derivados usados na quimioterapia da malária.....	9
Figura 1.7. Estrutura e atividade do trioxolano OZ277 (Arterolano).	11
Figura 1.8. Representação esquemática do mecanismo da bioativação dos trioxolanos em presença de ferro de Hemoglobina ²⁸	12
Figura 1.9. Representação da estrutura do tetroxano RKA 182.....	13
Figura 1.10. Representação das estruturas do Yingzhaosu A (esquerda) e do artefleno (direita).....	13
Figura 1.11. Representação das estruturas de agentes de ligação ao ADN.	14
Figura 1.12. Representação das estruturas gerais dos compostos-alvo.	16
.....	16
Figura 2.1. Esquema representativo da estratégia de síntese para preparação dos agentes de ligação ao ADN.....	18
Figura 2.2. Representação da abordagem sintética aos agentes de ligação ao ADN; composto 14.....	19
Figura 2.3. Representação da abordagem sintética aos agentes de ligação ao ADN; composto 18.....	20
Figura 2.4. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 2.....	20
Figura 2.5. Proposta de mecanismo de reação relativo às nitrações.	21
Figura 2.6. Proposta de mecanismo de reação relativo à formação das diferentes amidas. .	21
Figura 2.7. Proposta de mecanismo de reação relativo à redução do composto nitrado à amina correspondente em presença de paládio sobre carbono.....	22
Figura 2.8. Proposta de mecanismo de reação para a formação do éster 15.	22
Figura 2.9. Proposta de mecanismo de reação para a formação da amina 10, a partir do carbonato correspondente.....	22
Figura 2.10. Abordagem sintética à preparação de derivados de ART com ligação a carbono na posição C-10.	23
Figura 2.11. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 20.....	23

<i>Figura 2.12. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 21.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2.13. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 22.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.14. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 23.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.15. Representação da abordagem sintética à preparação de trioxolanos; trioxolano 28.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.16. Representação da abordagem sintética à preparação do trioxolano 29.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.17. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 25.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2.18. Mecanismo de reação para a formação do ozonídeo 26.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2.19. Representação à abordagem sintética dos conjugados alvo.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2.20. Representação à abordagem sintética aos compostos alvo.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2.21. Proposta de mecanismo de reação para a formação dos compostos alvo.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.22. Mecanismo de reação para a formação do composto alvo 30.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.23. Mecanismo de reação para a formação do composto alvo 33.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.24. Representação esquemática das sínteses desenvolvidas para os diferentes derivados de pirrole.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2.25. Representação esquemática das sínteses desenvolvidas para os diferentes derivados de ART modificados em posição C-10.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2.26. Representação esquemática das abordagens sintéticas à preparação dos diferentes trioxolanos.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 2.27. Representação esquemática das abordagens sintéticas aos conjugados alvo. Apenas o conjugado 31 foi obtido.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 2.28. Representação esquemática das abordagens sintéticas aos conjugados alvo. ..</i>	<i>39</i>
<i>Figura 2.29. Representação esquemática dos conjugados alvo presentes no artigo.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5.1. Espectro de infravermelho obtido para o composto 2.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 5.2. Espectro de massa obtido para o composto 2.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 5.3. Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto 2.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 5.4. Espectro de ¹³C-RMN obtido para o composto 2.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 5.5. Espectro de infravermelho obtido para o composto 3.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 5.6. Espectro de massa obtido para o composto 3.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 5.7. Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto 3.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 5.8. Espectro de ¹³C-RMN obtido para o composto 3.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 5.9. Espectro de infravermelho obtido para o composto 4.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 5.10. Espectro de massa obtido para o composto 4.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 5.11. Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto 4.</i>	<i>73</i>

Figura 5.12. Espectro de infravermelho obtido para o composto 6.....	74
Figura 5.13. Espectro de massa obtido para o composto 6.	74
Figura 5.14. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 6.	75
Figura 5.15. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 6.	75
Figura 5.16. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 7.	76
Figura 5.17. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 7.	76
Figura 5.18. Espectro de massa obtido para o composto 7.	77
Figura 5.19. Espectro de massa obtido para o composto 9.	78
Figura 5.20. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 10.	79
Figura 5.21. Espectro de massa obtido para o composto 10.	79
Figura 5.22. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 12.	80
Figura 6.23. Espectro de massa obtido para o composto 12.	80
Figura 5.24. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 14.	81
Figura 5.25. Espectro de massa obtido para o composto 14.	81
Figura 5.26. Espectro de infravermelho obtido para o composto 15.....	82
Figura 5.27. Espectro de infravermelho obtido para o composto 16.....	83
Figura 5.28. Espectro de infravermelho obtido para o composto 18.....	84
Figura 5.29. Espectro de massa obtido para o composto 18.	84
Figura 5.30. Espectro de massa obtido para o composto 22.	85
Figura 5.31. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 25.	86
Figura 5.32. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 25.	86
Figura 5.33. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 26.	87
Figura 5.34. Espectro de massa obtido para o composto 27.	88
Figura 5.35. Espectro de massa obtido para o composto 29.	89
Figura 5.36. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 29.	90
Figura 5.37. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 29.	90

Tabela 2.1. Atividade citotóxica e anti-malária dos compostos 31, 36 a 41 usando DHA e netropsina (NET) como controlo.....	42
---	----

I. Introdução

Malária

A malária é uma doença parasitária que tem como agente um organismo protozoário unicelular do género *Plasmodium*¹. Este é transmitido ao homem pela picada de mosquitos fêmea infetadas do género *Anopheles gambiae*² (figura 1.1). Também pode ser transmitida por transfusão sanguínea, pelo uso compartilhado de agulhas contaminadas ou para o feto, durante a gravidez¹.



Figura 1.1. Mosquito *Anopheles gambiae*².

1.1.1. A abrangência da doença

A malária afeta a humanidade desde a antiguidade. Com origem provável no Continente Africano, a doença terá acompanhado as migrações do ser humano pelo mundo³.

O controlo da malária apresenta uma grande importância em termos de saúde pública, já que a doença ameaça cerca de 3,3 biliões de pessoas, o que equivale a quase metade da população mundial. Num relatório elaborado em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS; do inglês World Health Organization-WHO)^{3a}, estimou que a malária é endémica em 106 países. Destes a maioria localiza-se nas áreas tropicais e subtropicais, correspondentes às zonas mais pobres do planeta (Figura 1.2). A OMS está otimista quanto aos resultados alcançados para o controle mundial da malária, pois um terço dos países onde a malária é endémica (nove africanos e 29 não africanos) apresentaram uma redução de mais de 50% nos casos de mortalidade e morbidade, se comparados aos observados em 2000^{3a}. No entanto, ocorrem ainda cerca de 250 milhões de casos anualmente, provocando a morte de quase um milhão de pessoas. Esta mortalidade incide principalmente em crianças na zona subsaariana de África, onde uma em cada cinco crianças morre devido aos efeitos da doença. Nesta zona do planeta é registada uma morte a cada 30 segundos. Estes dados são bastante expressivos e refletem a enorme importância do combate à malária^{3a}.

▪ **Distribuição geográfica**



Figura 1.2. Distribuição da malária no mundo^{3a}

Têm sido implementadas diversas estratégias com o objetivo de um controle mais efetivo da doença. Nos diversos locais onde a malária é endêmica tem-se procedido à distribuição de redes mosquiteiras impregnadas com inseticidas para controle do vetor, combinações terapêuticas incluindo os derivados de artemisinina para os casos de infecção de *Plasmodium falciparum* (e para os casos de infecção por *Plasmodium vivax* resistentes à cloroquina), e de inseticidas de ação residual nos domicílios como tratamento preventivo intermitente para malária na gravidez^{3b}.

1.1.2. O agente infeccioso

Só os mosquitos fêmea picam o homem, pois necessitam de sangue para alimentar os seus ovos. Os machos vivem de seivas de plantas e as larvas desenvolvem-se em águas paradas.

Até o ano de 2008, estavam descritas quatro espécies de protozoários causadores da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e

Plasmodium malariae. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o *Plasmodium knowlesi*, anteriormente considerado infetante somente para primatas não-humanos em países do sudeste da Ásia, como a quinta espécie de plasmódio causadora da malária em seres humanos⁵.

O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída pelas zonas tropicais e subtropicais do globo, sendo responsável por casos graves da doença e algumas mortes. Os protozoários *P. malariae* e *P. ovale*, apesar de menos frequentes, têm aumentado a sua área de distribuição no globo. Já o *P. knowlesi*, usualmente confundido com *P. malariae*, é uma importante causa de malária na Malásia, podendo rapidamente atingir estádios potencialmente letais se não diagnosticado e tratado precocemente⁶.

No entanto, o *P. falciparum* é a espécie do parasita responsável pela maioria das inúmeras infecções letais da malária, especialmente em África. A malária causada por este protozoário, se não for diagnosticada precocemente e tratada de forma adequada, pode produzir quadros clínicos extremamente graves, sendo fatal quando não tratada ou quando tratada com medicamentos inadequados⁶.

Em termos de sintomatologia, a doença caracteriza-se por ataques periódicos de febre, náuseas, vômitos e calafrios, anemia, coma, hipoglicémia, insuficiência renal aguda e coagulação intravascular disseminada. O período de incubação, espaço de tempo entre a picada do mosquito e o aparecimento do primeiro sintoma, é de 1 a 3 semanas¹.

1.1.3. Ciclo de vida do parasita^{7,8}

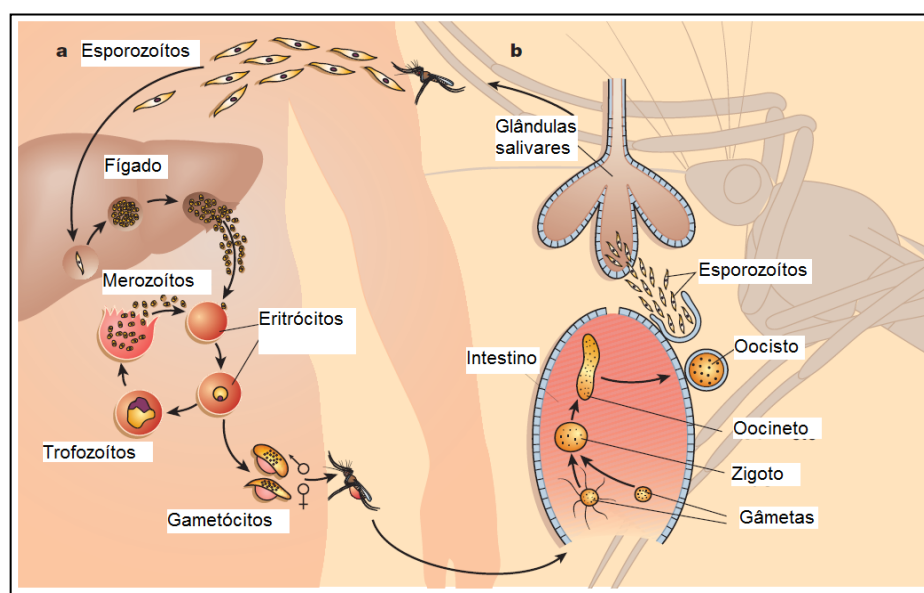


Figura 1.3. Ciclo de vida do parasita *P. falciparum*, no homem e mosquito⁸.

A infecção e subsequente ciclo de vida de *Plasmodium*, que está esquematicamente representado na figura 1.3, iniciam-se através de uma picada da fêmea *Anopheles gambiae* infectada. De um modo geral, os mosquitos injetam pequenas quantidades de saliva, que serve basicamente como um anticoagulante. É nesta saliva de mosquitos infectados que se podem encontrar os esporozoítos. Após um período de cerca de 30 minutos, os esporozoítos que circulam livres pelo sangue humano alcançam o fígado e, no interior das células hepáticas, passam por uma divisão assexuada. Após alguns dias, são produzidos alguns milhares de novos parasitas, os merozoítos (em maior quantidade se forem de *P. falciparum*). As células do fígado rompem-se e os merozoítos têm acesso ao sangue, infectando os eritrócitos. Novamente, dentro do eritrócito, os merozoítos dividem-se assexuadamente até que, devido ao número excessivo de merozoítos, o eritrócito rebenta. Os merozoítos e as substâncias químicas por eles produzidas dentro do eritrócito são dispersas na corrente sanguínea e identificadas pelos leucócitos que produzem citocinas. Esses merozoítos invadem então novas hemácias, multiplicando-se cada vez mais em cada ciclo. Alguns transformam-se em gametócitos (formas sexuais) que são sugados, juntamente com o sangue, por outros mosquitos. As formas sexuais, macho e fêmea, fundem-se no intestino do mosquito, dando origem a um zigoto flagelado. Este divide-se em milhares de esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do inseto, de onde invadem um novo hospede humano.

Quando se encontra dentro das hemácias sob a forma de trofozoíto, o parasita começa a alimentar-se da hemoglobina do hospedeiro. Este processo ocorre no interior do seu vacúolo de alimentação, o qual possui um meio ácido que lhe permite degradar a hemoglobina presente nas hemácias (grupo *heme*). A degradação da hemoglobina origina hematina, um metabolito tóxico, quer para o parasita quer para o hospedeiro. A toxicidade da hematina deve-se ao facto de ser um pró-oxidante que induz a formação de espécies reativas de oxigénio (Reactive Oxygen Species – ROS) e de ter capacidade para danificar diretamente as membranas e organelos celulares do parasita, provocando a lise do parasita protozoário. De modo a sobreviver à toxicidade da hematina o parasita polimeriza-a em cristais de hemazoina, um produto secundário que se deposita no interior das hemácias. A hemazoina não afeta o parasita e constitui uma prova hematológica da infecção⁹.

1.1.4. Vacina contra a malária

Nenhuma vacina está atualmente disponível para prevenir a malária. No entanto, muitos candidatos a vacinas estão em desenvolvimento. O mais avançado até à data é o RTS, S desenvolvido por diversas empresas farmacêuticas, que se encontra em fase III de testes clínicos¹⁰. Os resultados da RTS, S nas áreas endémicas são muito promissores, uma vez que reduz o risco de malária e retarda o aparecimento de novas infeções.

Estratégias disponíveis na quimioterapia da malária

1.1.1. Fármacos clássicos e sua evolução

Enquanto se espera por uma vacina, o controlo da malária tem-se baseado em métodos convencionais, como a prevenção da doença e o recurso a diversos fármacos anti-maláricos.

Durante os anos 40, a descoberta do DDT (diclorodifeniltricloroetano) trouxe a esperança de erradicar globalmente a malária através do controlo do vetor. Assim, por todo o mundo houve pulverizações com DDT. Este inseticida teve algum sucesso inicial, visto que a malária foi eliminada ou reduzida em muitos países. No entanto, passado pouco tempo, o número de casos aumentou de tal forma que excedeu os níveis anteriores, principalmente no continente Africano. Pensa-se que o uso excessivo, e por vezes inadequado, do DDT possa ter sido a principal causa da resistência ao inseticida. Acrescem as consequências nefastas da utilização do DDT para o ambiente¹¹.

A utilização de fármacos representa a solução mais eficaz no controlo da malária. No entanto, no decorrer das últimas décadas, observou-se o desenvolvimento de resistência por parte do parasita à maior parte dos anti-maláricos disponíveis, sendo este o principal obstáculo à erradicação da doença.

O quinino (Figura 1.4) é o anti-malárico mais antigo conhecido no Ocidente. É um produto natural extraído da casca de árvores do género *Cinchona*. Foi isolado da casca da árvore em 1820 pelos químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou, mas só em meados dos anos 40, do século passado, foi sintetizado pela primeira vez, no grupo de

Woodward. Os primeiros registros de seleção de resistência por parte do *P. falciparum* ao quinino datam de 1910 e a resistência a este composto parece não ter sofrido uma elevada propagação. Este fármaco é ainda hoje utilizado, pois em casos graves de malária pode ser administrado por via intravenosa⁴.

Paul Ehrlich, cientista alemão, verificou que o azul-de-metileno (Figura 1.4) era eficaz contra estirpes do parasita da malária, e em 1891, usou este composto para curar dois pacientes infetados. Este foi o primeiro fármaco anti-malárico sintético utilizado nos humanos¹².

Na Alemanha, em 1925, Bayer e alguns cientistas sintetizaram dois compostos da família das 8-aminoquinolinas, usando como padrão o azul-de-metileno, que viriam a ser usados clinicamente como anti-maláricos: a pamaquina (Figura 1.4) e a primaquina (Figura 1.4). Este último ainda é utilizado para prevenir recaídas em caso de infecção provocada por *P. vivax* e *P. ovale*. Posteriormente a pamaquina foi modificada, e conduziu à preparação da quinacrina (Figura 1.4)¹².

O quinino serviu de base para a síntese da cloroquina (CQ, Figura 1.4), uma 4-aminoquinolina, sintetizada durante a Segunda Guerra Mundial. Este seria o “fármaco perfeito”, com alta eficácia contra formas eritrocíticas de *P. falciparum*, de baixo custo e sem efeitos secundários¹³. Depressa se tornou no fármaco anti-malárico mais popular, e foi extensivamente utilizado em praticamente todas as regiões onde a malária era endêmica. Porém, no final dos anos 50 apareceram estirpes resistentes à cloroquina. Este fármaco permanece eficaz contra parasitas sensíveis, e é ainda utilizado nalgumas regiões devido ao seu baixo custo de produção¹⁴. Porém é absolutamente ineficaz na maioria das zonas onde a malária é endêmica.

A mefloquina (Figura 1.4), um 4-quinolinometanol derivado da CQ, é mais ativa que a CQ sendo utilizada contra estirpes de *P. falciparum* resistentes às 4-aminoquinolinas. Os primeiros casos de *P. falciparum* resistentes à mefloquina surgiram no princípio dos anos 80¹⁵. Atualmente é recomendada somente em combinação com outros compostos, sobretudo com derivados da artemisinina, por possuir meia-vida prolongada.

A halofantina (Figura 1.4), foi produzida durante os anos 70 pelo exército norte-americano com o objetivo principal de encontrar um fármaco ativo contra estirpes resistentes aos fármacos comuns na época.

O proguanilo (Figura 1.4) foi sintetizado depois da segunda guerra mundial. Os primeiros casos resistentes a este fármaco surgiram por volta de 1950. Quando combinado

com a cloroquina (Figura 4), este fármaco ainda é frequentemente usado no tratamento da malária¹⁵.

A combinação sulfadoxina-pirimetamina (Figura 1.4) foi introduzida para o tratamento do *P. falciparum* de um modo globalizado durante os anos 60. No entanto, rapidamente surgiram os primeiros casos de seleção de resistência, e atualmente já se observam níveis elevados de resistência a esta combinação de anti-metabolitos¹⁵.

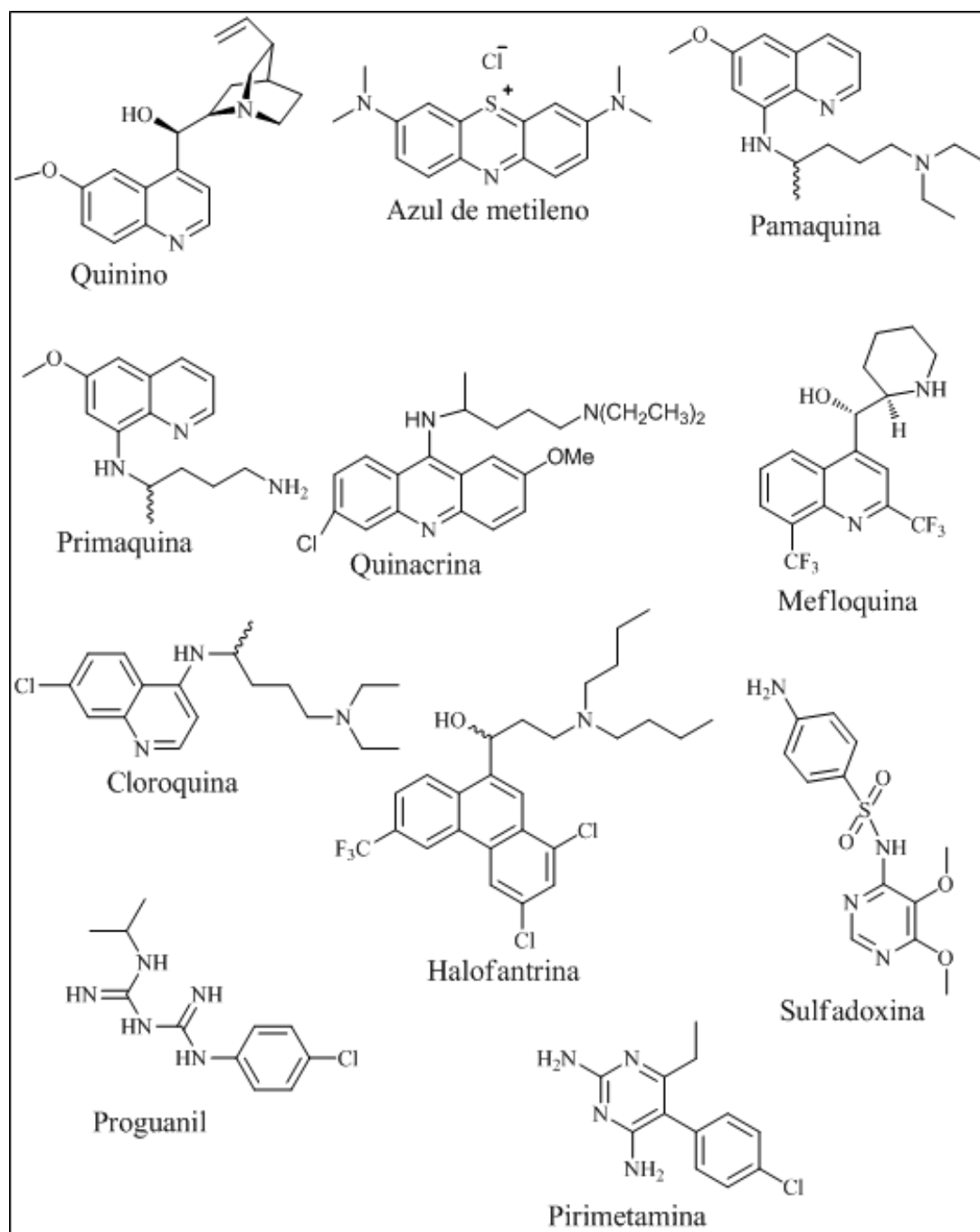


Figura 1.4. Estruturas de alguns dos anti-maláricos mais utilizados.

A terapia de combinações (TC), usada na quimioterapia da malária, é baseada no uso simultâneo de dois ou mais fármacos com modos de ação independentes e por vezes dirigidos a diferentes alvos terapêuticos. Esta estratégia permite melhorar a eficácia terapêutica e também atrasar o desenvolvimento de resistência aos componentes individuais da combinação¹⁶.

1.1.2. Artemisinina e derivados

Como já foi mencionado a malária é uma patologia que vitima milhares de vidas nos nossos dias, especialmente em países sub-desenvolvidos, pelo que é necessária uma solução farmacológica barata, eficaz e segura para eliminar o parasita.

Sendo que algumas estirpes de *P. falciparum* têm demonstrado resistência às TC, os “fármacos clássicos” foram sendo substituídos por outros da classe promissora dos endoperóxidos. Estes anti-maláricos têm conseguido contornar o problema da resistência aos fármacos convencionais.

A artemisinina (ART, Figura 1.5) é um anti-malárico da classe dos endoperóxidos que tem origem natural. É extraída das folhas de uma planta abundante em certas zonas da Ásia, a *Artemisia annua* (Figura 1.5), também conhecida como “qinghao” ou “sweet wormwood”¹⁷. Extratos desta planta foram usados, durante muitos séculos, na cura de febres pela medicina tradicional chinesa. Quimicamente a ART é uma lactona sesquiterpénica que possui um grupo funcional endoperóxido, 1,2,4-trioxano, sendo este o farmacóforo da molécula¹⁸. A ART é um anti-malárico que apresenta uma ação rápida. Mata as formas eritrocitárias (que provocam a sintomatologia) e gametocíticas do parasita devido ao facto de ser uma molécula lipofílica, que facilita a sua entrada nas hemácias através da membrana plasmática. Infelizmente, não apresenta atividade contra as formas exoeritrocitárias do parasita, e a sua extração a partir da *Artemisia annua* é feita com baixos rendimentos, o que conduz a um custo elevado.¹⁹

A utilização de ART está limitada pela sua baixa solubilidade, tanto em óleo como em água. Na tentativa de desenvolver fármacos eficazes e mais solúveis, foram sintetizados derivados semi-sintéticos da artemisinina que representam alternativas para a quimioterapia da malária.

A redução da ART origina o lactol, dehidroartemisinina (DHA, Figura 1.5). A partir da DHA foram sintetizados o arteméter (Figura 1.5), e o artéter (Figura 1.5) de modo a serem mais lipossolúveis, e o artesunato mais hidrossolúvel (Figura 1.5)²⁰.

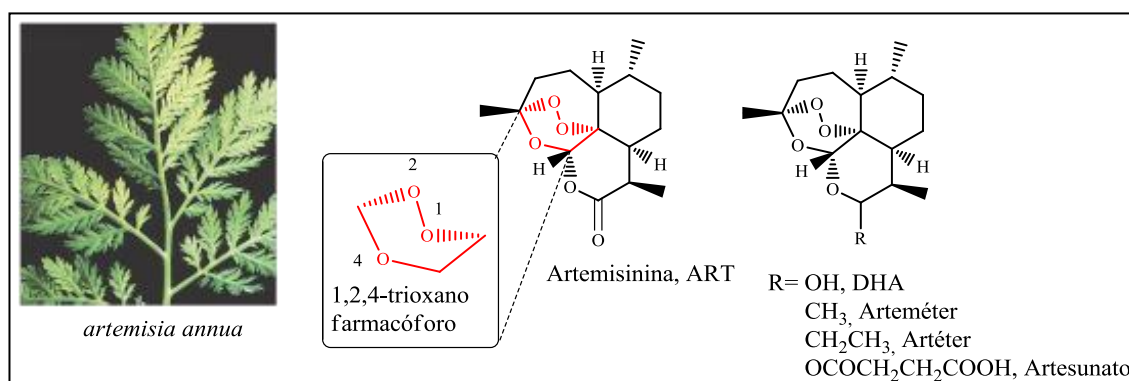


Figura 1.5. Representação das estruturas da artemisinina e derivados usados na quimioterapia da malária^{17,20}.

▪ Mecanismo de ação da ART e derivados

O mecanismo de ação da ART e seus derivados é um tópico que, até aos dias de hoje, não é consensual. Sabe-se que o grupo endoperóxido é o farmacóforo, pois confere a estes compostos a sua atividade anti-malárica. Este sofre clivagem homolítica em contacto com ferro, resultante da degradação da hemoglobina, sendo este um processo desencadeado pelo parasita *P. falciparum* para assegurar a sua sobrevivência. Porém não se sabe ao certo em que forma se encontra o ferro quando é complexado pelo endoperóxido, e existe falta de consenso no que diz respeito à natureza química dos intermediários formados após a reação radicalar com o ferro, pois estes podem ser radicais centrados em carbonos primários ou secundários, não se sabendo ao certo quais os alvos terapêuticos envolvidos. Existem duas hipóteses para o mecanismo de bioativação da ART: (i) o endoperóxido liga-se ao ferro livre; (ii) o endoperóxido liga-se ao ferro do grupo *heme* (efeito da alimentação do parasita)²¹.

A ART tem uma ação rápida e tempo de semi-vida curto. Assim, a OMS não recomenda o uso da ART em monoterapia. A ART e seus derivados são administrados em conjunto com outros fármacos anti-maláricos com tempos de semi-vida mais longos, em regimes terapêuticos designados por Terapias Combinadas à base de Artemisinina (Artemisinin-based combination therapies ACT)¹.

Para o tratamento dos casos avançados de malária causada por *P. falciparum*, pretende-se um derivado hidrossolúvel e que possa ser injetado por via intravenosa, e assim o medicamento pode atuar mais rapidamente que por injeção intramuscular. O artesunato (Figura 1.5) é um derivado hidrossolúvel que pode ser injetado por via intravenosa, sendo assim capaz de diminuir rapidamente a parasitemia. Normalmente, o artesunato (Figura 1.5) é

administrado em conjunto com a mefloquina (Figura 1.4). De todas as combinações que incluem derivados da ART, esta é atualmente a terapia de combinação de eleição²².

As ACT são de grande importância para retardar a seleção de resistências por parte do *P. falciparum*, tal como sucedeu no passado por exemplo com a cloroquina (Figura 1.4). São atualmente as terapêuticas que mais se usam pois evitam a recrudescência e inibem o aparecimento de estirpes de *P. falciparum* resistentes à ART e seus derivados.²³ Porém, em 2008 foram detetadas as primeiras estirpes resistentes aos ACT's, na fronteira Tailândia-Camboja, o que obriga ações rápidas por parte da comunidade científica e médica no sentido do desenvolvimento rápido de alternativas.

1.1.3. Endoperóxidos sintéticos

Na tentativa de encontrar outros compostos que conseguissem gerar radicais após clivagem catalisada por ferro, que fossem acessíveis no ponto de vista sintético e que fossem possíveis de ser desenvolvidos como fármacos, foi investigada a atividade de uma série de 1,2,4-trioxolanos, compostos que podem ser obtidos por exemplo por ozonólise de alquenos²². Estes compostos são geralmente instáveis, gerando os correspondentes compostos carbonílicos. No entanto, Vennerstrom²⁴ descobriu que quando o anel 1,2,4-trioxolano é estabilizado por um anel de adamantilo e por outro substituinte carbocíclico volumoso, os trioxolanos ficam quimicamente mais estáveis e exibem atividade *in vitro* contra o *P. falciparum* superior à do artesunato (Figura 1.5) e arteméter (Figura 1.5) numa gama nanomolar baixa. Apresentam também um tempo de ação mais prolongado, constituindo excelentes alternativas aos derivados semi-sintéticos de ART disponíveis²⁵.

O anel adamantilo é essencial pois sem este substituinte, o composto é metabolicamente instável e não exerce qualquer ação farmacológica. Este anel é bastante rígido e volumoso, promovendo o aumento do impedimento estérico em torno do endoperóxido, diminuindo assim a sua reatividade e aumentando por consequência a sua estabilidade química e metabólica. Quando a estrutura trioxolano se encontra associada ao anel adamantanona e a um ciclohexano (Figura 1.6) são obtidos os melhores valores para a atividade antimalárica, o que indica que esta associação de grupos substituintes promove uma reatividade seletiva do endoperóxido no alvo terapêutico preferencial²⁶.

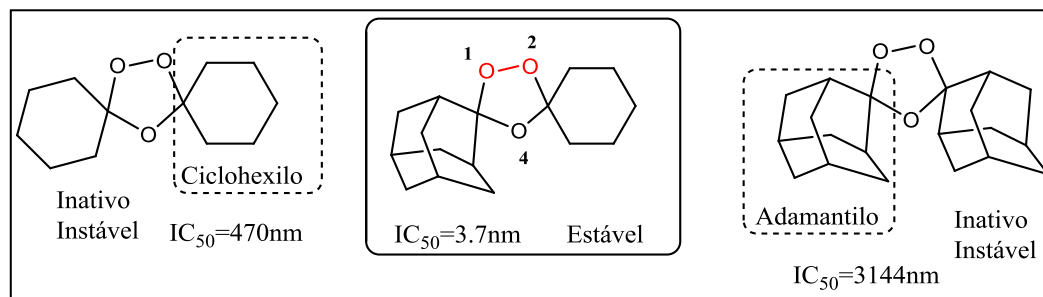


Figura 1.6. Estabilidade e atividade dos 1,2,4- Trioxolanos.

O trioxolano OZ277 ou arterolano (Figura 1.7) foi o primeiro endoperóxido anti-malárico introduzido em ensaios clínicos e encontra-se em fase III. Este composto apresenta uma excelente atividade antimalárica *in vitro*, podendo vir a ter um futuro promissor como fármaco anti-malárico em mono-terapia, e em terapias combinadas com outros anti-maláricos²⁷.

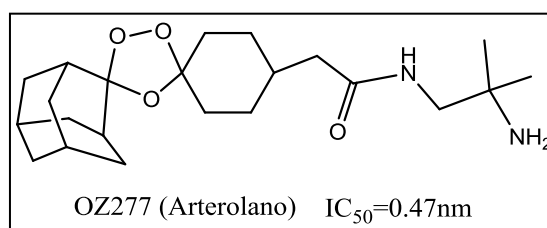


Figura 1.7. Estrutura e atividade do trioxolano OZ277 (Arterolano)²⁷.

▪ **Mecanismo de ação dos trioxolanos**

Tal como acontece com o mecanismo de ação da artemisinina e derivados, considera-se que o modo de ação dos trioxolanos envolve a formação de radicais centrados em carbono e outros em oxigénio (ROS). Como mecanismo de bioativação foi proposto que o ferro do grupo *heme* reage com a ligação endoperóxido do trioxolano, formando um oxigénio radicalar na posição 1 do endoperóxido (Figura 1.8) que rearranja originando um radical centrado no carbono secundário. Irá formar-se uma cetona como intermediário. Este composto intermédio, em conjugação com o grupo *heme*, sofre clivagem, resultando na formação de um ácido carboxílico e um centro radicalar de carbono secundário no anel adamantilo, que forma uma ligação covalente com *heme*. Geram-se assim espécies reativas de oxigénio (ROS) que provocam *stress* oxidativo no parasita. Os ROS causam danos nas enzimas e nos lípidos polinsaturados da membrana celular. A proliferação e crescimento do parasita podem ser regulados através da degradação oxidativa da membrana celular^[28]. Devido à elevada

concentração de ferro do grupo *heme* da hemoglobina, este modelo é o que melhor explica o efeito parasiticida do trioxolanos.

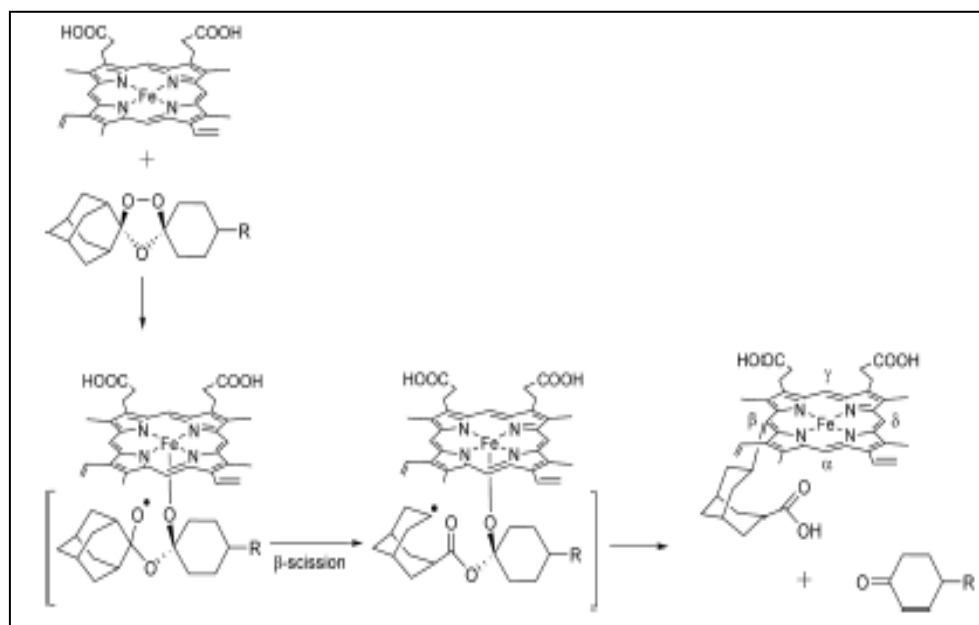


Figura 1.8. Representação esquemática do mecanismo da bioativação dos trioxolanos em presença de ferro de Hemoglobina²⁸.

1.1.4. Tetraoxanos

Os 1,2,4,5-tetraoxanos são compostos heterocíclicos que possuem duas pontes endoperóxido localizadas nas posições 1,2 e 4,5 (Figura 1.9). A síntese destes compostos envolve custos baixos, sendo a estratégia mais comum o acoplamento em meio ácido de cetonas cíclicas com peróxido de hidrogénio. No *design* de tetraoxanos para eventual utilização como anti-maláricos, considerou-se a participação de um grupo adamantilo para estabilização adicional da ligação endoperoxídica, garantindo a estabilidade das duas ligações tetraoxano e a atividade seletiva do composto quando exposto à ação do ferro intracelular.

Foi efetuado um estudo em que foi comparada a estabilidade reacional de um tetraoxano selecionado para ensaios clínicos, o RKA 182 (Figura 1.9), com um trioxolano, através da exposição de ambos a um meio com eritrócitos infetados. Registou-se que os trioxolanos degradam-se mais rapidamente no meio do que o RKA 182. Estes dados indicam que os tetraoxanos podem ter um maior intervalo temporal de eficiência no combate à infeção face aos trioxolanos e que são, efetivamente, mais estáveis no plasma^{29,30}.

A atividade parasiticida destes compostos foi ainda estudada noutros organismos, sendo neste momento também estudado o seu perfil citotóxico com vista à avaliação de uma possível atividade anti-cancerígena.

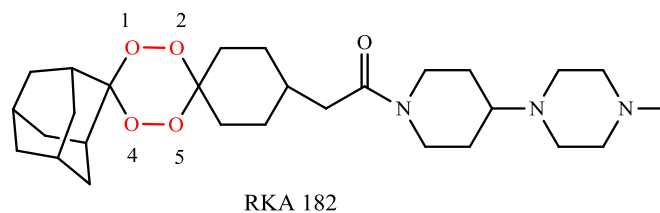


Figura 1.9. Representação da estrutura do tetroxano RKA 182³⁰.

1.1.5. 1,2-Dioxanos

Dadas as limitações que os trioxolanos possuem devido à sua fraca estabilidade metabólica, foi colocada a hipótese de moléculas com um grupo endoperóxido mais simples, como por exemplo um 1,2-dioxano, poderem ter o mesmo efeito antimalárico que os endopéroxidos anteriores. A partir de uma planta chinesa, foi isolado o Yingzhaosu A (figura 1.10) estruturalmente um 1,2 dioxano³¹. Como o isolamento e utilização do Yingzhaosu A era difícil, foram sintetizados derivados semi-sintéticos do Yingzhaosu A que tivessem a função 1,2-dioxano na sua estrutura. Destes derivados foi selecionado o artefleno (figura 1.10) para testes *in vitro*, que apresentou uma estabilidade metabólica superior à exibida pela ART e seus derivados, como consequência da acrescida estabilidade estrutural do anel 1,2-dioxano³². Foi posteriormente demonstrado que estes compostos, após clivagem reductiva catalisada por ferro, geram espécies radicalares e uma chalcona, sendo esta um inibidor de falcipainas. Ou seja, estas moléculas híbridas podem exercer efeito farmacológico através de dois modos de ação (fármacos híbridos ou bifuncionais).

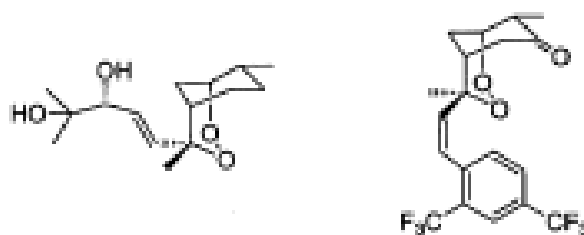


Figura 1.10. Representação das estruturas do Yingzhaosu A (esquerda) e do artefleno (direita)³².

1.1.6. Agentes de ligação ao ADN

O genoma do parasita da malária é fundamentalmente diferente do genoma humano no que diz respeito ao conteúdo em adenina (A) e timina (T) (80% A e 60% T)³³. Esta diferença significativa sugere a oportunidade de sintetizar moléculas com capacidade para se ligarem seletivamente a estas sequências alvo, o que pode proporcionar um avanço na resolução de problemas de seletividade³⁴.

Existem compostos que representam uma classe promissora de potentes agentes antitumorais, antibióticos, e antivirais que se ligam ao “minor” e “major groove” do ADN através de forças de intermoleculares (interações não-covalentes), com elevada seletividade nas bases adenina (A) e timina (T)³⁵. Estes compostos são análogos de derivados de produtos naturais tais como a netropsina (Figura 1.11) e distamicina A (Figura 1.11)³⁶.

A distamicina A é um antibiótico oligopeptídico com três anéis pirrólicos que tem sido usado como vetor de agentes alquilantes. Foram estudados derivados pirrólicos da distamicina A, com diferentes terminais, como agentes alvo ao ADN e vários desses derivados apresentam maior atividade do que a distamicina A. A citotoxicidade destes compostos pode ser explicada pela sua capacidade para se ligar ao ADN e/ou para inibir a atividade catalítica da topoisomerase I³⁶.

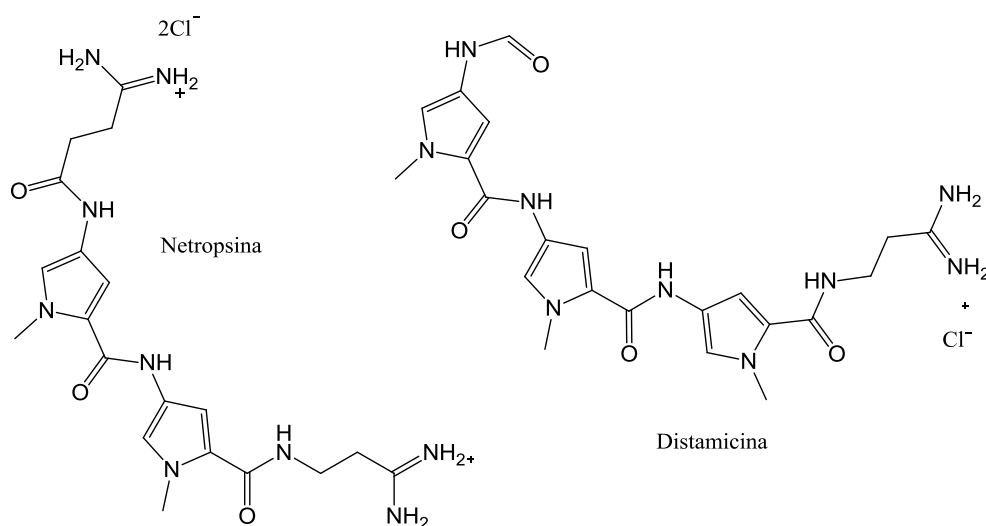


Figura 1.11. Representação das estruturas de agentes de ligação ao ADN.

Objetivos

Com base na informação disponível na literatura, propusemo-nos desenvolver, numa perspetiva de terapia de combinação, moléculas alvo que incluam um agente seletivo de ligação ao ADN do parasita e um peróxido.

Os compostos-alvo foram concebidos de modo a permitir a possibilidade de diferentes mecanismos de ação. Assim estes alvos incluem um farmacóforo (endoperóxido), que irá ser ativado pelo ferro no interior das células infetadas por *Plasmodium*, acoplado a um agente que permita direcionar o conjunto para o ADN, provocando assim a clivagem do mesmo por formação de radicais ou alquilação das bases, inibindo assim a replicação.

Neste trabalho, os agentes farmacológicos escolhidos e preparados foram peróxidos derivados da artemisinina e trioxolanos (bloco peroxídico), e análogos da distamicina A, um polipirrol que se ligue à fenda menor “minor groove” do ADN, rico em adenina (A) e timina (T), aumentando assim a seletividade do fármaco (bloco de ligação ao ADN).

Foram sintetizados vários agentes com potencial para ligação ao ADN, e dois deles foram usados para a tentativa de preparação dos diferentes alvos. Estes dois ligandos variam relativamente à flexibilidade da cadeia e ao modo de ligação ao ADN. Esta dupla possibilidade pode ajudar na elucidação do mecanismo de ação dos endoperóxidos-polipirrólicos e na validação de ADN como um alvo terapêutico importante na quimioterapia da malária.

A diversidade estrutural foi introduzida com a finalidade de permitir estudos de relação estrutura-atividade.

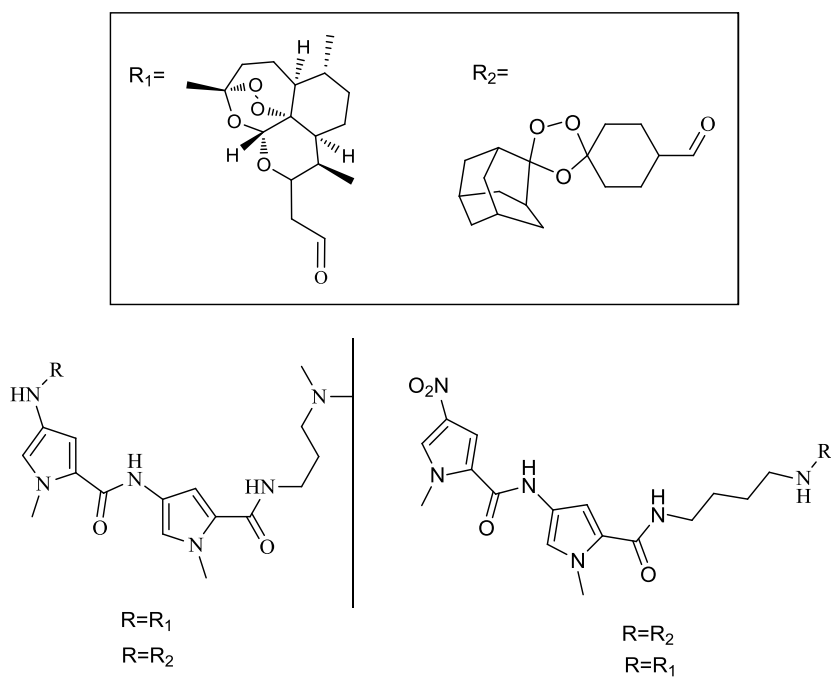


Figura 1.12. Representação das estruturas gerais dos compostos-alvo.

II. Síntese desenvolvida e discussão dos resultados obtidos

Neste capítulo será discutido o trabalho desenvolvido neste projeto bem como os resultados obtidos ao longo do mesmo.

Como foi referido na introdução, o principal objetivo do trabalho realizado centrou-se na síntese de moléculas que contenham um endoperóxido com atividade anti-malária acoplado a um agente de ligação ao ADN. Optou-se por preparar compostos análogos à distamicina A (Figura 1.9), que se irão ligar seletivamente ao ADN do parasita, a fim de diminuir o risco de citotoxicidade no hospedeiro. Introduziu-se diversidade química nos conjugados alvo propostos de forma a permitir a recolha de informação relativamente a efeitos estruturais na atividade anti-malária e citotoxicidade.

2.1. Sínteses desenvolvidas e propostas mecanísticas

No decorrer deste trabalho foram sintetizados os agentes de ligação ao ADN 6, 10, 31 e 35 (figuras 2.1, 2.7 e 2.8). Seguiram-se protocolos descritos na literatura^{36, 40, 41}, com algumas modificações e otimizações para a formação destes ligandos.

As estratégias de síntese dos agentes de ligação ao ADN estão esquematizadas nas figuras 2.1, 2.7 e 2.8. Para preparar o dímero 6 (Figura 2.1), N-metilpirrole (1, Figura 2.1) um composto comercialmente disponível, foi acilado com cloreto de tricloroacetilo, originando o 1-metil-2-tricloroacetilpirrole (2, Figura 2.1). A nitração do composto 2 foi efetuada com ácido nítrico em anidrido acético, num banho a -40°C. Após precipitação com hexano gelado recolheu-se o derivado nitrado em posição 4 (3, Figura 2.1). Em seguida este composto 3 foi tratado com 3,3-dimetilaminopropilamina e N-boc-1,4-butanediamina originando as respetivas amidas 4 e 7 (Figura 2.1). A nitroamida 4, dissolvida em metanol foi hidrogenada à pressão atmosférica sobre paládio em carbono (10%). Após a conclusão da reação, removeu-se o solvente e a amina resultante foi então acoplada ao composto 3, em THF, originando o dímero 6 (Figura 2.1) que foi purificado. Estas duas etapas ocorrem em “one pot” e em condições anidras. Utilizou-se um procedimento semelhante para a preparação da amida 9

(Figura 2.1). Para obter o dímero 10 (Figura 2.1), procedeu-se a um último passo de reação, a desproteção do grupo amina, recuperando a amina primária.

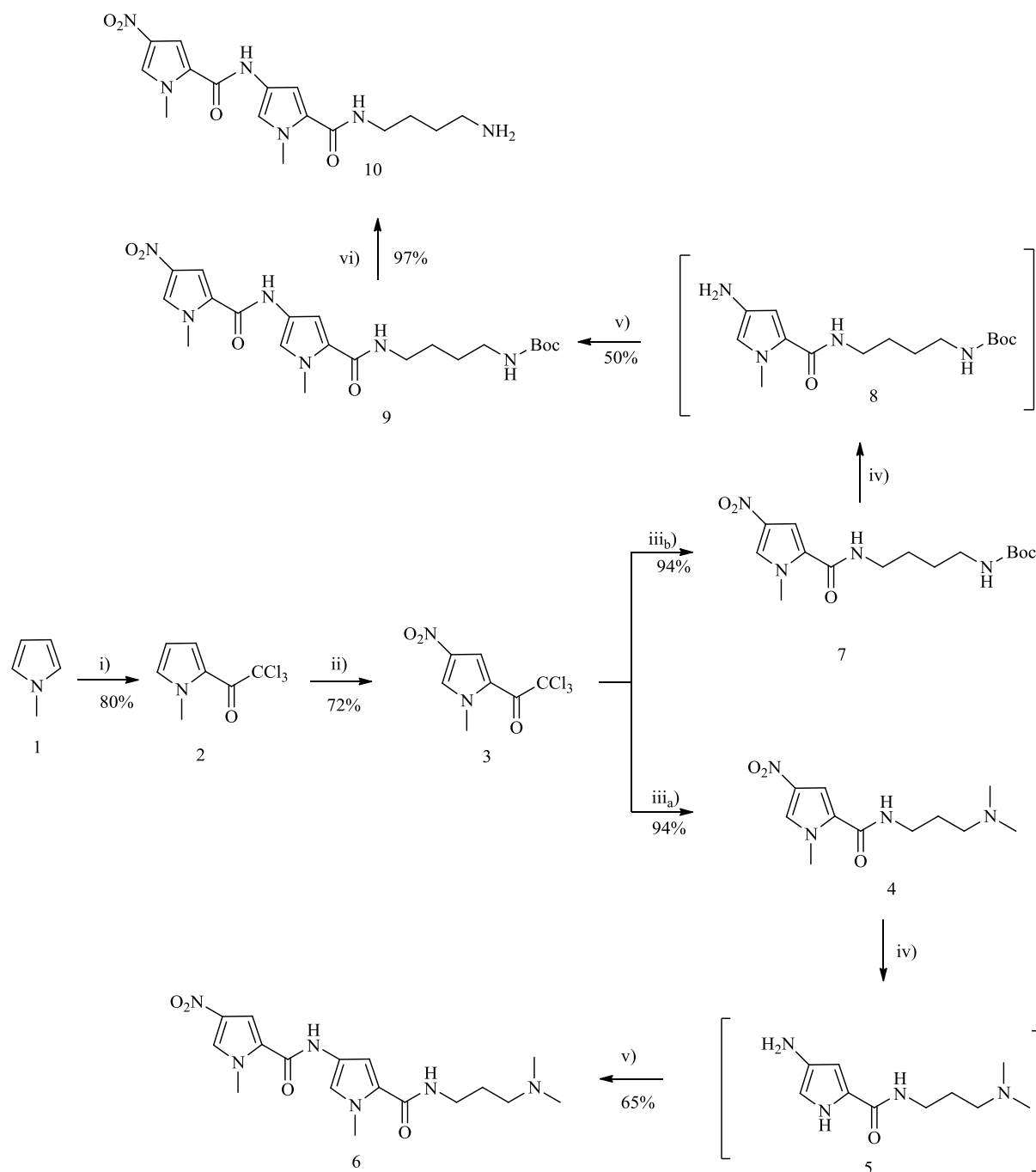


Figura 2.1. Esquema representativo da estratégia de síntese para preparação dos agentes de ligação ao ADN.

A síntese do dímero 14 foi realizada em três passos, sendo que os dois últimos passos foram feitos em “one pot”. O primeiro passo de reação é a nitração do composto 11. Este composto nitrado é em seguida reduzido à correspondente amina primária, 13. Esta amina é subsequentemente acoplada ao composto 3, em THF, originando, após purificação, o dímero 14 (Figura 2.2).

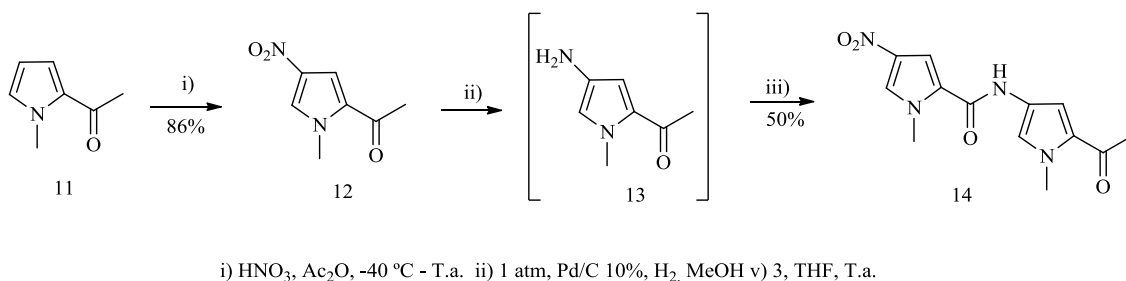


Figura 2.2. Representação da abordagem sintética aos agentes de ligação ao ADN; composto 14.

Para a síntese do dímero 18 usaram-se duas estratégias diferentes, mas ambas têm como material de partida o N-metilpirrol 1. Usou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para originar os compostos 2 e 3. A partir destes formaram-se os respectivos ésteres 15 e 16 usando metanol e sódio metálico. Fez-se uma nitração do composto 15, nas condições acima descritas, obtendo-se o composto 16 e em seguida utilizou-se um procedimento de acoplamento semelhante ao usado para a preparação do dímero 14 (Figura 2.2) para obter o dímero 18 (Figura 2.3).

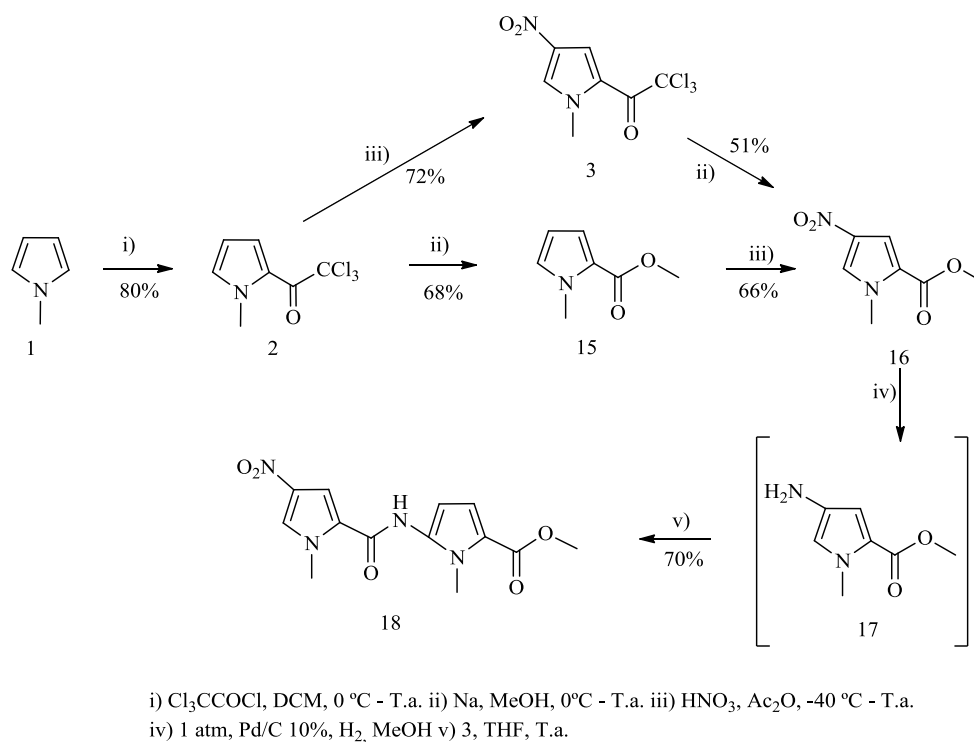


Figura 2.3. Representação da abordagem sintética aos agentes de ligação ao ADN; composto 18.

▪ Proposta mecanística para a reação de acilação do N-metilpirrole.

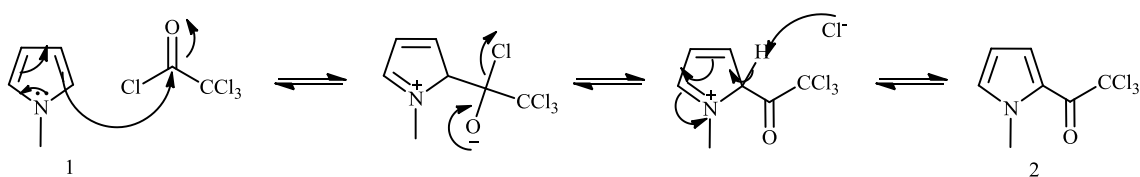


Figura 2.4. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 2.

▪ Proposta mecanística de reacção para a nitração do anel de pirrole

A proposta mecanística correspondente à nitração é idêntica para todos os compostos que foram tratados com ácido nítrico e anidrido acético (compostos 3, 12, 16), está seguidamente se esquematiza.

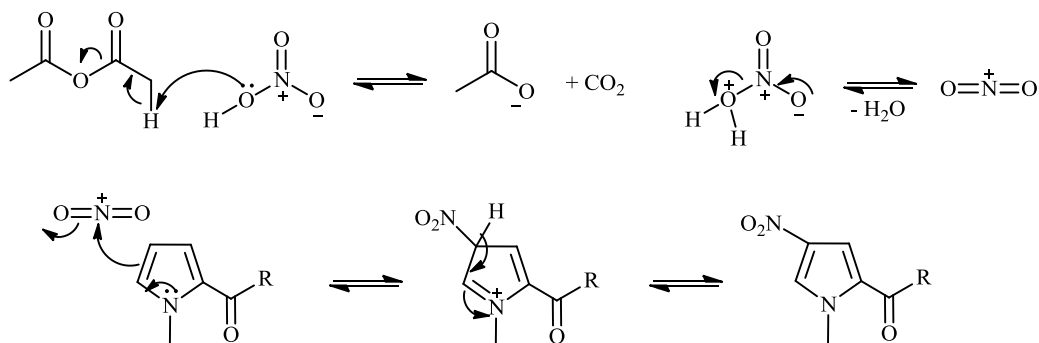


Figura 2.5. Proposta de mecanismo de reação relativo às nitrações.

▪ *Proposta de mecanismo de reacção para a formação das amidas*

O mecanismo proposto para a formação das diferentes amidas preparadas ao longo do projeto de investigação (compostos 4, 6, 7, 9, 14, 18), é o que seguidamente se esquematizo.

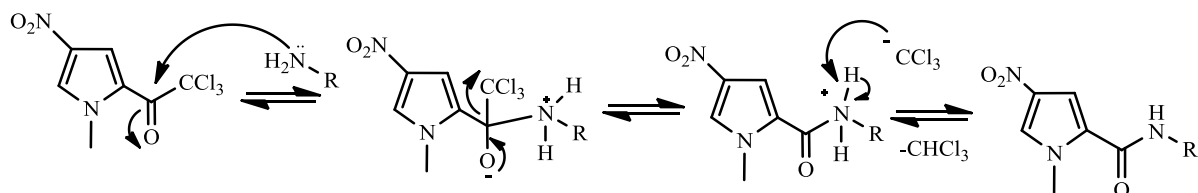


Figura 2.6. Proposta de mecanismo de reação relativo à formação das diferentes amidas.

▪ *Proposta de mecanismo de reacção para a redução do grupo nitro a amina*

O mecanismo de reação proposto para as reduções feitas com H₂, ao longo do projeto de investigação, em presença de Pd/C (10%) está seguidamente esquematizado. Este mecanismo envolve adição de H₂ em presença de paládio, e a reação ocorre em meio heterogénio.

O hidrogénio é adsorvido à superfície do paládio. A subsequente adsorção do composto que contém o grupo nitro sobre a superfície do paládio é seguida pela adição de dois átomos de hidrogénio a este grupo formando a hidroxilamina intermediária. Esta é subsequentemente reduzida obtendo-se a amina final⁴².

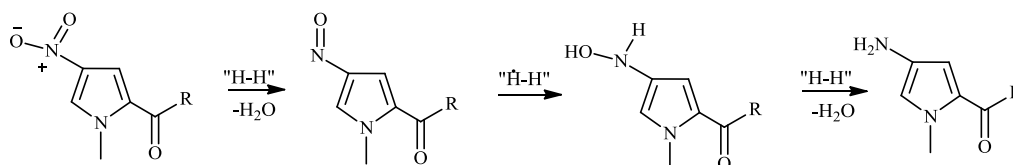


Figura 2.7. Proposta de mecanismo de reação relativo à redução do composto nitrado à amina correspondente em presença de paládio sobre carbono.

▪ Proposta mecanística para a formação do composto 15

O mecanismo proposto para a metanólise do composto 2, na presença de metanol e sódio com formação ao éster 15, está esquematizado na figura 2.8.

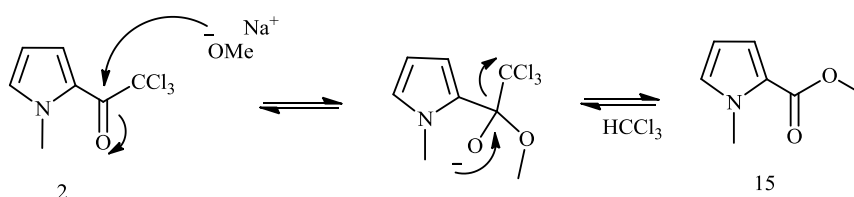


Figura 2.8. Proposta de mecanismo de reação para a formação do éster 15.

▪ Proposta mecanística para a formação da amina 10

O mecanismo proposto para a desproteção da função amina no composto 9 está seguidamente esquematizado.

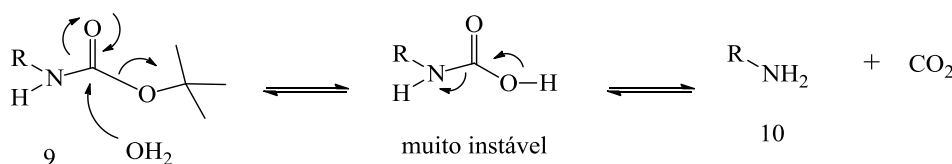
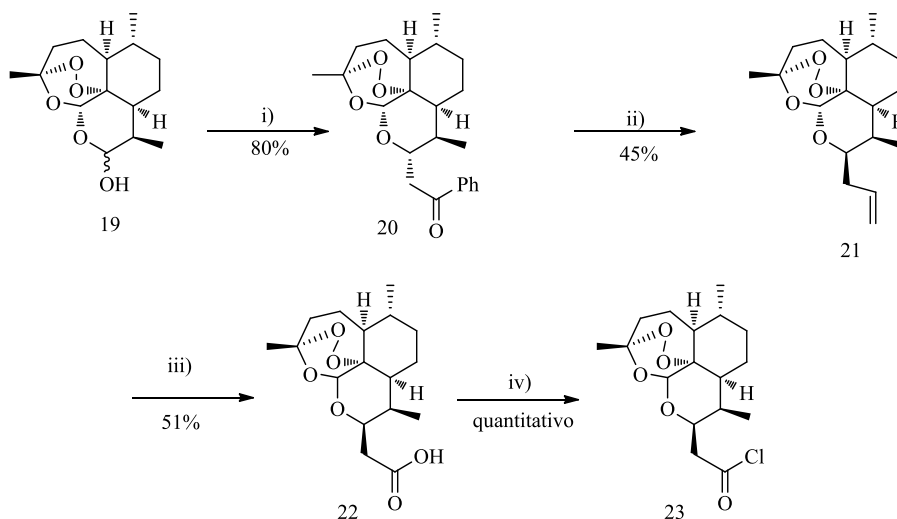


Figura 2.9. Proposta de mecanismo de reação para a formação da amina 10, a partir do carbonato correspondente.

Com o objetivo da preparação da primeira série de endoperóxidos para acoplamento aos agentes de ligação ao ADN, modificou-se a ART, de modo a introduzir grupos funcionais na posição C-10 da ART. Utilizou-se um procedimento descrito na literatura^{38,39}, que se otimizou. Esta via sintética inicia-se pela conversão da DHA no respetivo benzoato 20. Para a formação do respetivo derivado alílico 21, usou-se cloreto de zinco como ácido de Lewis e alil-trimetilsilano como agente de transferência do grupo alilo. O ácido carboxílico desejado

22, foi preparado a partir do derivado alílico 21 por clivagem oxidativa da ligação dupla terminal com periodato de sódio e permanganato de potássio. A partir do ácido preparou-se por halogenação o cloreto de ácido 23, altamente reativo e foi obtido tratando o ácido carboxílico com cloreto de tionilo usado sem purificação (Figura 2.10).



i) Cloreto de benzoílo, piridina, DCM, 0°C - T.a. ii) Alil-trimetilsilano, ZnCl₂, 1,2-dicloroetano, 0°C - T.a.
 iii) NaIO₄, KMnO₄, acetona/H₂O, T.a. iv) Cloreto de tionilo, DCM, 0°C - T.a.

Figura 2.10. Abordagem sintética à preparação de derivados de ART com ligação a carbono na posição C-10.

▪ *Proposta do mecanismo de reacção para a preparação do benzoato de ART, 20.*

O mecanismo de reacção proposto para a conversão de DHA no respetivo benzoato, usando cloreto de benzoílo, é seguidamente apresentado. Trata-se de uma esterificação da DHA.

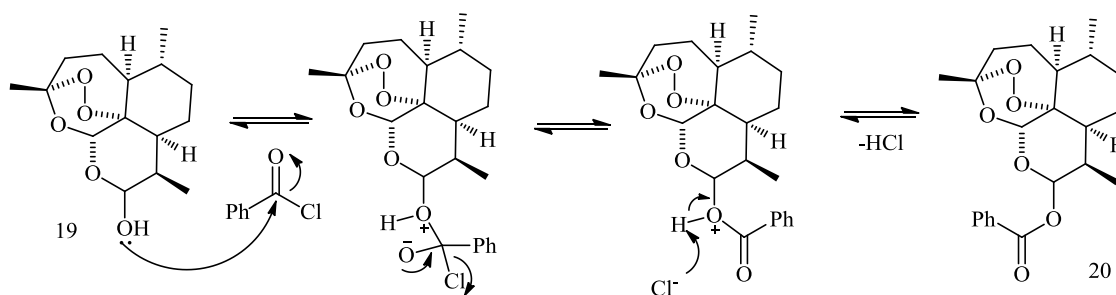


Figura 2.11. Proposta de mecanismo de reacção para a formação do composto 20.

▪ *Proposta mecanística para a formação de alil-ART, 21.*

O mecanismo proposto para a reação de formação do derivado alílico de ART, na presença do ácido de Lewis e trimetilsilano, a partir do benzoato de ART, apresenta-se na figura 2.12.

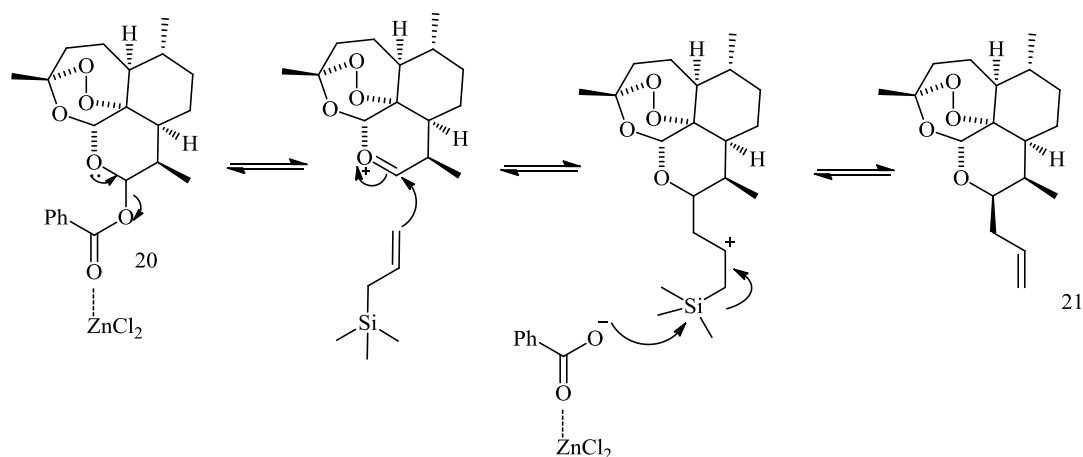


Figura 2.12. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 21.

▪ *Proposta do mecanismos de reacção para a preparação do composto 22.*

O mecanismo proposto para a conversão do alil-ART no ácido carboxílico correspondente apresenta-se em seguida e envolve uma clivagem oxidativa da dupla ligação seguida de oxidação do aldeído a ácido, sendo ambos os processos mediados por permanganato de potássio.

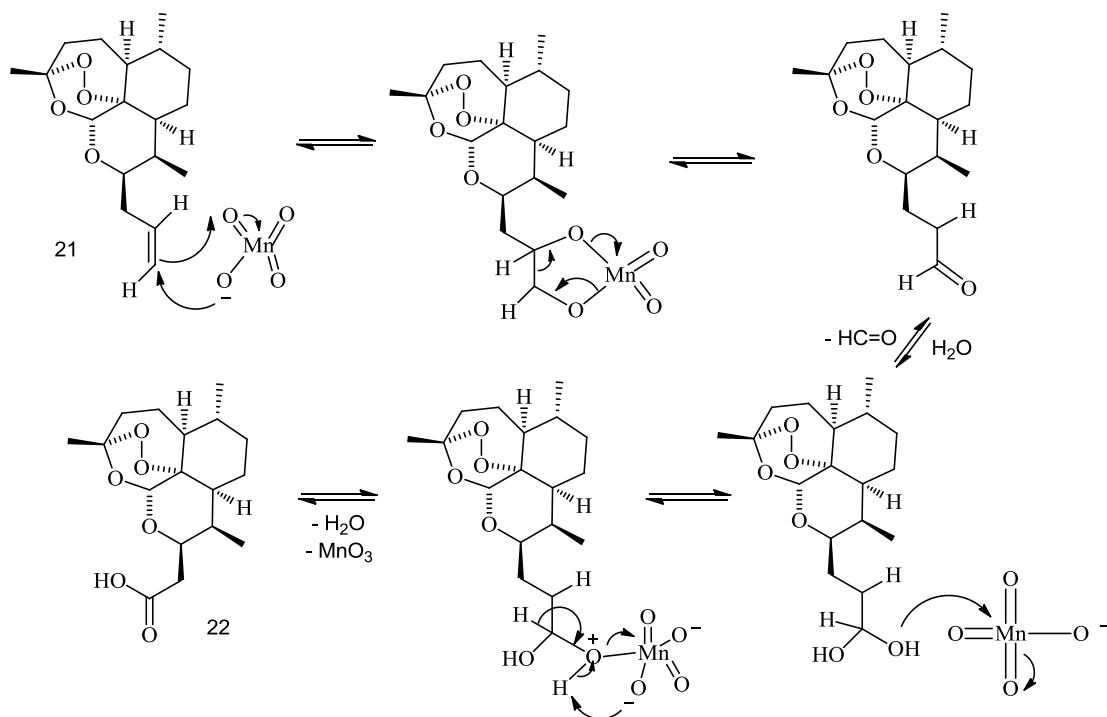


Figura 2.13. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 22.

▪ Proposta do mecanismo de halogenação do composto 22.

O mecanismo proposto para a formação do cloreto de ácido a partir do respectivo ácido carboxílico, usando cloreto de tionilo como agente halogenante está seguidamente apresentado.

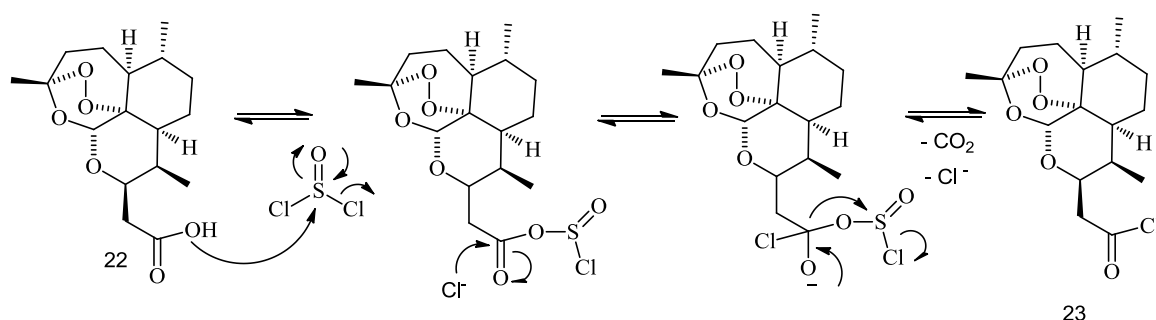
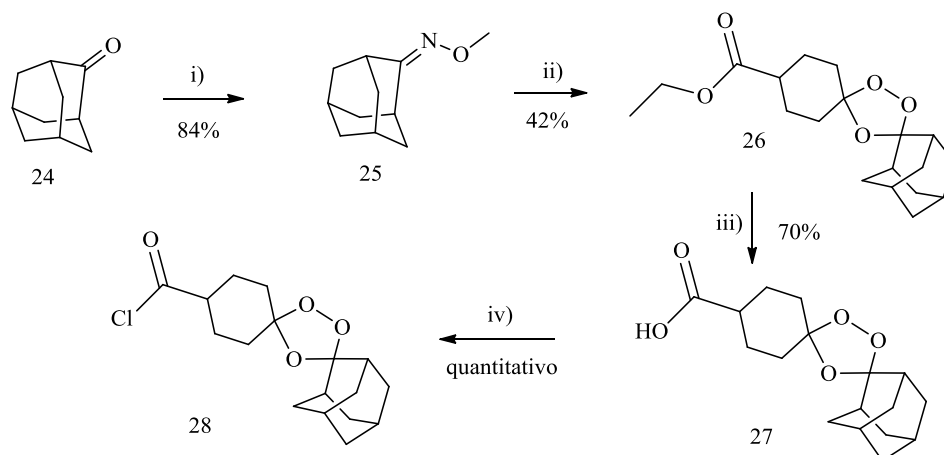


Figura 2.14. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 23.

A rota sintética seguida para a síntese dos trioxolanos foi baseada na abordagem de Vennerstrom²⁴, em que se prepara inicialmente a metiloxima de adamantanona 25, por reação da 2-adamantanona 24 com hidrocloreto de metoxilamina na presença de piridina. Procede-se em seguida ao acoplamento de 4-oxociclohexil-etil-éster, com a metiloxima, 25, por ozonólise obtendo o trioxolano 26, que, em seguida, por hidrólise se converte no ácido carboxílico

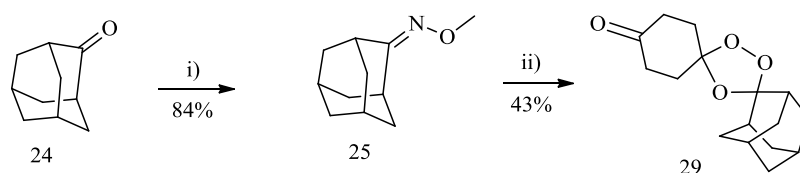
correspondente, 27. Este, por reação com cloreto de tionilo, forma o cloreto de ácido 28, também este bastante reativo (Figura 2.15).



i) Hidrocloreto de metoxilamina, MeOH, Piridina, T.a. ii) O₃, -78°C, DCM/Pentano, 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo, iii) MeOH, KOH (aq), 50°C iv) Cloreto de tionilo, DCM, 0°C - T.a.

Figura 2.15. Representação da abordagem sintética à preparação de trioxolanos; trioxolano 28.

Usando uma estratégia semelhante o composto 29 (Figura 2.16) foi obtido a partir da metiloxima de adamantanona, 25, e de ciclohexadiona, por ozonólise, seguindo o procedimento acima descrito.



i) Hidrocloreto de metoxilamina, MeOH, Piridina, T.a.
ii) O₃, -78°C, DCM/Pentano, ciclohexadiona

Figura 2.16. Representação da abordagem sintética à preparação do trioxolano 29.

▪ *Proposta do mecanismo de formação da metiloxima 25.*

O mecanismo proposto para a formação da metiloxima de adamantanona, encontra-se esquematizado na figura 2.17.

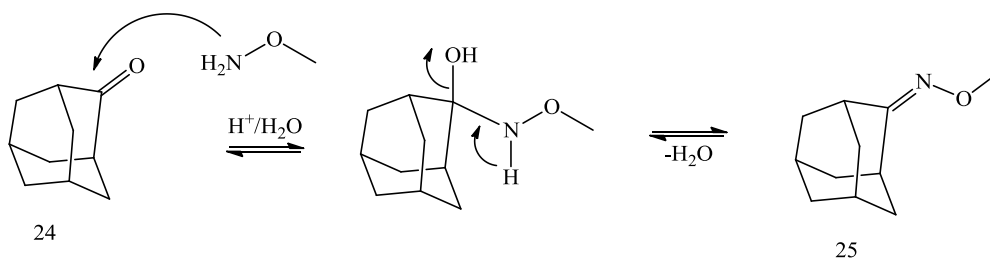


Figura 2.17. Proposta de mecanismo de reação para a formação do composto 25.

▪ Proposta do mecanismo para a reação de ozonólise; composto 26.

O mecanismo proposto para a formação a ozonólise a partir da metiloxima de adamantanona e ozono, é seguidamente apresentado.

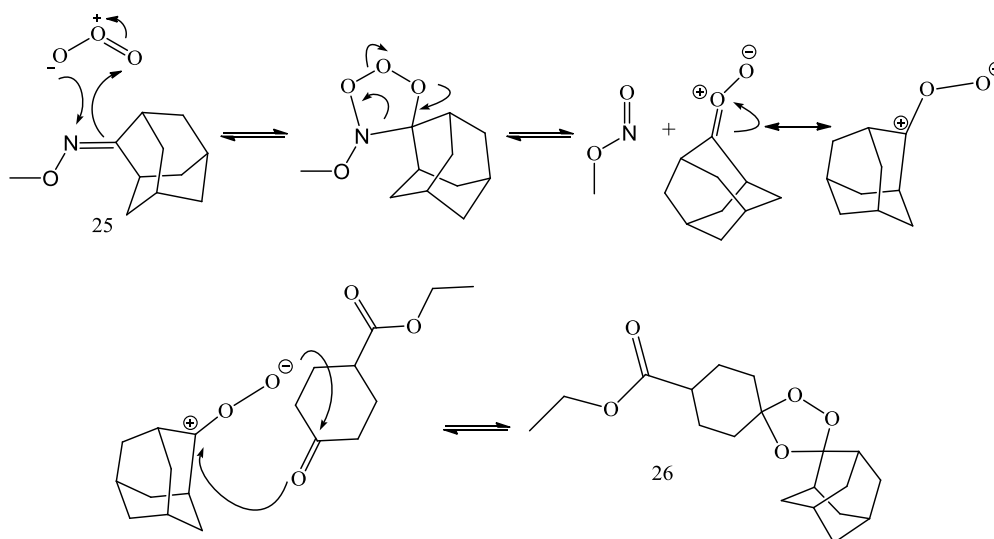
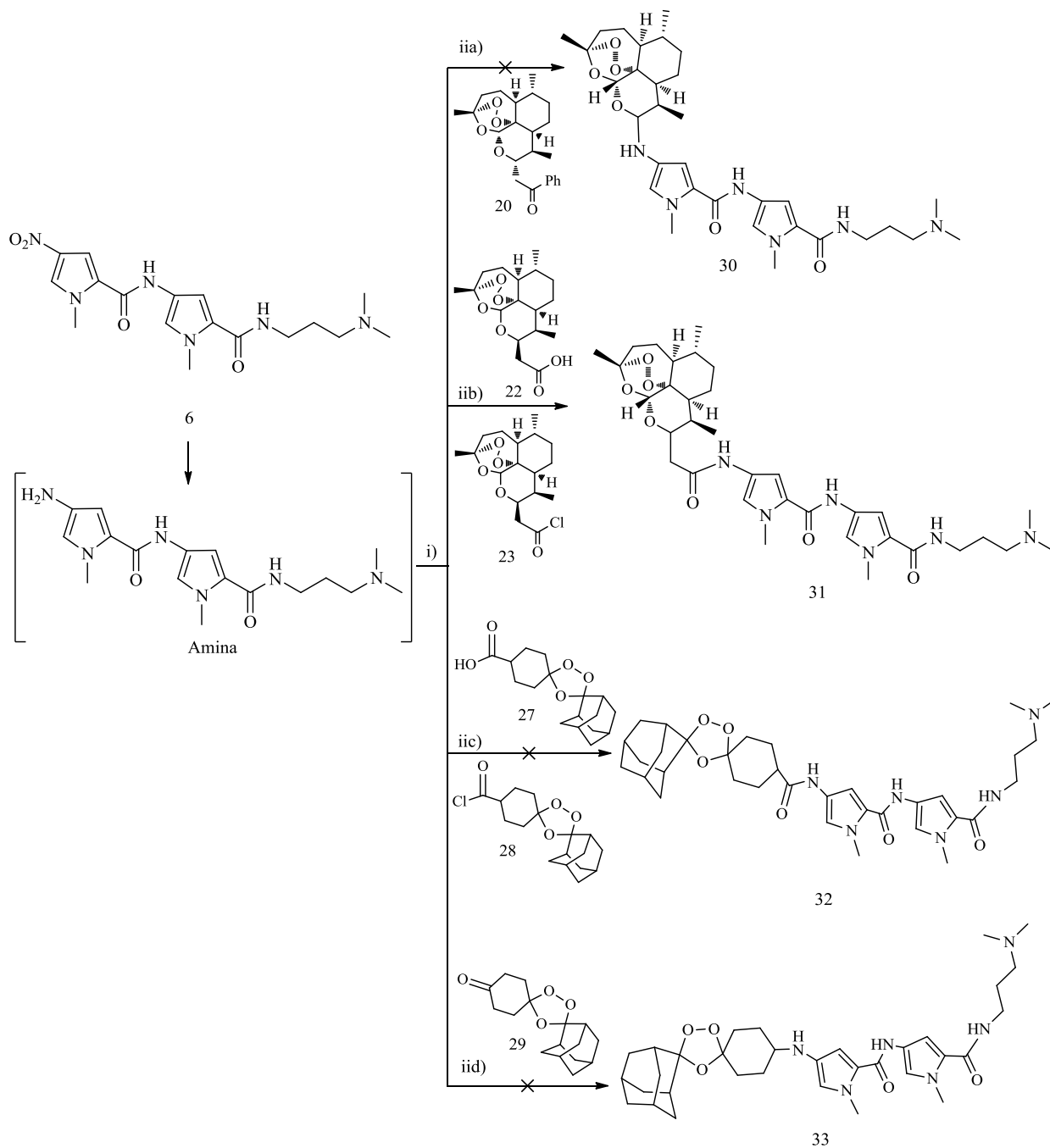


Figura 2.18. Mecanismo de reação para a formação do ozonídeo 26.

Preparados os blocos de construção correspondentes ao peróxido e ao agente de ligação ao ADN restava efetuar o acoplamento dos blocos para obter os conjugados alvo.

Fizeram-se várias tentativas para a obtenção destes compostos finais, 30 a 33, todas elas envolvendo como primeira etapa a hidrogenação do derivado nitrado do dipirrol 6, seguindo a metodologia descrita acima, seguido de acoplamento ao bloco que contém o endoperóxido (Figura 2.19).



i) 1 atm, Pd/C 10%, H₂, MeOH ii a) 20, DMF, Trietilamina, ZnCl₂, T.a.
 ii b) 22/23, THF, T.a. ii c) 27/28, THF, T.a. ii d) 29, THF, Trietilamina, T.a.

Figura 2.19. Representação à abordagem sintética dos conjugados alvo.

Para a formação do composto alvo 30, tentou-se acoplar a amina derivada do composto 6 ao benzoato 20, usando um ácido de Lewis. Para a formação dos compostos 31 e 32, fizeram-se duas tentativas diferentes:

I. Tentou-se um acoplamento peptídico fazendo reagira os cloretos de ácido 23 e 28 com a amina derivada de 6.

II. Partindo dos ácidos carboxílicos 22 e 27, sintetizaram-se os respectivos cloretos, sem os isolar, procedeu-se ao acoplamento com a amina, ou seja, tentou fazer-se a reação em “one pot” e em condições anidras.

Por último, tentou-se acoplar o composto 29 à respetiva amina, preparada por hidrogenação do composto 6.

Para a obtenção dos compostos alvo 34 e 35 (Figura 2.20), fizeram-se as mesmas tentativas, como descrito acima para a formação do composto 31 e 32, partindo da amina primária dipirrólica 10.

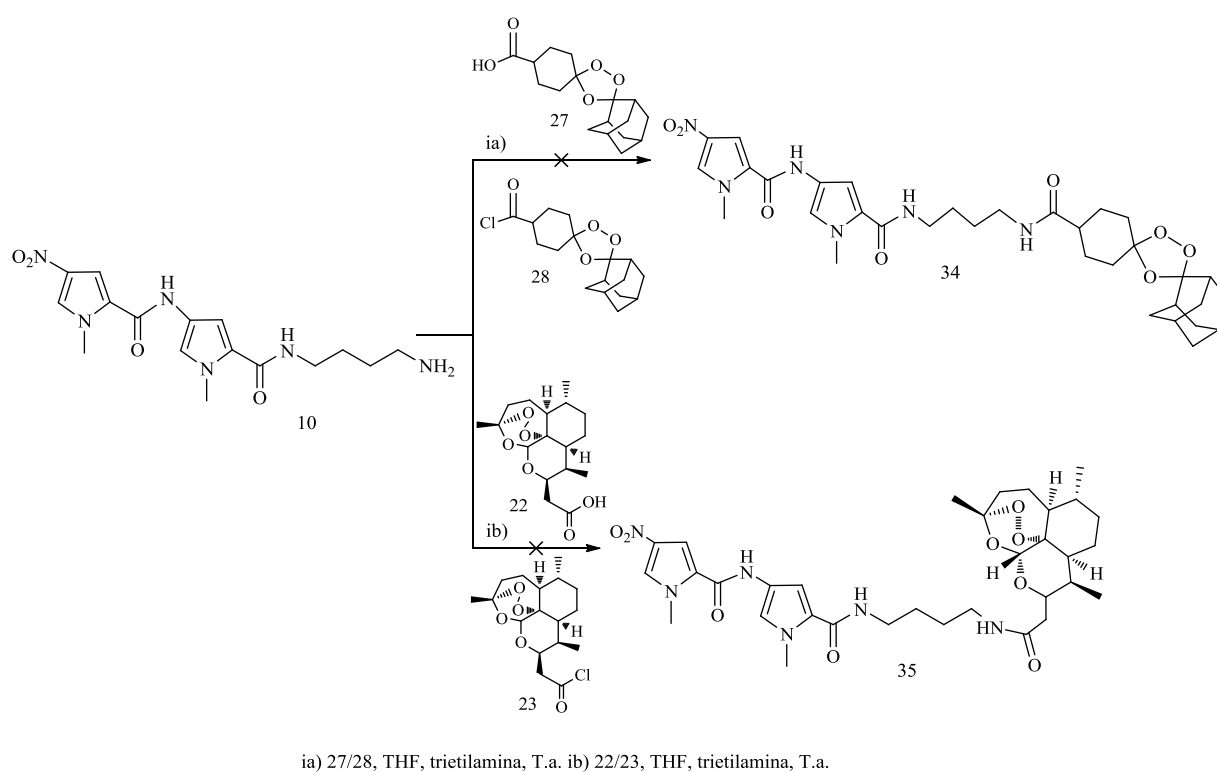


Figura 2.20. Representação à abordagem sintética aos compostos alvo.

▪ *Proposta do mecanismo de reacção para a tentativa de formação dos compostos alvo.*

O mecanismo previsto para a formação dos diferentes alvos ao longo do projeto de investigação (compostos 31, 32, 34, 35), onde R representa o bloco peroxidico e R₂ o agente de ligação ao ADN, encontra-se representado na figura 2.21.

Trata-se de um acoplamento peptídico usando o cloreto de ácido como eletrófilo, pelo que seria de esperar que a reação ocorresse com facilidade.

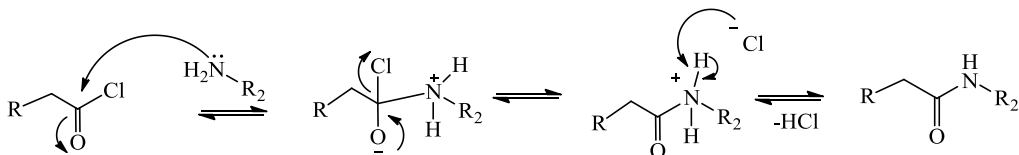


Figura 2.21. Proposta de mecanismo de reação para a formação dos compostos alvo.

O mecanismo previsto para a formação do composto 30 está representado abaixo.

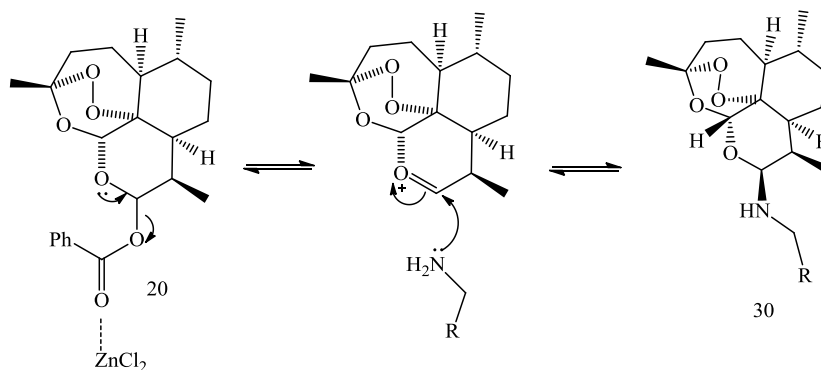


Figura 2.22. Mecanismo de reação para a formação do composto alvo 30.

O mecanismo para a formação do composto 33 está representado abaixo. Trata-se de uma aminação redutiva.

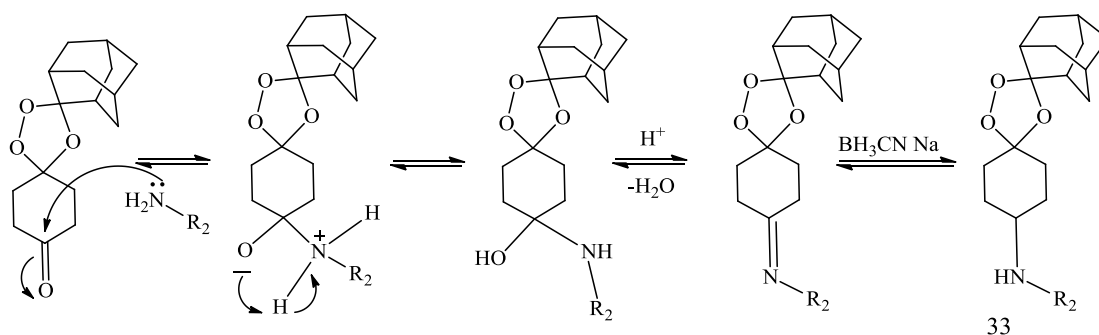


Figura 2.23. Mecanismo de reação para a formação do composto alvo 33.

Infelizmente nenhuma das tentativas de acoplamento conduziu aos alvos desejados.

2.2. Discussão dos resultados obtidos

2.2.1 Otimização das estratégias de síntese dos blocos contendo os agentes de ligação ao ADN

Na figura 2.24 estão representadas as estruturas de todos os derivados de N-metilpirrolo preparados neste trabalho. A preparação destes compostos teve como objetivo a síntese dos agentes de ligação ao ADN, compostos 6, 10, 14, 18.

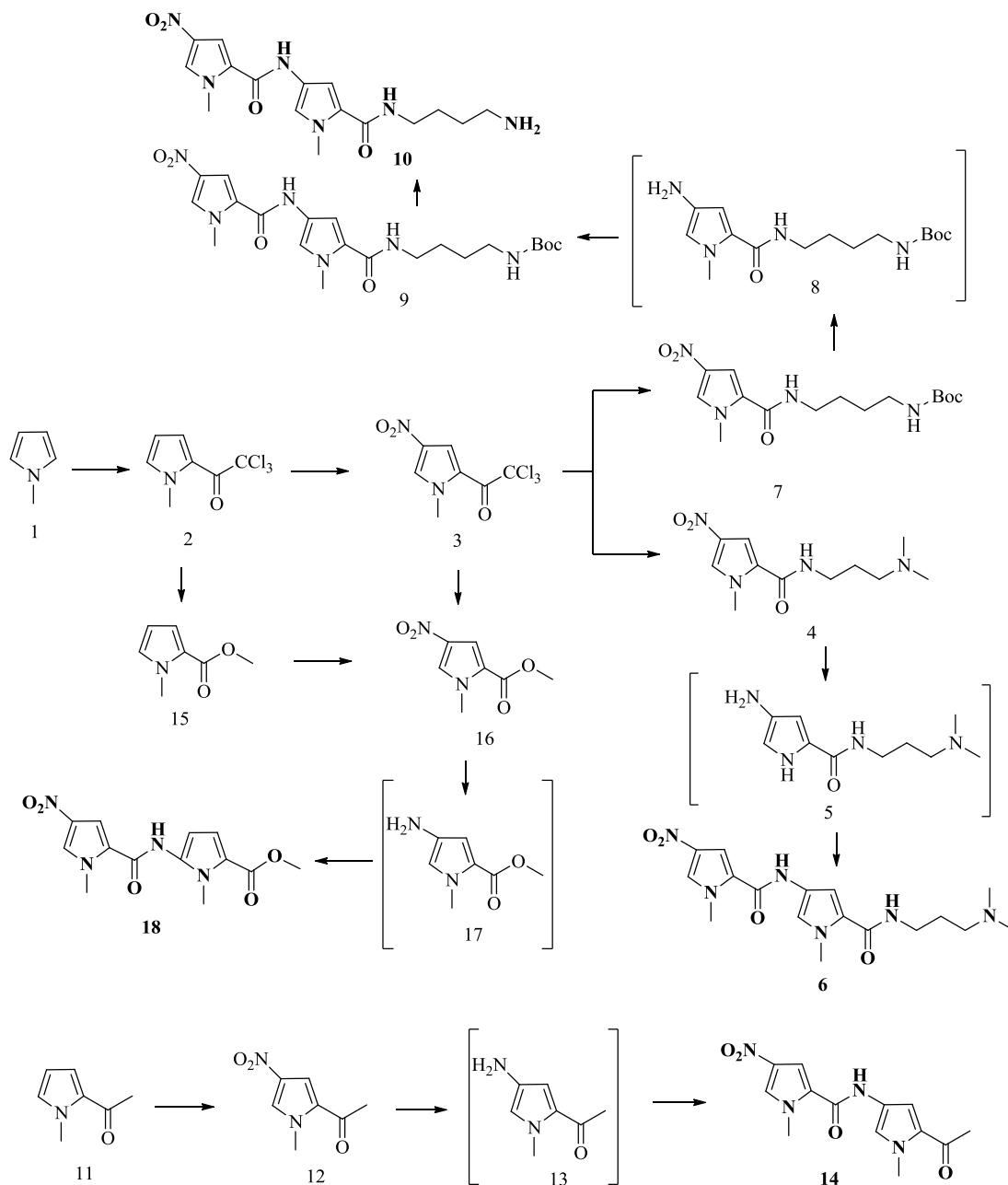


Figura 2.24. Representação esquemática das sínteses desenvolvidas para os diferentes derivados de pirrolo.

Foram preparados, isolados e caracterizados quatro agentes de ligação diferentes (compostos 6, 10, 14 e 18).

O composto 2 foi obtido com um bom rendimento experimental, mas inferior ao descrito na literatura³⁶, podendo a diferença dever-se à purificação e recristalização do produto. Este foi isolado com um elevado grau de pureza o que se confirma pelo intervalo de fusão do composto.

O composto 3 foi obtido por nitração, como descrito anteriormente, com um bom rendimento e com um elevado grau de pureza. Análise por ¹H-RMN mostra o desaparecimento do sinal característico da ressonância do hidrogénio que é substituído pelo grupo nitro, e devido a este grupo ser electroatrator existe um desvio químico para campos mais baixos dos sinais correspondentes aos restantes protões do anel pirrólico. O infravermelho indica-nos também que houve formação deste produto, dado que se verifica a banda correspondente às vibrações características do grupo nitro.

Obteve-se o composto 4 com um excelente rendimento e com um elevado grau de pureza. No espectro de ¹H-RMN verifica-se o aparecimento dos sinais característicos da cadeia alílica. O infravermelho indica-nos também que houve formação deste produto, dado que se verificam as bandas de vibração características da ligação amida.

O composto 7 foi sintetizado com excelente rendimento e com um elevado grau de pureza. No espectro de ¹H-RMN verifica-se o aparecimento das bandas característicos da cadeia alílica e dos três grupos metilo do grupo protetor.

Obteve-se um bom rendimento para a formação do composto 12. No espectro de ¹H-RMN verifica-se que na região onde são espectáveis as ressonâncias dos aromáticos só aparecem dois picos, ou seja, houve a formação do respetivo composto nitrado. Por outro lado, observa-se um deslocamento para campo mais baixo dos sinais relativos aos restantes protões, devido ao efeito eletroatrator do grupo nitro. O espectro de massa também é indicativo de que se obteve o produto esperado, pois apresenta o pico relativo à massa do composto.

Na formação do éster metílico, composto 15 houve um cuidado especial no manuseamento do sódio, e o metanol teve de ser bem seco, tendo sido este acrescentado muito lentamente e em quantidades muito pequenas. O intervalo de fusão é relativamente pequeno o que indica que o composto apresenta um elevado grau de pureza.

O composto 16 foi obtido por dois métodos de síntese diferentes. Quando o material de partida é o composto 3, o composto já nitrado, e o fazemos reagir com sódio na presença de metanol, com os mesmos cuidados de manuseamento acima descritos. Verifica-se que o rendimento é menor, o que pode ser justificado por processos secundários de electroredução do grupo nitro, na presença do sódio (dador de eletrões e do solvente prótico). O infravermelho indica-nos que houve formação deste produto, dado que se verifica as bandas características do grupo nitro e da ligação carbono-oxigénio-carbono.

Para a formação dos dímeros 6, 9, 14 e 18, converteram-se os respetivos compostos nitrados nas aminas correspondentes e estas foram acopladas ao composto 3. Estes dois passos de reação foram efetuados em “one pot” pois todas as aminas formadas destes não podem ser isoladas pois são aminas primárias muito instáveis, que formam facilmente tautómeros.

O agente de ligação ao ADN 6 foi obtido com um bom rendimento e com um elevado grau de pureza. Comparando o espectro de ^1H -RMN do composto 4 com o do composto 6, observaram-se mais dois picos na região onde são espectáveis os sinais relativos aos protões aromáticos, indicativos da existência de dois anéis pirrólicos. O espectro de massa também é indicativo de que se obteve o produto esperado, pois apresenta o pico relativo à massa do composto.

O composto 9 apresenta um elevado grau de pureza. Comparando o ^1H -RMN do composto 7 com o do dímero 9 também se observam mais duas bandas na região onde são espectáveis os sinais relativos aos protões aromáticos, indicativos da existência de dois anéis pirrólicos. A massa apresenta o pico relativo ao produto desejado.

Obteve-se um rendimento quase quantitativo na desproteção da amina, e isolou-se a amina primária 10. No espectro de ^1H -RMN verifica-se que na região relativa às cadeias alílicas não são visíveis os picos relativos aos protões do grupo protetor *boc*. O espectro de massa também é indicativo de que realmente se formou o produto esperado, pois apresenta o pico espectral relativo ao produto.

O composto 14 apresenta um elevado grau de pureza. Comparando o espectro de ^1H -RMN do composto 12 com o do dímero 14 também se observam mais dois picos na zona onde é espectável observar as ressonâncias dos protões aromáticos, indicativos da existência de dois anéis pirrólicos.

Na formação do éster metílico, composto 18, o intervalo de fusão é relativamente pequeno o que indica que o composto apresenta um elevado grau de pureza. O espectro de massa é indicativo de que realmente se formou o produto esperado, pois apresenta o pico espectral relativo ao produto.

Relativamente à variabilidade estrutural nos agentes de ligação ao ADN, é de notar que o dímero 6 possui uma amina terciária na extremidade da cadeia que facilmente protona formando um ião amónio. Este pode ligar-se ao fosfato do ADN. Este ligando só apresenta uma ponte metileno. Por outro lado o dímero 10, tem estruturalmente uma cadeia mais longa e flexível, logo tem uma “liberdade” conformacional maior conferindo ao sistema uma maior flexibilidade. Esta característica pode ter implicações na ligação ao “minor groove” do ADN. Ou seja é espectável que os dois agentes interatuem com o ADN de forma diferente.

2.2.2. Otimização das estratégias de síntese que contêm as funções peróxido

Como referido, foram preparados os blocos que contêm o farmacóforo peroxidado. Consideraram-se duas classes: derivados de ART (trioxanos semi-sintéticos) e derivados de ozonídeo (trioxolanos). Relativamente aos derivados de ART, estão representados na figura 2.25 todos os compostos preparados.

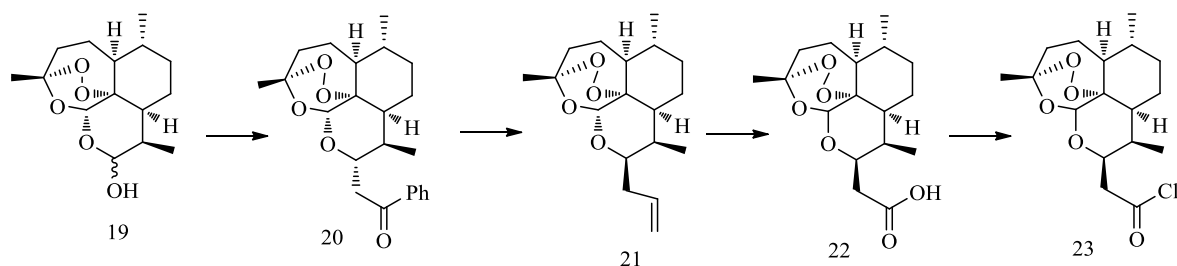


Figura 2.25. Representação esquemática das sínteses desenvolvidas para os diferentes derivados de ART modificados em posição C-10.

Obteve-se o benzoato a partir de DHA, composto 20, com um bom rendimento e um elevado grau de pureza. No espectro de ^1H -RMN verifica-se o aparecimento dos picos característicos da ressonância dos prótons aromáticos do grupo benzilo.

O derivado alílico da DHA, composto 21 foi obtido com um bom rendimento e o intervalo de fusão é indicativo de que o composto apresenta um elevado grau de pureza. Este composto não foi enviado para $^1\text{H-RMN}$, pois o nosso grupo já o tinha obtido anteriormente. Assim sendo, este foi comparado por intervalo de fusão e por TLC.

O ácido carboxílico derivado da alil-artemisinina, 22 foi obtido, isolado e caracterizado. O espectro de massa indica-nos que efetivamente se conseguiu sintetizar o produto pretendido.

Na figura 2.26 estão representadas as estruturas de todos os derivados de ozonídeo (trioxolanos) preparados neste trabalho.

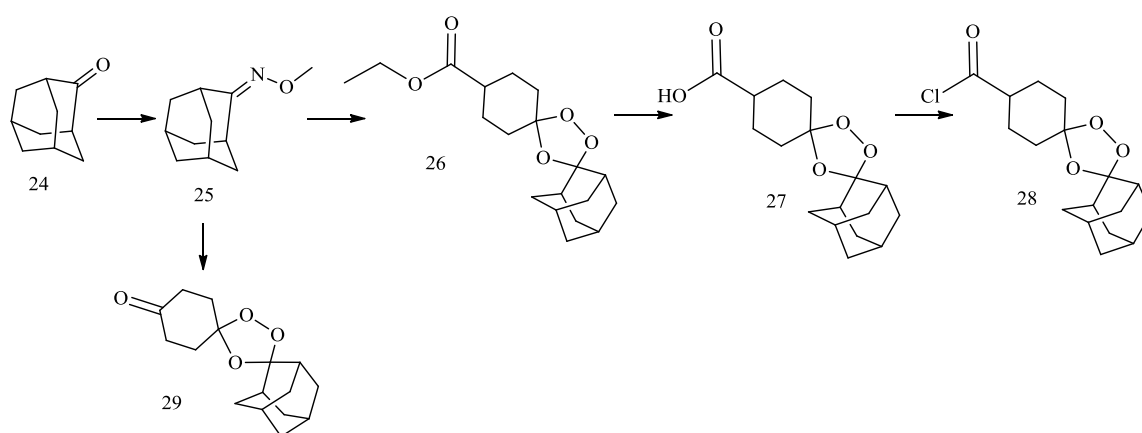


Figura 2.26. Representação esquemática das abordagens sintéticas à preparação dos diferentes trioxolanos.

Partindo da adamantanona, obteve-se a metiloxima, composto 25, com um bom rendimento e com um elevado grau de pureza. No espectro de $^1\text{H-RMN}$ deste composto verifica-se o aparecimento dos sinais relativos aos prótons do grupo metilo da oxima.

O composto 26 foi preparado por acoplamento de 25 com 4-oxociclohexil-etil-éster através de uma ozonólise. Esta reação pode formar os estereoisómeros *cis* e *trans* do ozonídeo. O isómero *trans*, que foi o que se formou em maior quantidade, é sólido, ao contrário do *cis* que é um óleo. No espectro de $^1\text{H-RMN}$ deste composto verifica-se o aparecimento dos picos correspondentes à formação do éster.

Da hidrólise do éster 26 ao correspondente ácido carboxílico obteve-se um produto isolado com elevado grau de pureza. Comparando o espectro de $^1\text{H-RMN}$ do composto 26, composto de partida, com o do produto, verifica-se o desaparecimento dos picos relativos aos prótons do grupo éster. O espectro de massa também é indicativo de que realmente se formou o produto esperado, pois apresenta o pico espectral relativo ao produto.

O ozonídeo 29 foi obtido por ozonólise a partir da metiloxima 25 e da ciclohexadiona. O composto foi obtido com elevada pureza, como comprovado por espectrometria de $^1\text{H-RMN}$ e pelo intervalo de fusão.

Na formação dos cloretos de ácido, compostos 23 e 28, houve um cuidado especial ao acrescentar o cloreto de tionilo pois este é extremamente corrosivo. A reação foi sempre conduzida em ambiente anidro pois este cloreto reage muito facilmente em presença de água. Por TLC verificou-se o desaparecimento completo das manchas relativas aos respectivos ácidos de partida o que indica que foram completamente convertidos nos respectivos cloretos. Numa primeira abordagem, os respectivos cloretos de ácido foram isolados e tentou-se caracterizá-los tanto por massa como por $^1\text{H-RMN}$, mas o que se observava nos respectivos espectros era os ácidos carboxílicos e não os cloretos. Sendo o cloreto um bom grupo abandonante, na presença de água volta a converter-se no respetivo ácido, por hidrólise.

2.2.3. Compostos alvo

Nas diferentes tentativas de acoplamento ao agente de ligação 6 aos blocos contendo os endoperóxidos para originar os compostos alvos 30 a 33, converteu-se o dímero 6 na respetiva amina tendo em vista o acoplamento dos blocos via formação de uma amina (alvos 30 e 33) ou amida (alvos 31 e 32) aos diferentes endoperóxidos, compostos 20, 22, 23, 27, 28 e 29. Estes dois passos de reação foram efetuados em “one pot” pois a amina formada a partir do composto nitrado não pode ser isolada por ser uma amina primária muito instável, formando facilmente tautómeros, como já foi referido anteriormente. A figura 2.27 apresenta uma representação esquemática do agente de ligação de partida e dos compostos alvo pretendidos.

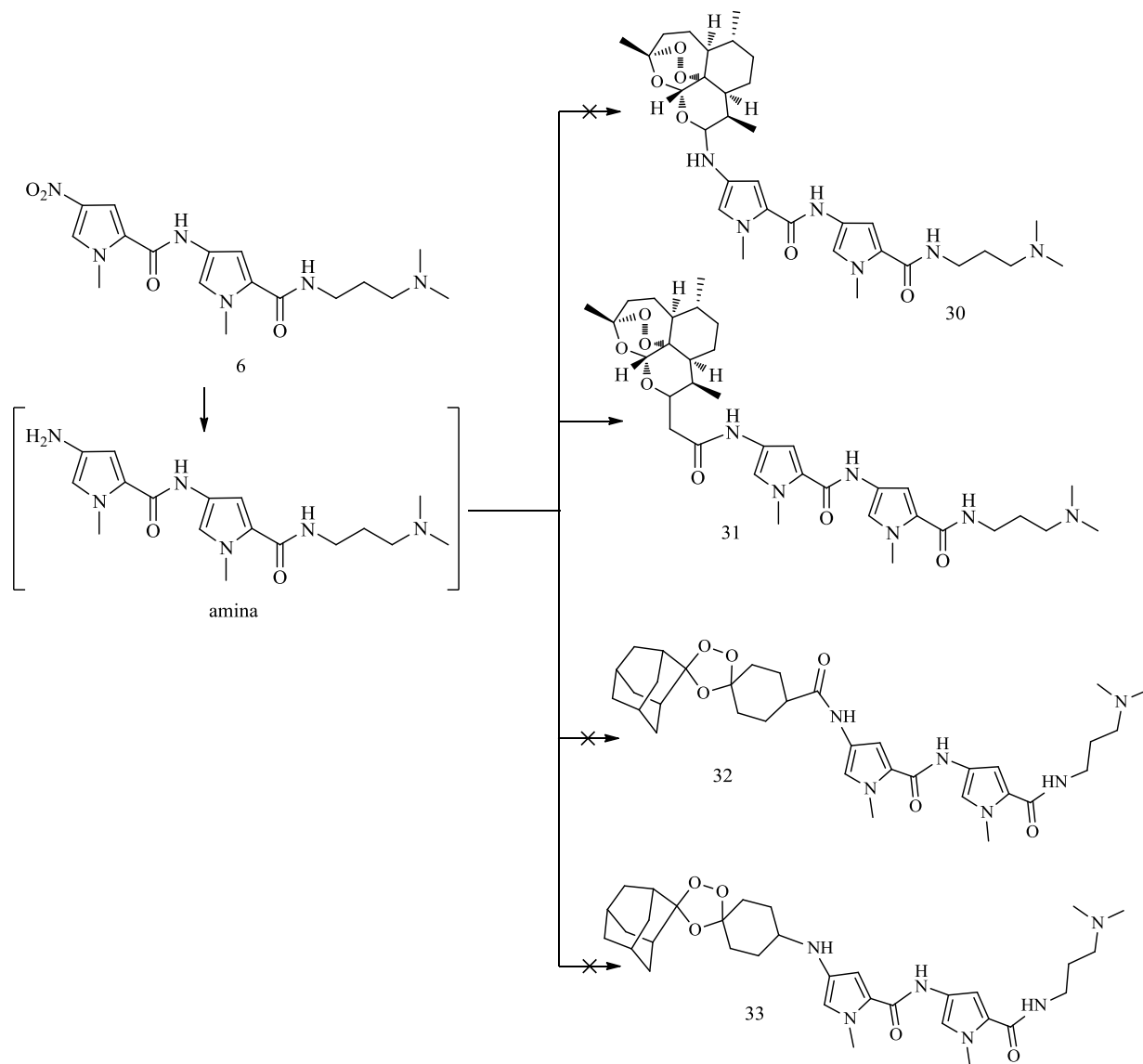


Figura 2.27. Representação esquemática das abordagens sintéticas aos conjugados alvo.

Apenas o conjugado 31 foi obtido.

Fizeram-se duas tentativas diferentes para a obtenção do composto alvo 30, mas sempre com o mesmo endoperóxido, o 10-benzoato de DHA, composto 20. Tentou-se este peróxido pois apresenta um bom grupo abandonante. Como na primeira tentativa não se conseguiu obter o composto pretendido, fez-se uma segunda tentativa usando condições de reação diferentes:

I. Usou-se como catalisador um ácido de Lewis, o cloreto de zinco, para facilitar a saída do grupo abandonante.

II. Utilizou-se como solvente uma mistura de THF e DMF (1:1), pois na primeira tentativa verificou-se que a amina formada era pouco solúvel em THF.

Nesta mistura de solventes utilizada, houve dificuldades para concentrar a amostra final pois o ponto de ebulição do DMF é muito elevado e conseqüentemente requer temperaturas elevadas quando se evapora a amostra até à secura.

Posteriormente verificou-se que a amina era solúvel em THF desde que a solução da amina com o THF fosse aquecida a 40°C. Assim conseguiu-se eliminar o problema da solubilidade da amina, e do elevado ponto de ebulição do DMF.

Também foram feitas várias tentativas para a obtenção dos compostos alvo 31 e 32. Nas primeiras tentativas para a formação destes alvos, os cloretos de ácido, 23 e 28 foram adicionados à amina formada a partir do composto 6. Nestas tentativas, usou-se o cloreto de ácido que se “isolou” mas verificou-se que este havia sofrido hidrólise. Assim, fez-se uma segunda tentativa, mas partindo dos respectivos ácidos carboxílicos. Esta tentativa foi feita em “one pot” pois para além de se converter o grupo nitro em condições anidras, também se converteram os ácidos nos respectivos cloretos de ácido e procedeu-se ao acoplamento sem isolar as aminas nem os cloretos de ácido.

O conjugado 31 acabou por ser sintetizado por uma outra investigadora do nosso grupo, a Doutora Nuna Araújo, usando os blocos por mim preparados.

Para a tentativa de obter o composto alvo 33, utilizou-se o trioxolano 29. Nesta síntese tentou-se acoplar a amina derivada do composto 6, diretamente ao ácido carboxílico, mas infelizmente sem sucesso. Ou seja, a aminação redutiva não funcionou.

Na tentativa de se obter os compostos alvo 34 e 35, foram usadas as mesmas estratégias sintéticas que haviam sido usadas na tentativa de formação dos compostos alvo 31 e 32, figura 2.28. Neste caso, o composto de partida já é uma amina primária que foi isolada previamente, e esta é mais estável que a formada a partir do grupo nitro, no anel pirrole. Porém, não se conseguiu o acoplamento. Não tendo sido obtidos os conjugados, decidiu-se enviar os blocos preparados para o grupo do Professor Paul O'Neill, onde existem condições de síntese e caracterização mais adequadas a reações sensíveis como é o caso destas. Como já referido, apenas o conjugado 31 foi obtido, mas a reação foi conduzida pela Doutora Nuna Araújo, investigadora do grupo de reatividade orgânica e química medicinal do CCMAR/UALG.

Quanto às outras moléculas alvo (30, 32 e 35) as tentativas de acoplamento realizadas em Liverpool também não foram bem sucedidas.

O conjugado 31 e outros conjugados preparados em Liverpool (Figura 2.29) foram submetidos a testes *in vitro* e *in vivo*.

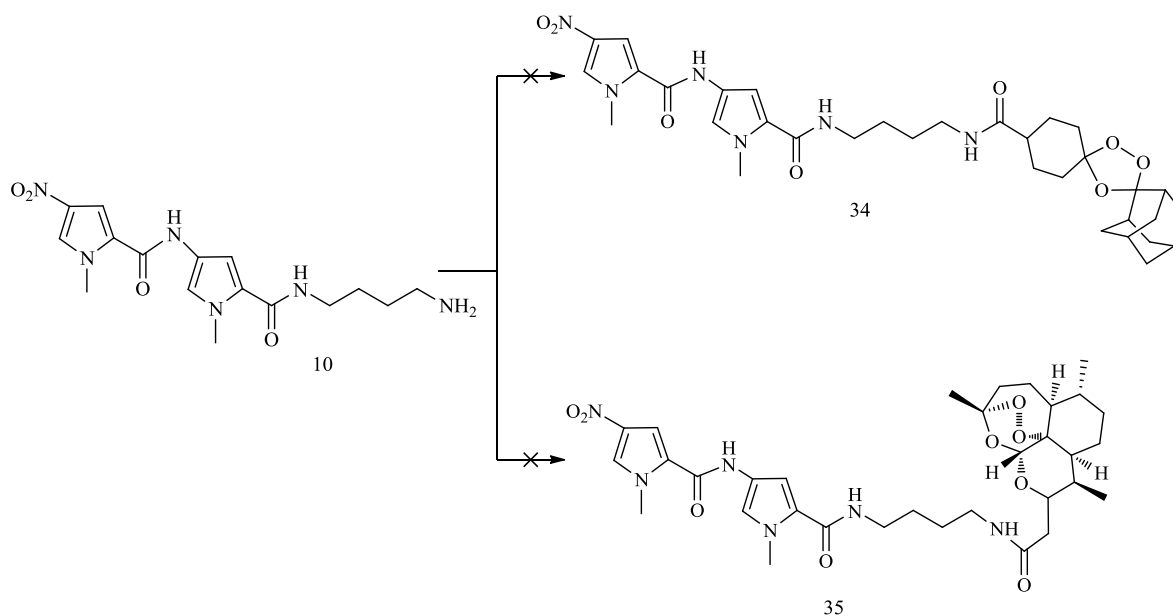


Figura 2.28. Representação esquemática das abordagens sintéticas aos conjugados alvo.

No âmbito da parceria com a Universidade de Liverpool foi recentemente submetido um artigo⁴² com o título “Artemisinin Polypyrrole Conjugates; Synthesis, DNA Binding Studies and Preliminary Cytotoxicity Evaluation”. Esta publicação descreve a síntese das várias moléculas alvo que foram preparadas de acordo com os objetivos da investigação e que incluem um agente seletivo de ligação ao ADN do parasita e um peróxido. Para a síntese destas moléculas alvo foram utilizadas condições diferentes das que se usaram neste projeto e a ligação peróxido-polipirrole é feita através de uma funcionalidade éter. Dada a extrema instabilidade destes compostos, procedeu-se à purificação por HPLC preparativo antes de serem testados. Relativamente ao composto alvo 31, descrito acima, a purificação por HPLC preparativo também foi efetuada em Liverpool, uma vez que o equipamento não está disponível na Universidade do Algarve.

Todos os compostos que foram usados no estudo descrito possuem na extremidade da cadeia uma amina terciária que facilmente forma um ião amônio e se liga ao fosfato do ADN. A variabilidade estrutural dos conjugados testados reside na natureza de ligação entre o polipirrole e o peróxido (ART), no comprimento da cadeia de pirrol, ou seja, dipirrólica ou tripirrólica, na natureza da ligação ao peróxido, mais ou menos flexível, e por fim no tipo de ligação entre o farmacóforo e o ligando ao ADN, que pode ser através de uma ponte éter diretamente ligada ao sesquiterpeno (36, 37) ou separada por uma ponte de metileno (38-41) ou no caso do conjugado 31, por uma ligação amina. Os compostos alvo que foram objeto da investigação descrita no artigo encontram-se representados na figura 2.29.

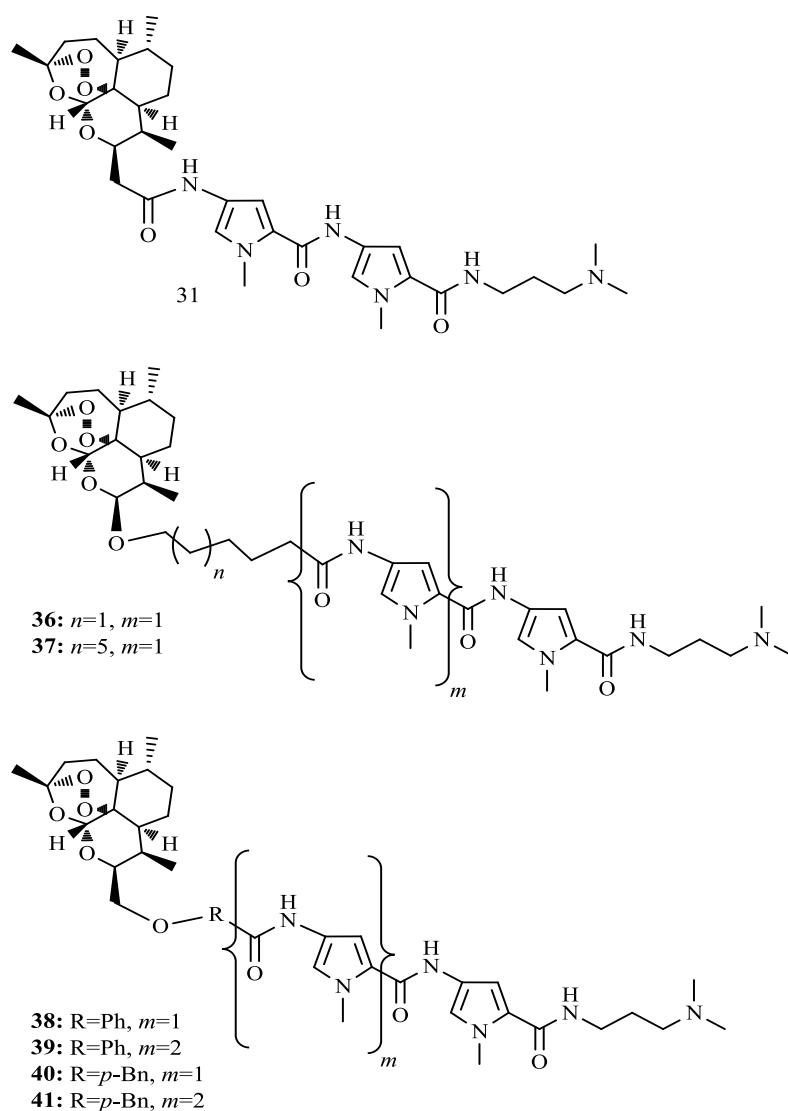


Figura 2.29. Representação esquemática dos conjugados alvo presentes no artigo.

Foram efetuados testes de afinidade pelo ADN e testes de bioatividade. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

I. Quanto mais longa e mais flexível for a cadeia que liga o poliporrole ao sesquiterpeno mais eficiente é a interação do conjugado com o “minor groove” do ADN.

II. Os compostos alvo foram avaliados quanto à sua atividade anti-malárica, *in vitro*. Foram feitos testes com DHA nas mesmas condições. Os resultados obtidos mostram que, embora todos os conjugados sejam ativos em concentrações nanomolares, os valores de IC₅₀ são para todos eles superiores aos obtidos para o padrão DHA. Verificou-se que o agente de ligação NET não apresenta atividade anti-malárica, do que se conclui que a atividade demonstrada pelos conjugados é devida ao peróxido presente.

III. Os compostos alvo foram avaliados quanto à sua toxicidade, *in vitro*, em duas linhas celulares: HL-60 (leucemia) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon). No caso da linha HT-29 (adenocarcinoma do cólon) quando os compostos estão acoplados com o polipirrole apresentam valores de IC₅₀ em concentrações micromolares que são inferiores aos obtidos com a DHA. Verifica-se também que os compostos 37, 38 e 40 apresentam valores inferiores aos obtidos para DHA e NET, sendo portanto mais ativos. Usando uma linha celular HL-60 (leucemia) verifica-se que estes compostos são ativos em concentrações micromolares. Os valores de IC₅₀ são para todos eles inferiores aos obtidos para o padrão DHA.

O conjugado 37 é particularmente uma vez que neste caso o valor de IC₅₀ se situa na região nanomolar. Relativamente à potencial utilização como anti-maláricos, embora estes possuem atividade inferior à de DHA, alguns têm mesmo assim atividade elevada (36-38 e 40) e podem representar uma estratégia que contorna o problema já existente *in vivo* aos ACT's.

Tabela 2.1. Atividade citotóxica e anti-malárica dos compostos 31, 36 a 41 usando DHA e netropsina (NET) como controlo.

Composto	Toxicidade (HL-60) IC_{50} (μM)	Toxicidade (HT-29) IC_{50} (μM)	Atividade anti-malárica (Plasmódium Falciparum) IC_{50} (nM)
DHA	50±0.10	12.92±2.31	2±0.5
NET	>100	11.00±1.87	ND
31	11.67±4.38	48.01±3.16	120±18
36	4.41±0.49	22.87±1.56	65±9
37	0.11±0.03	6.26±0.45	40±6
38	1.19±0.09	7.38±0.52	50±12
39	6.35±2.93	39.94±3.93	126±11
40	1.42±0.66	8.78±1.47	24±8
41	4.60±1.40	58.76±2.77	119±14

2.3. Conclusão

Como foi referido na introdução, o principal objetivo do trabalho realizado centrou-se na síntese de moléculas que contenham um peróxido com atividade anti-malárica acoplado a um agente de ligação ao ADN.

O agente de ligação integrado na molécula é um análogo da distamicina A, um polipirrole que interage com o “minor groove” do ADN. A introdução deste fragmento nas moléculas alvo tem como objetivo aumentar a seletividade do fármaco. Foram preparados, isolados e caracterizados quatro agentes de ligação ao ADN diferentes (compostos 6, 10, 14 e 18).

Neste trabalho, os farmacóforos escolhidos e preparados foram derivados da artemisinina (trioxanos semi-sintéticos) e derivados de ozonídeo (trioxolanos).

Com o objetivo da preparação da primeira série de endoperóxidos para acoplamento aos agentes de ligação ao ADN, modificou-se a ART, de modo a introduzir grupos funcionais na posição C-10 da ART. Foram preparados, isolados e caracterizados os compostos 19 a 23 (Figura 2.25).

Na segunda série de endoperóxidos para acoplamento aos agentes de ligação ao ADN, foram preparados, isolados e caracterizados os derivados de ozonídeo compostos 25 a 29 (Figura 2.26).

Após preparados os blocos de construção correspondentes ao peróxido e os agentes de ligação ao ADN tentou-se o acoplamento dos blocos para obter os conjugados alvo, de acordo com uma estratégia de síntese convergente.

Fizeram-se várias tentativas para a obtenção destes compostos finais, 30 a 33 (Figura 2.27), todas elas envolvendo como primeira etapa a hidrogenação do derivado nitrado do dipirrol 6 à amina correspondente. O conjugado 31 acabou por ser sintetizado por uma outra investigadora do nosso grupo, a Doutora Nuna Araújo, usando os blocos por mim preparados.

Na tentativa de se obter os compostos alvo 34 e 35 (Figura 2.28), foram usadas as mesmas estratégias sintéticas que haviam sido usadas para a formação dos compostos 30 a 33, mas partindo de uma agente de ligação ao ADN diferente, a amina 10.

No âmbito da colaboração com a Universidade de Liverpool, o conjugado 31 e outros conjugados preparados (compostos 36 a 41, Figura 2.29), foram testados relativamente à sua afinidade pelo ADN plasmoidal e foram também testados *in vitro* e *in vivo* para avaliar a sua atividade anti-malárica em eritrócitos infetados por *Plasmodium falciparum* e nas linhas celulares HL 60 (leucemia) e HT 29 (adenocarcinoma de cólon).

Os resultados obtidos permitem concluir que quanto mais longa e mais flexível for a cadeia entre o peróxido e o polipirrole, mais eficiente é interação do conjugado com o “minor groove” do ADN.

Em relação à atividade anti-malária *in vitro*, verificou-se que todos os conjugados são ativos em concentrações nanomolares, mas apresentam valores de IC₅₀ que são para todos eles superiores aos do padrão DHA. O ligando NET não apresentou qualquer atividade.

Quanto à toxicidade *in vitro* nas duas linhas celulares, HL-60 (leucemia) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon), tanto no caso da linha HT-29, como na linha HL-60 verifica-se que estes compostos são ativos em concentrações micromolares e apresentam valores de IC₅₀ inferiores aos obtidos com a DHA, sendo por conseguinte mais ativos que esta.

Os resultados desta investigação permitiram selecionar conjugados com potencial para serem considerados em estudos de desenvolvimento de fármacos para a quimioterapia do adenocarcinoma do cólon e leucemia. No entanto esta investigação é preliminar e deve ser prosseguida de acordo com as abordagens da otimização de fármacos.

III. 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: ponto de fusão, infravermelho (IV), espectrometria de massa e de ressonância magnética nuclear (RMN).

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

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

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro FT/IR, Bruker, Tensor 27.

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

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos num espectrómetro Bruker 400 AC (400 MHz).

Os dados de RMN e espectrometria de massa foram fornecidos pelo departamento de química da Universidade Nova de Lisboa.

O acompanhamento e controlo das reações foram efetuados por cromatografia em camada fina (“Thin Layer Chromatography”, TLC), usando placas de sílica gel 60 F254 (AL TLC 20x20; MERCK), e recorrendo a um sistema eluente apropriado à reação em causa.

Em geral, os compostos de partida foram utilizados tal como comercialmente fornecidos. Alguns dos solventes usados, THF, DCM e Metanol, foram submetidos a secagem, tendo esta sido feita de acordo com os procedimentos descritos na literatura⁴³: o DCM e o DMF foram secos com cloreto de cálcio, o metanol com magnésio e iodo e o THF com sódio metálico e benzofenona.

Quase todas as reações foram realizadas em ambiente anidro, sob uma atmosfera de azoto, exceto as reações de redução que decorreram numa atmosfera de hidrogénio.

3.1. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas ao longo do projeto

3.1.1- Síntese dos blocos contendo os agentes de ligação ao ADN

➤ *Síntese de 1-metil-2-tricloroacetilpirrole, composto 2*

A uma solução de cloreto de tricloroacetilo (8.07 g, 4.44×10^{-2} mol) em DCM seco (37 mL), sob agitação, arrefecida até aos 0°C, adicionou-se muito lentamente uma solução de N-metilpirrole (3 g; 3.70×10^{-2} mol) em DCM seco (23 mL). A mistura permaneceu sob agitação até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente DCM. Após cerca de um dia verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao N-metilpirrole. Fez-se uma cromatografia em flash usando DCM como eluente, para purificar o produto. Evaporou-se o solvente, e após recristalização do resíduo obtido, em etanol, obtiveram-se cristais amarelos em forma de agulha (6.70 g, 2.96×10^{-2} mol, 80%).

Intervalo de fusão: 63°-64°C, lit.³⁶ 64-65 °C; IV: ν 2899 (C-H pirrole), 1656 (C=O), (film)/ cm^{-1} ; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.50 (d, J = 3.0Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.23 (m, 1H), 3.97 (s, 3H) ppm; $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 172.4, 133.1, 123.4, 121.3, 108.3, 95.7, 38.0 ppm; EM m/z 226 $[\text{M}]^+$.

➤ *Síntese de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, composto 3*

Dissolveu-se 1-metil-2-tricloroacetilpirrole 1 (3.0 g, 1.32×10^{-2} mol) em anidrido acético (19 mL) e colocou-se a mistura de reação sob agitação. Esta mistura foi arrefecida até -40°C (com um banho de acetonitrilo e nitrogénio). Muito lentamente, adicionou-se uma

solução de ácido nítrico (3.76 g, 5.97×10^{-2} mol) em anidrido acético (13 mL). A mistura permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Cerca de 4 horas após ter atingido a temperatura ambiente verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao 1-metil-2-tricloroacetilpirrole. A extração do composto foi feita com DCM (50 mL). A fase orgânica foi tratada com água destilada (70 mL), uma solução aquosa de NaHCO_3 (40 mL), e por fim uma solução concentrada de cloreto de sódio (NaCl, 40 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obtiveram-se uns cristais de cor laranja, que após recristalização em etanol originaram o produto (2.58 g, 9.50 mmol, 72%).

Intervalo de fusão: 138°-140°C, lit.³⁶ 135-140 °C; IV: ν 1696,54 (C=O), 1355 (NO_2) (film)/ cm^{-1} ; ^1H -RMN. (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 7.76 (s, 1H), 4.05, (3H, s) ppm; ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): 173.2, 134.8, 129.8, 120.9, 117.0, 94.3, 39.2 ppm; MS m/z 270 $[\text{M}]^+$.

➤ ***Síntese de N-(3-dimetilaminopropil)-1-metil-4-nitropirrol-2-carboxamida, composto 4***

Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole 3 (2.0 g, 7.37 mmol) em THF seco (20 mL), sob agitação, foi arrefecida até 0°C. Foi adicionada muito lentamente uma solução de 3-dimetilaminopropilamina (1.5 g, 1.47×10^{-2} mol) em THF seco (10 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), e cerca de 8 horas depois verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao material de partida. Evaporou-se até à secura. Após recristalização em etanol obteve-se o produto desejado (cristais amarelos; 1.76 g, 6.91 mmol, 94%).

Intervalo de fusão 127-129 °C, lit.⁴⁰ 129-130 °C; IV: ν 1649.46 (C=O), 1306.88 (N-C) (film)/ cm^{-1} ; ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.63 (s, 1H, NH), 7.50 (d, $J= 1.5$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J= 1.8$ Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.73 (t, $J= 5.8$ Hz, 2H), 2.28 (s, 6H), 1.71 (quint, $J= 5.9$ Hz, 2H) ppm; MS m/z 255 $[\text{M}]^+$.

➤ ***Síntese de 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido) pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, composto 6***

Uma solução de N-(3-dimetilaminopropil)-1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida 4 (1.5 g, 5.88 mmol) em metanol seco (30 mL) foi submetida a um fluxo de nitrogénio durante

aproximadamente 5 minutos. Colocou-se o balão sob agitação e adicionou-se o catalisador, Pd/C 10% (0.38 g, 3.57 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação, numa atmosfera de hidrogénio. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (3:7), e após cerca de 1 dia verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente a N-(3-dimetilaminopropil)-1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida. Purgou-se a solução com nitrogénio e filtrou-se sob vácuo, usando celite para reter o catalisador. Lavou-se com metanol seco (15 mL), e evaporou-se o solvente. Durante este processo (desde a filtração até à evaporação) houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole (1.59 g, 5.88 mmol) em THF (50 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional. A mistura final permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 2 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (3:7). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao composto 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, e a segunda correspondente ao produto desejado, um sólido amarelo cristalino (1.43 g, 3.80 mmol, 65%).

Intervalo de fusão: 190°-192°C, lit⁴⁰ 190-191 °C; IV: ν 1670.29 (C=O), 1383.79 (N-C) (film)/cm⁻¹; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.20 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.58, (s, 1H), 7.18 (s, 1H) 6.46 (s, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.9 (s, 3H), 3.45 (m, 2H), 2.45 (t, $J=8$ Hz, 2H), 2.29 (s, 6H), 1.74 (m, 2H) ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 161.1, 157.0, 134.5, 126.4, 118.2, 106.6, 102.4, 44.9, 38.9, 36.2, 25.2, 17.9 ppm; MS m/z 377 [M]⁺.

➤ ***Síntese de tert-butil 4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida) butilcarbamato, composto 7***

Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole 3 (2.0 g, 7.37 mmol) em THF seco (20 mL), sob agitação, foi arrefecida até 0°C. Foi adicionada muito lentamente uma solução de N-boc-1,4-butanediamina (1.5 g, 1.47 x 10⁻² mol) em THF seco (10 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), e cerca de 10 horas depois verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole. Evaporou-se até à secura. Após recristalização em etanol obteve-se o produto desejado (pó branco; 1.76 g, 6.91 mmol, 94%).

Intervalo de fusão: 115°-117°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (d, J = 1.3Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 3.16 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 160.0, 134.4, 126.0, 106.8, 38.7, 27.9 ppm; MS *m/z* EI 340 [M]⁺.

➤ ***Síntese de tert-butil 4-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)-1H-pirrole-2-carboxamido]butilcarbamato, composto 9***

Uma solução de tert-butil 4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida)butilcarbamato 7 (0,8 g, 2.35 mmol) em metanol seco (15 mL) foi submetida a um fluxo de nitrogénio, durante aproximadamente 5 minutos. À solução em agitação, foi adicionado o catalisador, Pd/C 10% (0.2 g, 1.88 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, numa atmosfera de hidrogénio. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (3:7), e após 1 dia verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao tert-butil 4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida)butilcarbamato. A mistura foi purgada com um fluxo de nitrogénio. Filtrou-se sob vácuo usando celite para reter o catalisador, lavou-se com metanol seco (10 mL) e evaporou-se o solvente. Durante este processo (desde a filtração até à evaporação) houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole (0,64 g, 2.35 mmol) em THF (30 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional, e em seguida adicionou-se trietilamina (0,48 g, 4,70 mmol). A mistura final permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 2 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (1:1). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao composto 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, e a segunda correspondente ao produto desejado, um pó fino de cor amarela (0,55 g, 1,18 mmol, 50%).

Intervalo de fusão: 197°-199°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.9 (s, 1H), 7.6 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.91 (s, 3H) 3.65 (m, 4H), 1.59 (m, 4H), 1.45 (s, 9H) ppm; MS *m/z* EI 462 [M]⁺.

➤ **Desproteção da amina; preparação de 4-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)-1H-pirrole-2-carboxamido]butilamina, composto 10**

A uma solução de tert-butil 4-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)-1H-pirrole-2-carboxamido]butilcarbamato 9 (0,41 g, 8.86×10^{-4} mol) em 1,4-dioxano (35 mL), sob agitação, foi adicionada uma solução de HCl (4M) (70 mL). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 5 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). O composto foi neutralizado com uma solução de K_2CO_3 (3M). A extração do composto foi feita com DCM (3 x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com uma solução aquosa concentrada de NaCl (70 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um pó branco como produto (0,31 g, 8.62×10^{-4} mol, 97%).

Intervalo de fusão: 179°-180°C; 1H -RMN (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.59 (s, 1H), 7.53 (s,1H), 7.4 (s, 2H), 7.07 (s, 1H), 3.96 (s, 6H), 3.38 (d, J=5.7 Hz, 2H), 2.79 (d, J=5.84 Hz, 2H), 1.57 (m, 4H) ppm; MS m/z EI 363 $[M]^+$.

➤ **Síntese de 1-metil-4-nitro-2-acetilpirrole, composto 12**

Dissolveu-se 1-metil-2-acetilpirrole (3.12 g, 2.53×10^{-2} mol) em anidrido acético (20 mL) e colocou-se a mistura de reação sob agitação. Esta mistura foi arrefecida até -40°C (com um banho de acetonitrilo e gelo seco). Muito lentamente, adicionou-se uma solução de ácido nítrico (7.2 g, 0.11 mol) em anidrido acético (15 mL). A mistura permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:2), e cerca de 6 horas após ter atingido a temperatura ambiente verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao 1-metil-2-acetilpirrole. A extração do composto foi feita com DCM (3 x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com água destilada (70 mL), uma solução aquosa de $NaHCO_3$ (40 mL), e por fim uma solução aquosa concentrada de NaCl (40 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obtiveram-se uns cristais de cor laranja, que após recristalização em etanol originaram o produto (3.67 g, 2.18×10^{-2} mol, 86%).

Intervalo de fusão: 109°-11°C; 1H -RMN (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.6 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 3.97 (s, 3H), 2.46 (s, 3H) ppm; MS m/z EI 168 $[M]^+$.

➤ **Síntese de *N*-(5-acetil-1-metilpirrole-3-il)-1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamida, composto 14**

Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-acetilpirrole 12 (1.5 g, 8.92 mmol) em metanol seco (15 mL) foi submetida a um fluxo de nitrogénio durante aproximadamente 5 minutos. Colocou-se o balão sob agitação e adicionou-se o catalisador, Pd/C 10% (0.38 g, 3.57 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação, numa atmosfera de hidrogénio. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), e após 1 dia verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente a 1-metil-4-nitro-2-acetilpirrole. Purgou-se a solução com nitrogénio, e filtrou-se sob vácuo usando celite para reter o catalisador. Lavou-se com metanol seco (20 mL), e evaporou-se o solvente. Durante este processo (desde a filtração até à evaporação) houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole (2.42 g, 8.92 mmol) em THF (40 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional, e em seguida adicionou-se trietilamina (1.8 g, 1.78×10^{-2} mol). A mistura final permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante 4 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (1:1). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao composto 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, e a segunda correspondente ao produto desejado, um pó fino de cor laranja (1.29 g, 4.46 mmol, 50%).

Intervalo de fusão: 200°-202°C; $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.61 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 2.41 (s, 3H) ppm; MS m/z EI 290 $[\text{M}]^+$.

➤ **Síntese de 1-metilpirrole-2-carboxilato de metilo, composto 15**

Lentamente, ao metanol seco (60 mL), sob agitação, adicionou-se sódio (3.25 g, 1.40×10^{-1} mol). Deixou-se reagir a mistura reacional até ao desaparecimento completo do sódio, e adicionou-se 1-metil-2-tricloroacetilpirrole 2 (2.00 g, 8.83 mmol). O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7), e após cerca de 8 horas verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao 1-metil-2-tricloroacetilpirrole. Lavou-se a mistura com água destilada (15 mL) e extraiu-se o produto com acetato de etilo (3 x 20 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro,

filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um sólido de cor laranja (0.83 g, 5.99 mmol, 68%).

Intervalo de fusão: 95°-96°C. IV: ν 2960 (C-H pirrol), 1714 (C=O) (film)/cm⁻¹.

➤ ***Síntese de 1-metil-4-nitropirrol-2-carboxilato de metilo, composto 16***

Foram usados dois métodos diferentes para a síntese deste composto.

✓ *Método I:*

Agitou-se uma solução de 1-metilpirrole-2-carboxilato de metilo, 15 (0.80 g, 5.75 mol) em anidrido acético (9 mL) durante 10 minutos. A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura de -40°C. Adicionou-se muito lentamente uma solução de ácido nítrico (1.64 g, 2.59 x 10⁻² mol) em anidrido acético (6 mL). A mistura permaneceu sob agitação, até atingir a temperatura ambiente. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Após 1 dia de reação, verificou-se que ainda havia uma ligeira mancha no TLC de 1-metilpirrole-2-carboxilato de metilo. Evaporou-se o solvente e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, para purificar o produto, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Recolheram-se 2 frações diferentes: a primeira correspondente ao composto de partida e a segunda correspondente ao produto, um sólido de cor laranja (0.70 g, 3.80 mmol, 66%).

✓ *Método II:*

A uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, 3 (1.0 g, 3.69 mmol) em metanol seco (20 mL), adicionou-se muito lentamente sódio (1.03 g, 1.91 x 10⁻² mol). O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), e após cerca de 24 horas verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente a 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole. A extração do composto foi feita com DCM (2 x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com água destilada (70 mL), e H₂SO₄ concentrado (40 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um pó amarelo, que após recristalização em etanol originou um sólido amarelo (0.35 g, 1.88 mmol, 51%).

Intervalo de fusão: 114°-115°C, lit.⁴¹ 114°C; IV: ν 1760 (C=O), 1513 (NO₂), 1126 (C-O-C) (film)/cm⁻¹.

➤ **Síntese de 5-(1-metil-4-nitropirrol-2-carboxamido)-1-metil-1H-pirrol-2-carboxilato de metilo, composto 18**

Uma solução de 1-metil-4-nitropirrol-2-carboxilato de metilo, 16 (0.64 g, 3.46 mmol) em metanol seco (39 mL) foi submetida a um fluxo de nitrogénio durante aproximadamente 5 minutos. À solução em agitação, foi adicionado o catalisador, Pd/C 10% (0.23 g, 1.013 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, numa atmosfera de hidrogénio. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9), e após cerca de 14 horas verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao composto de partida. A mistura foi purgada com um fluxo de nitrogénio. Filtrou-se sob vácuo usando celite para reter o catalisador, lavou-se com metanol seco (15 mL), e evaporou-se o solvente. Durante este processo (desde a filtração até à evaporação) houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução de 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole (0.846 g, 3.118 mmol) em THF seco (35 mL) foi adicionada lentamente à mistura anterior. A mistura final permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante dois dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se o solvente, e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). Recolheram-se 2 frações diferentes: a primeira correspondente ao composto 1-metil-4-nitro-2-tricloroacetilpirrole, a segunda correspondente ao produto desejado (sólido amarelo; 1.51 g, 4.95 mmol, 70%).

Intervalo de fusão: 260 - 261°C, lit.⁴¹ 262°C; IV: ν 1661.57 (C=O), 1327.36 (NO₂), 1090.02 (C-O-C) (film)/cm⁻¹; MS m/z EI 305 [M]⁺.

3.1.2- Síntese dos blocos de construção contendo o peróxido como farmacóforo

➤ **Síntese do 10-benzoato de artemisinina, composto 20**

A uma solução de DHA, 19 (0.5 g, 1.76 mmol) em DCM seco (20 mL), sob agitação e arrefecida a 0°C, foi adicionada piridina (0.6 g, 7.39 mmol) e por fim cloreto de benzoílo (0.4 g, 2.64 mmol), muito lentamente. A mistura permaneceu sob agitação, durante 16 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando DCM como eluente. Evaporou-se o solvente e fez-se uma cromatografia em flash, usando como eluente uma mistura de acetato de

etilo e hexano (3:7). Obteve-se o produto, um sólido branco cristalino (0.55 g, 1.42 mmol, 80%).

Intervalo de fusão: 110°-111°C, lit.³⁸ 111°-112°C; IV: ν 1731, 1267, 1018, 879, 832 (film)/cm⁻¹. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (m, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.46 (m, 2H), 6.02 (d, J= 9.8 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.40 (td, J= 14.0 Hz and J= 4.2 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H), 0.99 (d, J= 6.1 Hz, 3H) ppm; MS *m/z* EI 386 [M]⁺.

➤ ***Síntese do 10-alil-artemisinina, composto 21***

A uma solução de 10-benzoato de artemisinina, 20 (3.4 g, 8.75 mmol) em 1,2-dicloroetano (40 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado alil-trimetilsilano (4.80 g, 4.20 x 10⁻² mol) e por fim cloreto de zinco (1.43 g, 1.05 x 10⁻² mol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 5 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). A extração do composto foi feita com acetato de etilo (2 x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com ácido cítrico 7% (30 mL), uma solução saturada de NaCl (30mL) e uma solução de NaHCO₃ (40 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (0.5:9.5). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente a 10-benzoato de artemisinina, e a segunda correspondente ao produto desejado, como sólido branco cristalino (1.21 g, 3.94 mmol, 45%).

Intervalo de fusão: 75°-77°C, lit.³⁸ 76°-78°C.

➤ ***Síntese do ácido 10-artemisinina etanoico, composto 22***

A uma solução de 10-alil-artemisinina, 21 (1.21 g, 3.94 mmol) numa mistura de acetona e água (100 + 100 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado NaIO₄ (3.37 g, 1.58 x 10⁻² mol) e por fim KMnO₄ (0.39 g, 2.48 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 18 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Filtrou-se a reação para retirar o excesso de NaIO₄ e KMnO₄. Evaporou-se o solvente. A extração do composto foi efetuada com éter etílico (2 x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com NaOH 2M (2 x 30 mL). Acidificou-se a fase aquosa até pH=1 e extraiu-se novamente a mistura com éter etílico (3 x 30 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel,

usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:1). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao composto de partida, 10-alil-artemisinina, e a segunda correspondente ao produto obtido, como sólido branco cristalino (0.66 g, 2.0 mmol, 51%).

Intervalo de fusão: 95°-97°C; EI m/z 325 [M]⁺.

➤ ***Síntese do cloreto de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 23***

A uma solução de ácido 10-artemisinina etanoico, 22 (0.66 g, 2.0 mmol) em DCM seco (50 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (0.47 g, 2.73 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 28 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Evaporou-se o solvente até à secura, e obteve-se o produto com um rendimento quantitativo.

➤ ***Síntese de adamantil-metiloxima, composto 25***

A uma solução de 2-adamantanona, 24 (2.0 g, 1.33×10^{-2} mol) em metanol seco (15 mL), sob agitação, foi adicionada piridina (1.9 g, 2.4×10^{-2} mol) e por fim hidrocloreto de metoxilamina (1.67 g, 2.0×10^{-2} mol), muito lentamente. A mistura permaneceu sob agitação, durante dois dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Evaporou-se o solvente. A extração do composto foi feita com DCM (50 mL). A fase orgânica foi tratada com água destilada (50 mL), e com uma solução de HCl 2M (40 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente até à secura. Obteve-se um sólido branco (2.0 g, 1.12×10^{-2} mol, 84%).

Intervalo de fusão: 68°-70°C, lit.²⁴ 70°-71°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3.78 (s, 3H), 3.46 (s, 1H), 2.50 (s, 1H), 1.95-1.79 (m, 12H) ppm; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) 166.1, 60.40, 38.5, 37.1, 35.99, 35.71, 28.98, 27.31 ppm.

➤ ***Ozonólise para a formação do composto 26***

Dissolveram-se a adamantil-metiloxima, 25 (1.05 g, 5.87 mmol) e o 4-oxociclohexil-etil-éster (1.0 g, 5.87 mmol) numa mistura de DCM e pentano (1:4) e colocou-se a mistura de reação em agitação, num banho a 0°C. Esta solução foi submetida a um fluxo de ozono, durante 45 minutos. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura

de acetato de etilo e hexano (1.5:8.5). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao reagente, 4-oxociclohexil-etil-éster, e a segunda correspondente ao produto, um sólido incolor (0.83 g, 2.47 mmol, 42%).

Intervalo de fusão: 37°-39°C, lit.²⁴ 38°-39°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.8 (q, J=7.1 Hz, 2H), 2.53 (m, 1H), 1.98-1.81 (m, 22H), 1.25 (t, J=7.1 Hz, 3H) ppm; MS EI *m/z* 336 [M]⁺.

➤ ***Síntese do ácido carboxílico, composto 27***

Dissolveu-se o composto 26 (0.70 g, 2.08 mmol) em metanol (20 mL) e acrescentou-se uma solução aquosa de KOH (0.4 g, 7.13 mmol, 2.4 mL). A reação permaneceu em refluxo, a 50°C sob agitação, durante cerca de 26 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). A extração do composto foi feita com DCM (3 x 70 mL). A fase orgânica foi tratada com H₂O (70 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 como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (8:2). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao material de partida, e a segunda correspondente ao produto desejado, um sólido incolor (0.45 g, 1.46 mmol, 70%).

Intervalo de fusão: 147°-149°C, lit.²⁴ 148°-150°C; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.54 (m, 1H), 1.4-2.0 (m, 22H) ppm; MS *m/z* EI 307 [M].

➤ ***Conversão do composto 27 no correspondente cloreto de ácido, 28***

A uma solução do ácido carboxílico, 27 (0.3 g, 9.73 x 10⁻⁴ mol) em DCM seco (20 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (1.0 g, 8.62 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 24 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:3). Evaporou-se o solvente até à secura, e obteve-se o produto com um rendimento quantitativo.

➤ ***Ozonólise para a formação do composto 29***

Dissolveram-se adamantil-metiloxima, 25 (1.5 g, 8.42 mmol) a ciclohexadiona (1.89 g, 1.68 x 10⁻² mol) numa mistura de DCM e pentano (4:6) sob agitação, num banho de gelo. Esta mistura foi exposta a um fluxo de ozono, durante uma hora. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2).

Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1.5:8.5). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente à ciclohexadiona, e a segunda correspondente ao produto desejado, um pó branco (1.01 g, 3.62 mmol, 43%).

Intervalo de fusão: 127°-128°C, lit.²⁴ 126°-128°C; ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1.69-2.02 (m, 14H), 2.14 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 2.51 (t, J = 7.0 Hz, 4H); ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): 25.9, 26.31, 31.09, 32.59, 34.25, 35.70, 36.18, 37.35, 106.46, 111.95, 208.90; MS (EI), m/z 278.9 [M⁺].

3.1.3- Tentativas de síntese dos diferentes conjugados alvo

➤ *Tentativa de acoplamento do ligando 6 ao peróxido 20, para obter o composto 30*

Foram usados dois métodos diferentes para a síntese deste composto.

✓ *Método I:*

Uma solução de 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, 6 (0.69 g, 1.82 mmol) em metanol seco (22 mL) foi submetida a um fluxo de nitrogénio durante aproximadamente 10 minutos. À solução em agitação, foi adicionado o catalisador, Pd/C 10% (0.09 g, 8.46 x 10⁻⁴ mol). A mistura permaneceu sob agitação, numa atmosfera de hidrogénio. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (2:8), e após cerca de 30 horas verificou-se o desaparecimento da mancha correspondente ao 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano. A mistura foi purgada com um fluxo de nitrogénio. Filtrou-se sob vácuo usando celite para remover o catalisador, lavou-se com metanol seco (10 mL) e evaporou-se o solvente. Durante este processo (desde a filtração até à evaporação) houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução de 10-benzoato de artemisinina, 20 (0.2 g, 1.46 mmol) em THF (70 mL) foi adicionada lentamente ao preparado anterior. A mistura reacional permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 2 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (3:7). Evaporou-se o solvente, e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9) para separar os componentes orgânicos. Recuperaram-se os reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, e 10-benzoato de artemisinina.

✓ *Método II:*

Repetiu-se o procedimento anterior, mas utilizando cloreto de zinco como catalisador, para o acoplamento, nas seguintes condições:

O rocedimento para a redução do grupo nitro à respetiva amina é idêntico ao descrito no método I. 10-Benzoato de artemisinina, 20 (0.2 g, 1.46 mmol) e cloreto de zinco (0.178 g, 1.31 mmol) foram dissolvidos numa mistura de THF e DMF (1:1) (70 mL). Esta solução foi adicionada muito lentamente à mistura anterior contendo a amina. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de quatro dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (3:7). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9) para separar os componentes orgânicos. Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, e 10-benzoato de artemisinina.

➤ *Tentativa de acoplamento do ligando 6 aos peróxidos 22 e 23, composto 31*

Foram usados dois métodos diferentes para a tentativa de síntese do conjugado alvo 31.

✓ *Método I:*

Á amina formada a partir do agente de ligação 6, 3-[1-metil-4-(1-metil-4-aminopirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, preparada como anteriormente descrito, adicionou-se cloreto de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 23 (0.92 g, 2.66 mmol) dissolvido em THF (30 mL). Esta solução foi adicionada muito lentamente à mistura anterior e em seguida adicionou-se trietilamina (0.54 g, 5.31 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 48 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9) para separar os componentes orgânicos. Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, e ácido 10-artemisinina etanoico, 23.

✓ *Método II:*

Repetiu-se o procedimento, fazendo o acoplamento em “one pot”, nas seguintes condições:

A uma solução do ácido 10-artemisinina etanoico, composto 22 (0.47 g, 1.44 mmol) em DCM seco (30 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (2.02 g, 2.39 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 28 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). A solução foi submetida a um fluxo de nitrogénio e evaporou-se o solvente. Durante este processo houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução da amina formada a partir do agente de ligação 6, 3-[1-metil-4-(1-metil-4-aminopirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, preparada como anteriormente descrito, em DCM (25 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional anterior. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, em refluxo, numa atmosfera de azoto, durante dois dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). 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 (8:2), para separar os componentes orgânicos. Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, 6, e ácido 10-artemisinina etanoico, 23.

➤ ***Tentativa de acoplamento do ligando 6 aos peróxidos 27 e 28, composto 32***

Foram usados dois métodos diferentes para a tentativa de síntese do conjugado alvo 32.

✓ *Método I:*

A uma solução da amina formada a partir do agente de ligação 6, 3-[1-metil-4-(1-metil-4-aminopirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, preparada como anteriormente descrito, em THF (25mL) adicionou-se cloreto de ácido, composto 28 (0.57 g, 2.39 mmol) dissolvido em THF (25 mL). Esta solução foi adicionada muito lentamente à mistura anterior. A mistura reacional permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 38 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (1:9). Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, 6, e trioxolano, 27.

✓ *Método II:*

Repetiu-se o procedimento, fazendo o acoplamento em “one pot”, nas seguintes condições:

A uma solução do trioxolano, 27 (0.10 g, 3.25×10^{-4} mol) em DCM seco (15 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (0.61 g, 4.88 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 24 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). A solução foi submetida a um fluxo de nitrogénio e evaporou-se o solvente. Durante este processo houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução da amina formada a partir do agente de ligação 6, 3-[1-metil-4-(1-metil-4-aminopirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, preparada como anteriormente descrito, em DCM (25 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional anterior. A mistura final permaneceu sob agitação, em refluxo, durante 3 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7) e uma mistura de metanol e DCM (1:9). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, 6, e trioxolano 27.

➤ *Tentativa de acoplamento do ligando 6 ao trioxolano 29, composto 33*

A uma solução da amina formada a partir do agente de ligação 6, 3-[1-metil-4-(1-metil-4-aminopirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, preparada como anteriormente descrito, em THF (25mL) adicionou-se o trioxolano 29 (0.74 g, 2.66 mmol) dissolvido em THF (40 mL). Esta solução foi adicionada muito lentamente à mistura anterior e em seguida adicionou-se NaBH(OAc)₃ (1.13 g, 5.31 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 50 horas. O progresso da reação foi controlado 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 (3:7) para separar os componentes orgânicos. Recuperaram-se os respetivos reagentes: 3-[1-metil-4-(1-metil-4-nitropirrole-2-carboxamido)pirrole-2-carboxamido]dimetilaminopropano, 6, e trioxolano 29.

➤ ***Tentativa de acoplamento do ligando 10 aos peróxidos 27 e 28, composto 34***

Foram usados dois métodos diferentes para a tentativa de síntese do conjugado alvo 34.

✓ *Método I:*

O trioxolano 28 (0.43 g, 1.26 mmol) foi dissolvido em THF (20 mL). A esta solução foi adicionada muito lentamente a amina 10 (0.38 g, 1.05 mmol). Em seguida adicionou-se trietilamina (0.21 g, 2.10 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante 3 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Evaporou-se o solvente. Para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Recuperaram-se os respetivos reagentes: amina 10, e trioxolano 27.

✓ *Método II:*

Repetiu-se o procedimento, fazendo o acoplamento em “one pot”, nas seguintes condições:

A uma solução do trioxolano, 27 (0.19 g, 6.16×10^{-4} mol) em DCM seco (25 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (1.12 g, 8.83 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 24 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (8:2). A solução foi submetida a um fluxo de nitrogénio e evaporou-se o solvente. Durante este processo houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução da amina 10 (0.23 g, 6.35×10^{-4} mol) e trietilamina (0.15 mL) em DCM (20 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional. A mistura final permaneceu sob agitação, em refluxo, durante 2 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Evaporou-se o solvente e para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Recuperaram-se os respetivos reagentes: amina 10, e trioxolano 27.

➤ ***Tentativa de acoplamento do ligando 10 aos peróxidos 22 e 23, composto 35***

Foram usados três métodos diferentes para a tentativa de síntese do conjugado alvo 35.

✓ *Método I:*

O cloreto de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 23 (0.43 g, 1.26 mmol) foi dissolvido em THF (20 mL). A esta solução foi adicionada muito lentamente a amina 10 (0.38

g, 1.05 mmol). Em seguida adicionou-se trietilamina (0.21 g, 2.10 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 24 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Evaporou-se o solvente. Para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Recuperaram-se os respetivos reagentes: amina 10, e ácido 10-artemisinina etanoico, 22.

✓ *Método II:*

Repetiu-se o procedimento, fazendo o acoplamento em “one pot”, nas seguintes condições:

A uma solução de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 22 (0.19 g, 58.2 mmol) em DCM seco (25 mL), sob agitação e arrefecida até 0°C, foi adicionado cloreto de tionilo (0.24 g, 7.79 mmol). A mistura permaneceu sob agitação, durante cerca de 28 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). A solução foi submetida a um fluxo de nitrogénio e evaporou-se o solvente. Durante este processo houve o cuidado de manter sempre a atmosfera anidra. Uma solução da amina 10 (0,23 g, 6.47×10^{-4} mol) e trietilamina (0.2 mL, 1.44 mmol) em DCM (20 mL) foi adicionada, muito lentamente, à mistura reacional. A mistura final permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 2 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (7:3). Evaporou-se o solvente. Para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). Recuperaram-se os respetivos reagentes: amina 10, e ácido 10-artemisinina etanoico, 22.

✓ *Método III:*

Repetiu-se o procedimento, fazendo o acoplamento em condições peptídicas:

Uma solução de ácido 10-artemisinina etanoico, composto 22 (0.39 g, 1.07×10^{-2} mol), DCC (0.35g; 1.58 mmol), HOBt (0.21g; 1.57 mmol) e N-metilmorfolina (0.37 mL; 6.64 mmol) em DCM (20 mL), permaneceu sob agitação, durante cerca de 5 horas. Uma solução da amina 10 (0.5 g, 1.33 mmol) em DCM (20mL) foi adicionada com uma cânula à mistura anterior. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 3 dias. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (8:2). A extração do composto foi feita com DCM (3

x 50 mL). A fase orgânica foi tratada com água destilada (70 mL). Secou-se o extrato orgânico com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Para purificar o produto recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). Recuperaram-se os respectivos reagentes: amina 10, e ácido 10-artemisinina etanoico 22.

IV. Referências bibliográficas

1. World Health Organization, *Guidelines for the treatment of malaria*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2nd ed., 2010.
2. Maxmen A., Nature-News, <http://www.nature.com/news/malaria-surge-feared-1.10643> (consultado a 13/08/2012).
3. a) OMS. Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf. (consultado a 13/08/2012).
b) OMS. Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2008. Disponível em: http://www.searo.who.int/LinkFiles/Reports_WMR_2008_Final.pdf (consultado a 14/08/2012)
4. Staines H. M., Krishna S., *Treatment and Prevention of Malaria-Antimalarial Drug Chemistry, Action and Use*, Springer Basel AG, 1th Ed., 2012.
5. White N.J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite*, Clinical Infectious Diseases, 2008, 46, p. 172 - 173.
6. Janneck L., Koyfman A., Takayesu K. J., *Clinical review of malaria for the emergency physician*, Africa Journal of Emergency Medicine, 2011, 1, p. 126 - 130.
7. <http://parasiticdiseases.org> (consultado a 13/08/2012)
8. Wirth, D.F., *Biological revelations*, Nature, 2002, 419, 6906, p. 495 - 496
9. Skinner-Adams T. S., Stack C. M., Trenholme K. R., Brown C. L., Grembecka J., Lowther J., Mucha A., Drag M., Kafarski P., McGowan S., Whisstock J. C., Gardiner D. L., Dalton J. P., *Plasmodium falciparum neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials*, Trends in Biochemical Sciences, 2009, 35, 1, p. 53 - 61.
10. Schulda N. J., Amalfitano A., *Malaria vaccines: Focus on adenovirus based vectors*, Vaccine, 2012, 30, p. 5191 - 5198.
11. D'Amato C., Torres J. P. M., Malm O., *DDQ: Toxicity and environmental contamination*, Qim. Nova, 2002, 25, 6, p. 995 - 1002.
12. Kumar V., Mahajan A., Chibale K., *Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17, p. 2236 - 2275.
13. David A. Fidock, Philip J. Rosenthal, Simon L. Croft, Reto Brun and Solomon Nwaka, *Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening*, Nature Reviews/Drug Discovery, 2004, 3, 509 - 520.
14. David H. Peyton, *Reversed Chloroquine Molecules as a Strategy to Overcome Resistance in Malaria*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012, 12, 400 - 407.
15. Philip J. R., MD, *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery*, Humana Press, 1th Ed., 2001.

16. World Health Organization, WHO, *Antimalarial drug combination therapy*, Geneva, 2000, p. 7 - 8.
17. Marcus B., Ph.D., *Deadly Diseases and Epidemics: Malaria*, Infobase Publishing, 2nd Ed., 2009.
18. Crespo-Ortiz M. P., Wei M. Q., *Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: From a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, p. 1 - 18.
19. Opsenica, D.M.; Solaja, B.A, *Antimalarial Peroxides – Review*; Journal of the Serbian Chemistry Society; 2009, 74, 11, p. 1155 - 1193.
20. Posner G.H., *et al.*, *C-10 carbon-substituted artemisinin-like trioxane compounds having antimalarial, antiproliferative and antitumor activities*, U.S. Patent 6160004, 2000.
21. O'Neill P. M., Barton V. E., Ward S. A., *The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin – The Debate Continues*, *Molecules*, 2010, 15, p. 1705 - 1721.
22. O'Neill P. M., Posner G. H., *A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47, p. 2945 - 2964.
23. Hastings, I., *How Artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance*, *Trends in Parasitology*, 2011, 27, 2, p. 67 - 72.
24. Vennerstrom J. L., Dong Y. X., Chollet J., Matilde H., *Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials*; US Patent 6486199B1, 2002.
25. Araújo N. C. P., Barton V., Jones M., Stocks P. A., Ward S. A., Davies J., Bray P. G., Shone A. E., Cristiano M. L. S., O'Neill P. M., *Semi-synthetic and synthetic 1,2,4-trioxaquines and 1,2,4-trioxolaquines: synthesis, preliminary SAR and comparison with acridine endoperoxide conjugates*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, p. 2038 - 2043.
26. Dong Y., Tang Y., Chollet J., Matile H., Wittlin S., Charman S. A., Charman W. N., Tomas J. S., Scheurer C., Snyder C., Scorneaux B., Bajpai S., Alexander S. A., Wang X., Padmanilayam M., Cheruku S. R., Brun R., Vennerstrom J. L., *Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14, p. 6368 - 6382.
27. Schlitzer M., *Malaria chemotherapeutics Part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drug in clinical development*, *ChemMedChem*, 2007, 2, p. 944 - 986.
28. Creek D. J., Charman W. N., Chiu F. C. K., Prankerd R. J., Dong Y., Vennerstrom J. L., Charman S. A., *Relationship between Antimalarial Activity and Heme Alkylation for Spiro- and Dispiro-1,2,4-Trioxolane Antimalarials*, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2008, 52, 4, p. 1291 - 1296.
29. Amewu R., Stachulski A. V., Ward S. A., Berry N. G., Bray P. G., Davies J., Labat G., Vivasc L., O'Neill P. M., *Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes*;

- synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin*, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, p. 4431 - 4436.
30. O'Neill P. M., Amewu R. K., Nixon G. L., Elgarah F. B., Mungthin M., Chadwick J., Shone A. E., Vivas L., Lander H., Barton V., Muangnoicharoen S., Bray P. G., Davies J., Park B. K., Wittlin S., Brun R., Preschel M., Zhang K., and Ward S. A., *Identification of a 1,2,4,5-Tetraoxane Antimalarial Drug-Development Candidate (RKA182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins*, *Angew. Chem. Int.*, 2010, 49, p. 5693 - 5697.
31. Gemma S., Martí F., Gabellieri E., Campiani G., Novellino E., Butini S., *Synthetic studies toward 1,2-dioxanes as precursors of potential endoperoxide-containing antimalarials*, *Tetrahedron Letters*, 2009, 50, p. 5719 - 5722.
32. Borstnik K., Paik I., Shapiro T. A., Posner G. H., *Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds*, *International Journal for Parasitology*, 2002, 32, p. 1661 - 1667.
33. Gardner M. J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R. W., Carlton J. M., Pain A., Nelson K. E., Bowman S., Paulsen I. T., James K., Eisen J. A., Rutherford K., Salzberg S. L., Craig A., Kyes S., Chan M. S., Nene V., Shallom S. J., Suh B., Peterson J., Angiuoli S., Perlea M., Allen J., Selengut J., Haft D., Mather M. W., Vaidya A. B., Martin D. M. A., Fairlamb A. H., Fraunholz M. J., Roos D. S., Ralph S. A., McFadden G. I., Cummings L. M., Subramanian G. M., Mungall C., Venter J. C., Carucci D. J., Hoffman S. L., Newbold C., Davis R. W., Fraser C. M., Barrell B., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*, *Nature*, 2002, 419, 6906, p. 498 - 511.
34. Kawashima E., Ohba Y., Terui Y., Kamaike K., *Design, Synthesis, and Analysis of Minor Groove Binder Pyrrolepolyamide-2-Deoxyguanosine Hybrids*, *Journal of Nucleic Acids*, 2010, p.1 - 13.
35. Chakraborty T. K., Mohan B. K., Gnanamani M., Maiti S., *Synthesis and DNA binding properties of pyrrole amino acid-containing peptides*, *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, p. 647 - 651.
36. Hotzel C., Marotto A., Pindu U., *New propylamine oligopyrrole carboxamides linked to a heterocyclic or anthraquinone system: synthesis, DNA binding, topoisomerase I inhibition and cytotoxicity*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 38, p. 189 - 197.
37. Baraldi P. G., Preti, D., Fruttarolo, F., Tabrizi, M. A., Romagnoli, R., *Hybrid molecules between distamycin A and active moieties of antitumor agents*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, p. 17 - 35.
38. Chadwick J., Mercer A. E., Park B. K., Cosstick R., O'Neill P. M., *Synthesis and biological evaluation of extraordinarily potent C-10 carba artemisinin dimers against P. falciparum malaria parasites and HL-60 cancer cells*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17, p. 1325 - 1338.
39. Stocks P. A., Bray P. G., Barton V. E., Al-Helal M., Jones M., Araujo N. C., Gibbons P., Ward S. A., Hughes R. H., Biagini G. A., Davies J., Amewu R., Mercer A. E., Ellis G.,

- O'Neill P. M., *Evidence for A Common Non-Heme Chelatable-Iron-Dependent Activation Mechanism for Semisynthetic and Synthetic Endoperoxide Antimalarial Drugs*, *Angew. Chem.* 2007, 119, p. 1 - 7.
40. Nishiwaki E., Tanaka S., Lee H., Shibuya M., *Efficient synthesis of oligo-N-methylpyrrolicarboxamides and related compounds*, *Heterocycles*, 1998, 27, p. 1945 - 1952.
41. Thomas M., Varshney U., Bhattacharya S., *Distamycin analogues without leading amide at their N-termini – Comparative binding properties to AT- and GC- rich DNA sequences*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, p. 3604 - 3615.
42. La Pensée L., Sabbani S., Sharma R., Bhamra I., Shore E., Mercer A., Firman J., Araujo N., Cabral L., Cristiano M., Bateman C., Janneh O., Gavrila A., Wu Y. H., Hussain A., Shone A., Stocks P., Cosstick R., O'Neill P., *Artemisinin Polypyrrole Conjugates; Synthesis, DNA Binding Studies and Preliminary Cytotoxicity Evaluation*, *ChemMedChem*, 2012, submetido.
43. Donohoe T.J.; *Oxidation and Reduction in Organic Synthesis*, Oxford University Press, 2000, p. 46.
44. Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G.; *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition, Vogel's, London, 1989.

V. Anexos

5.1. Espectros dos diferentes agentes de ligação ao ADN

➤ Espectros relativos ao composto 2

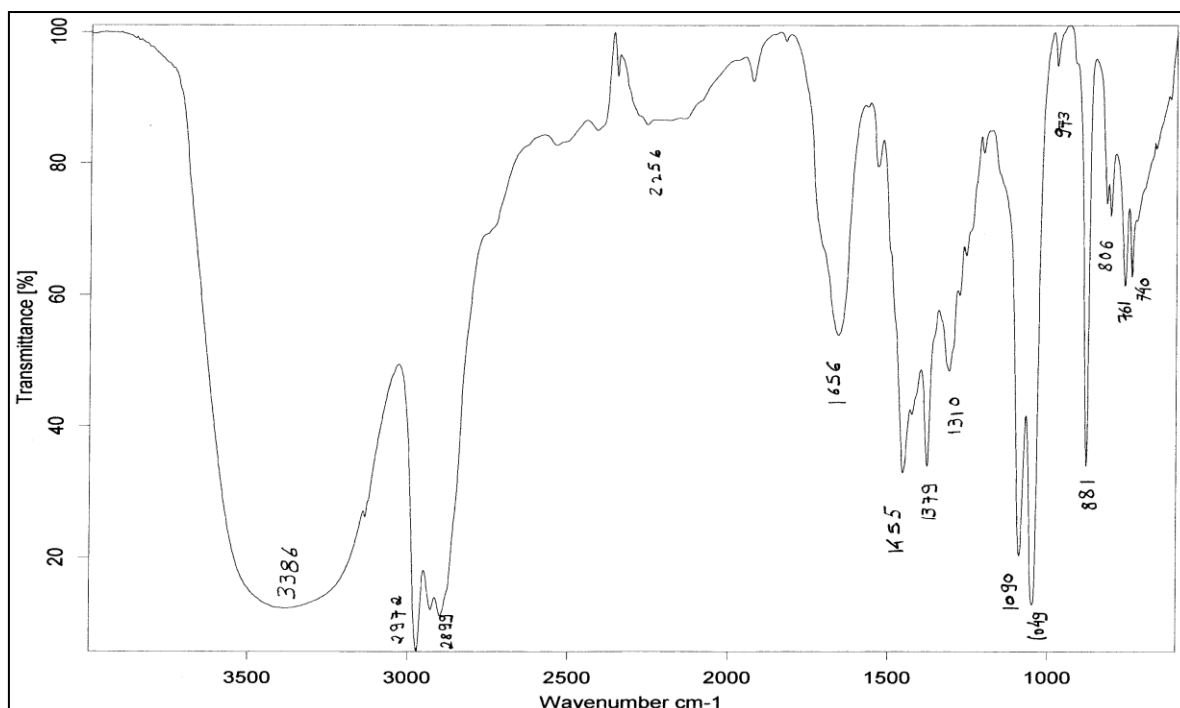


Figura 5.1. Espectro de infravermelho obtido para o composto 2.

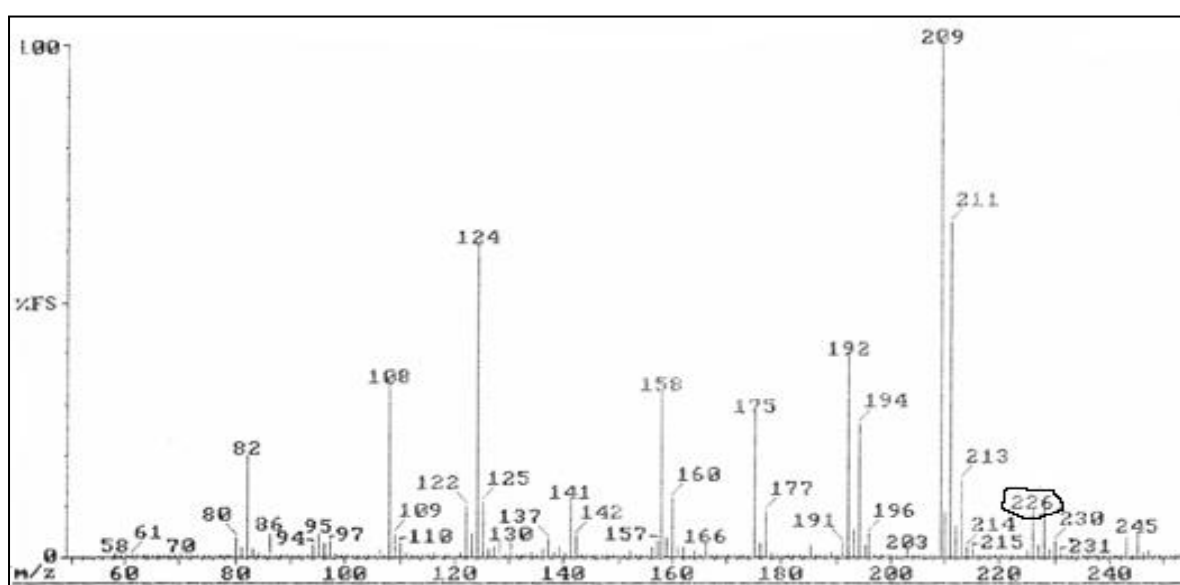


Figura 5.2. Espectro de massa obtido para o composto 2.

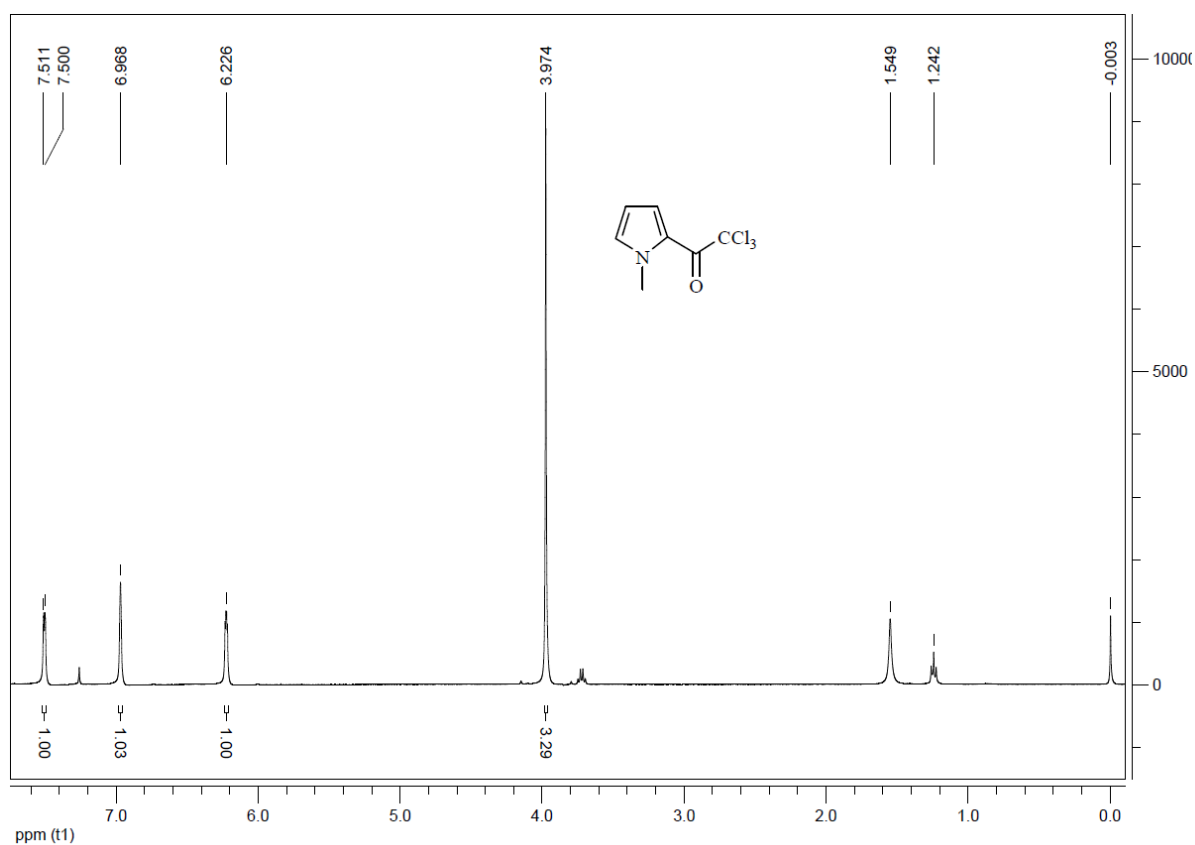


Figura 5.3. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ obtido para o composto 2.

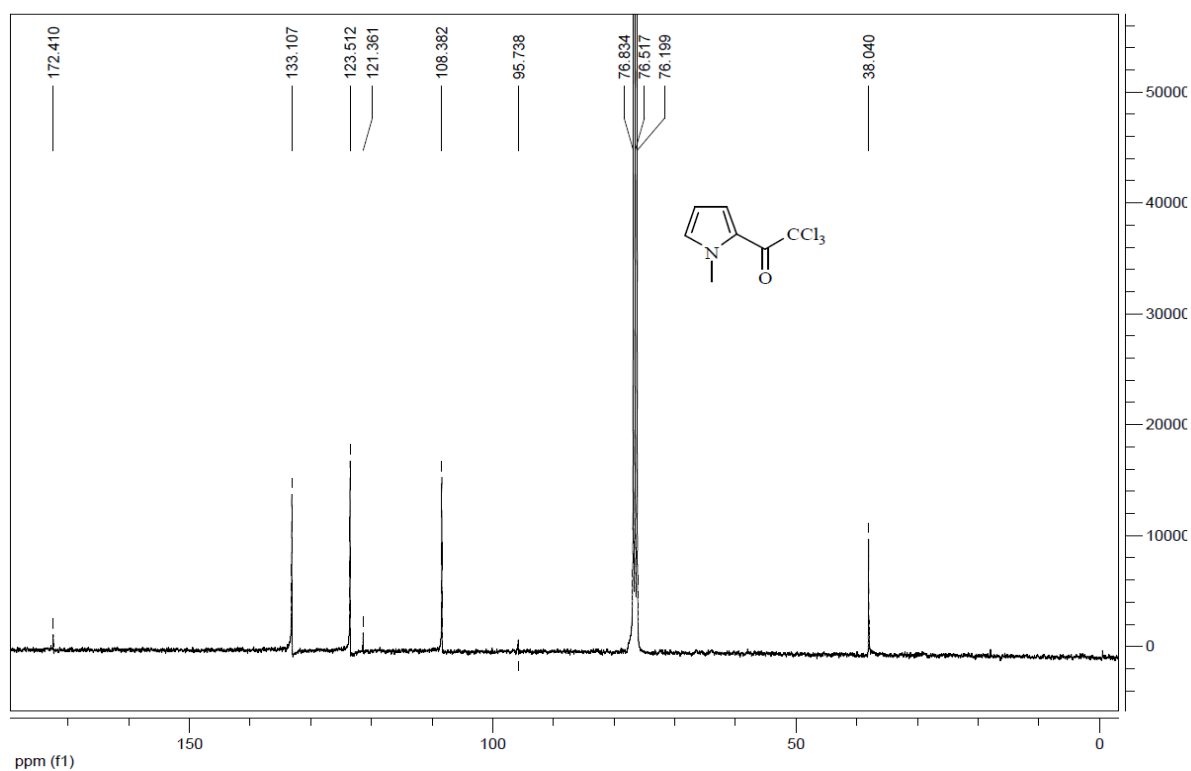
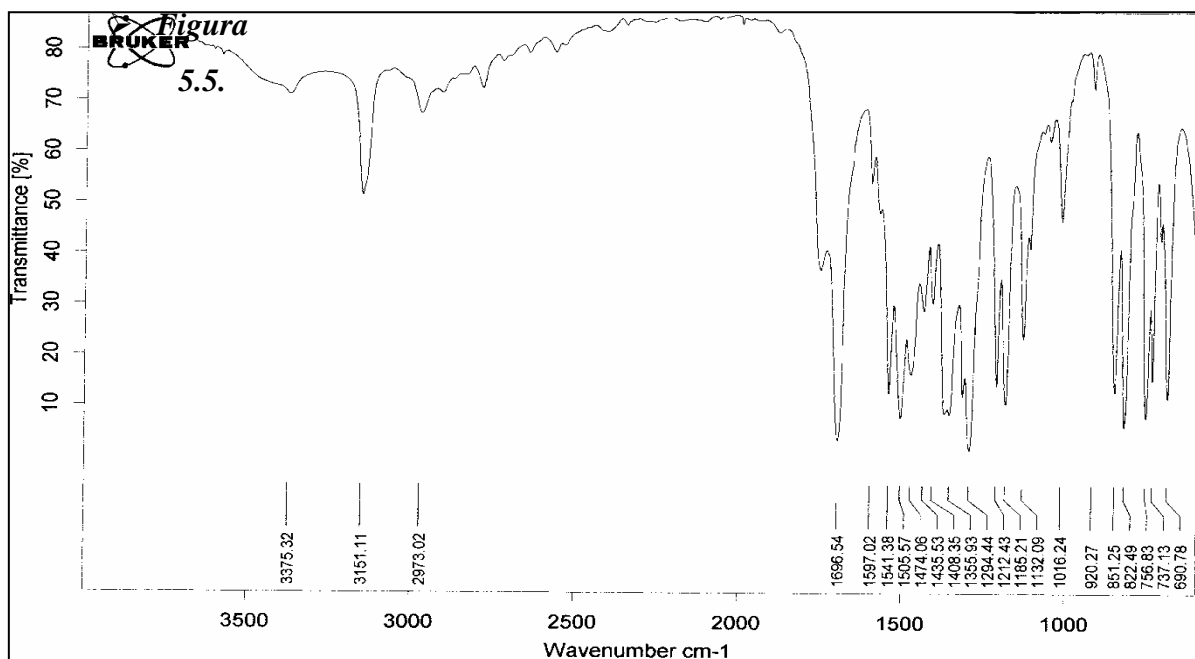


Figura 5.4. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ obtido para o composto 2.

➤ Espectros relativos ao composto 3



Espectro de infravermelho obtido para o composto 3.

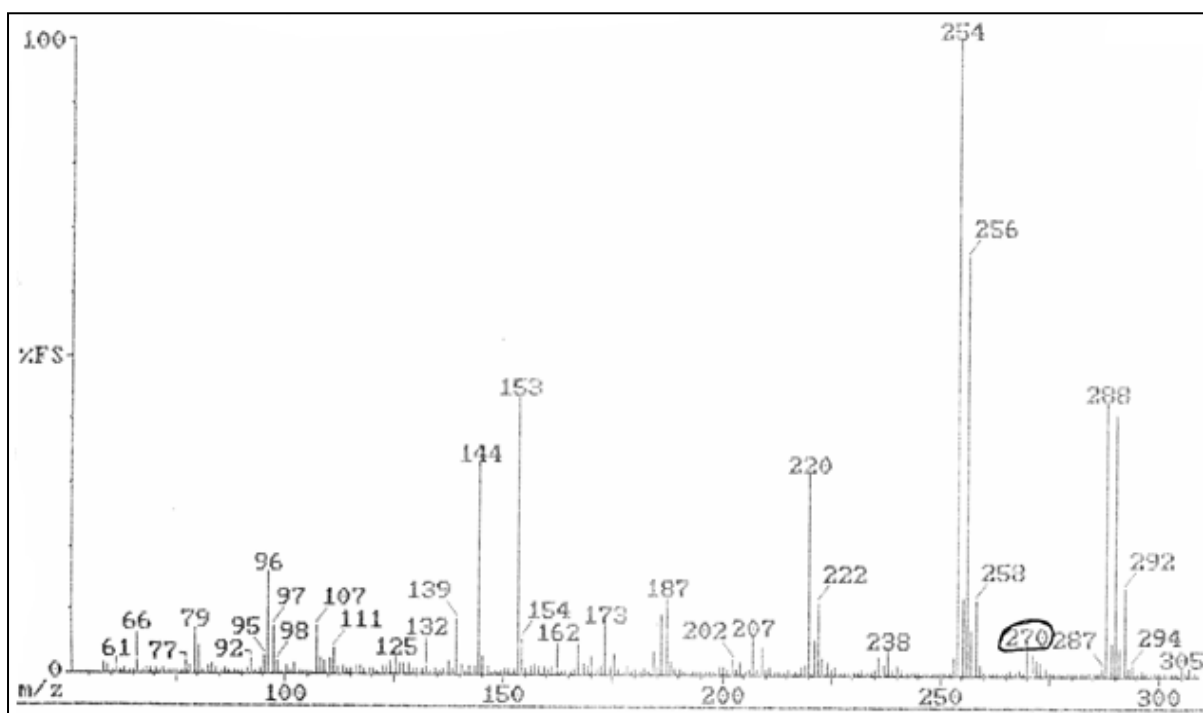


Figura 5.6. Espectro de massa obtido para o composto 3.

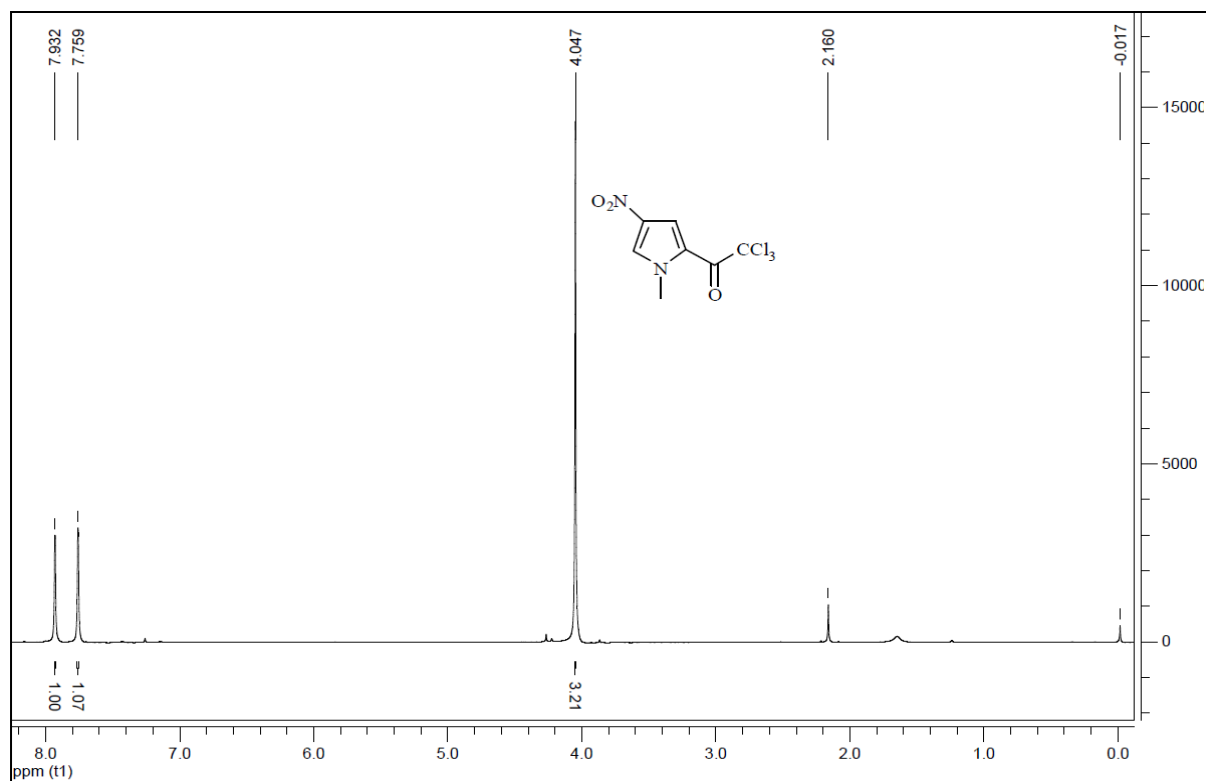


Figura 5.7. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 3.

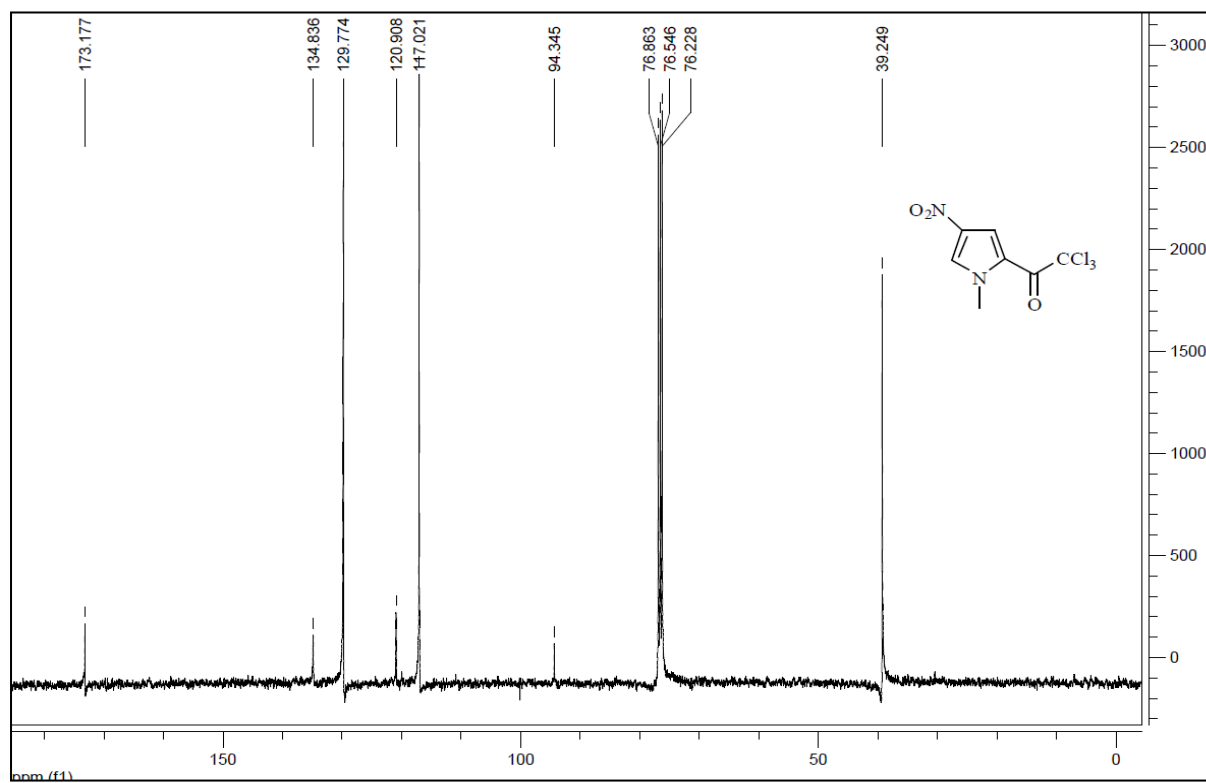


Figura 5.8. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 3.

➤ Espectros relativos ao composto 4

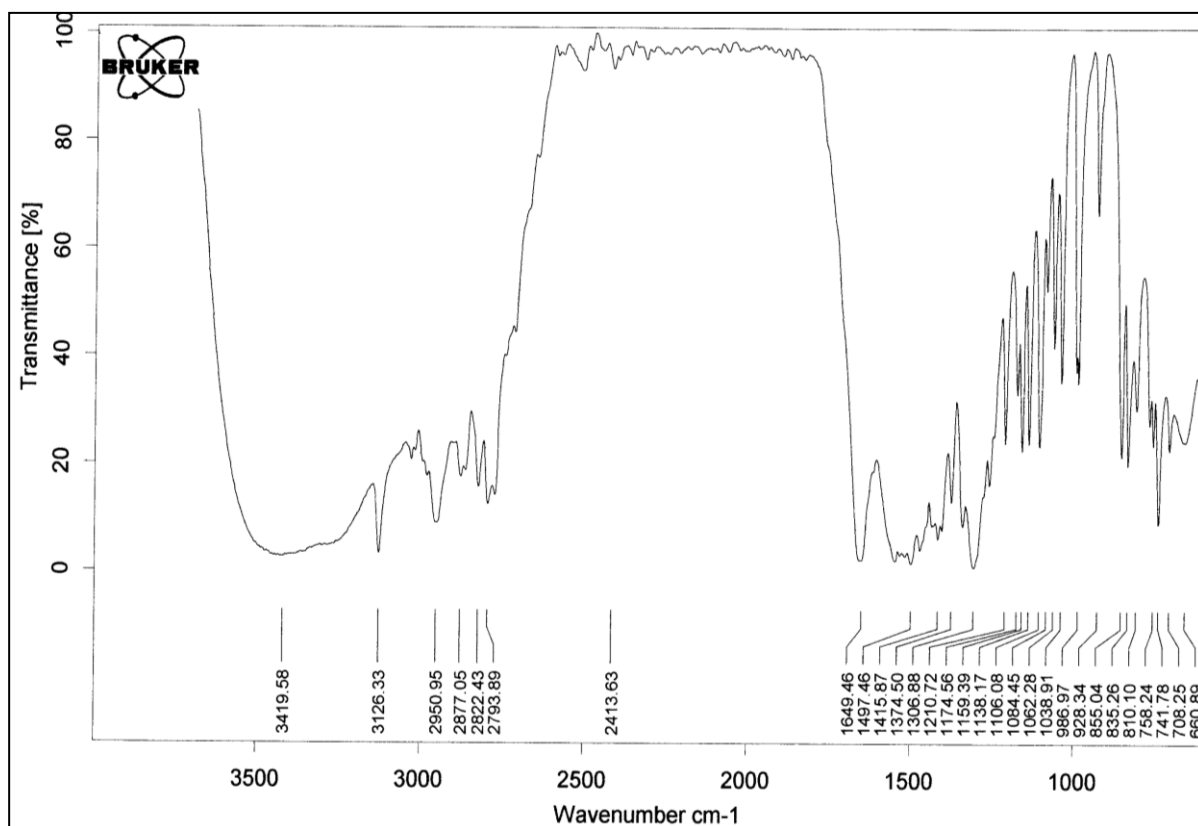


Figura 5.9. Espectro de infravermelho obtido para o composto 4.

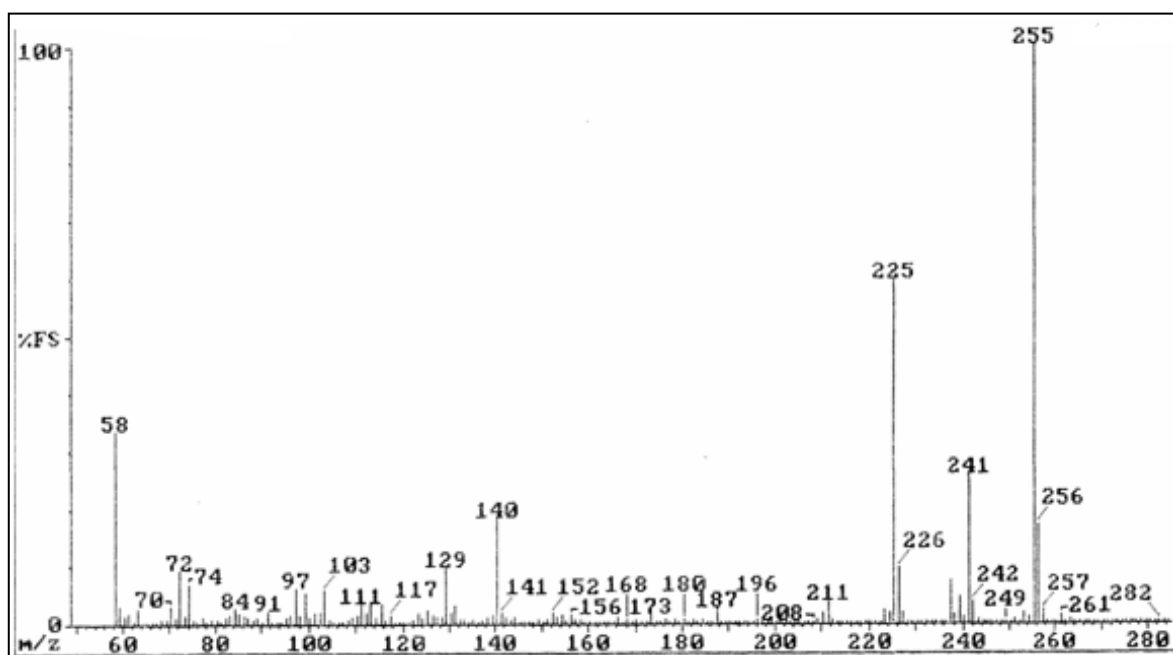


Figura 5.10. Espectro de massa obtido para o composto 4.

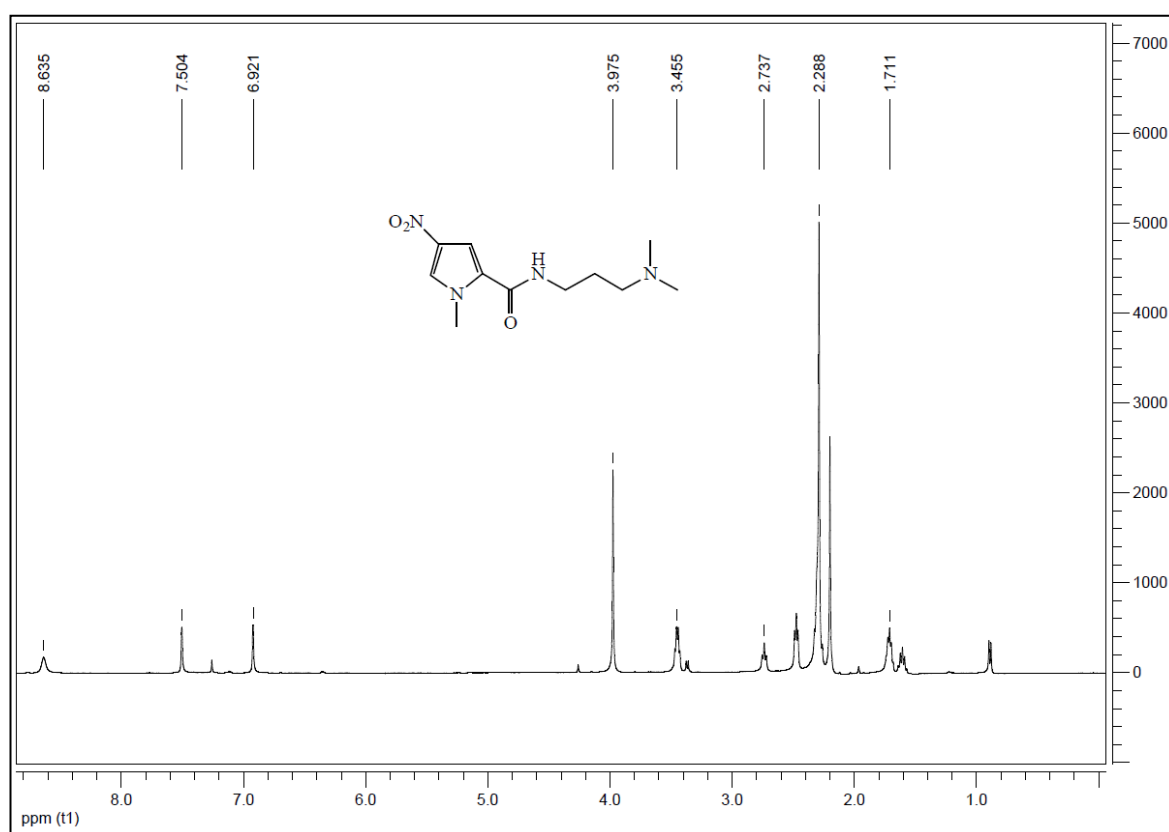


Figura 5.11. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 4.

➤ Espectros relativos ao composto 6

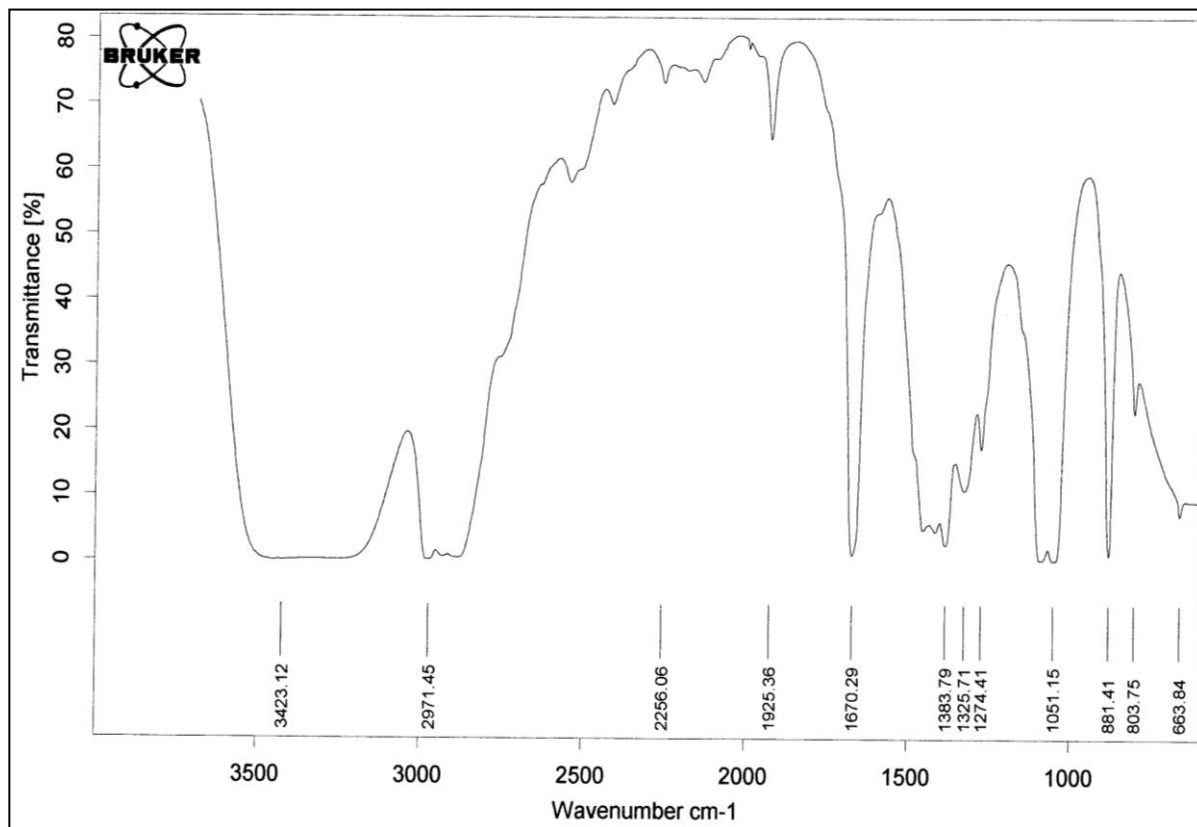


Figura 5.12. Espectro de infravermelho obtido para o composto 6.

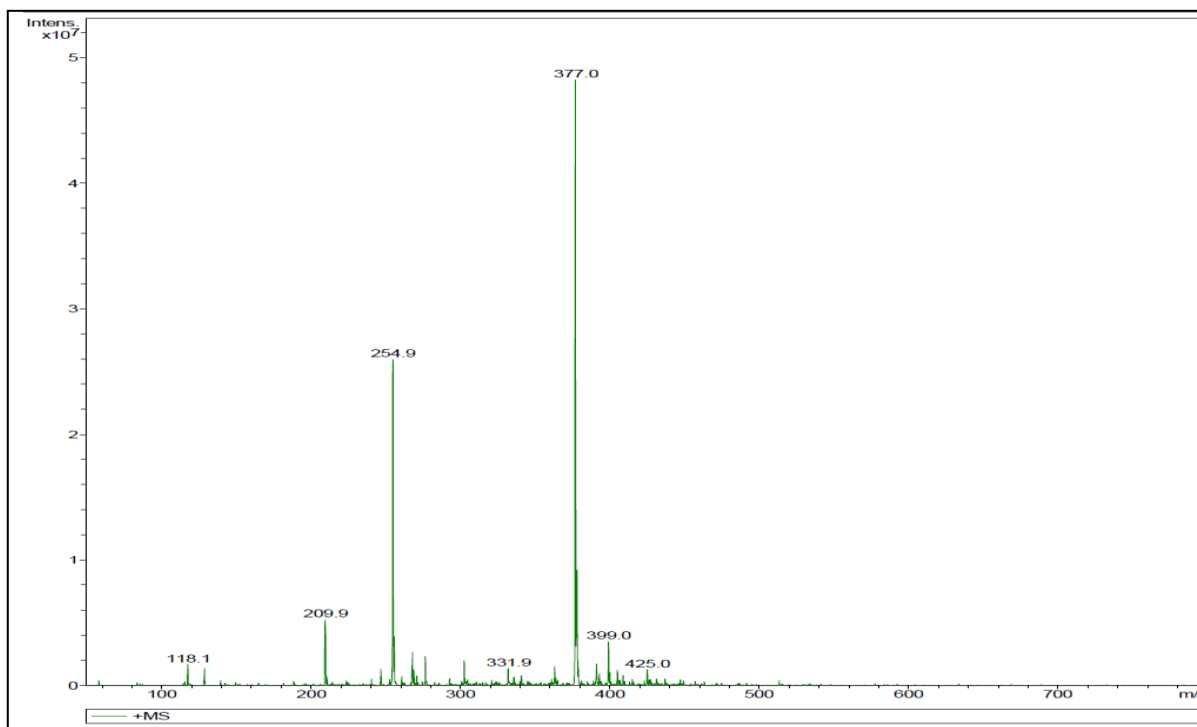


Figura 5.13. Espectro de massa obtido para o composto 6.

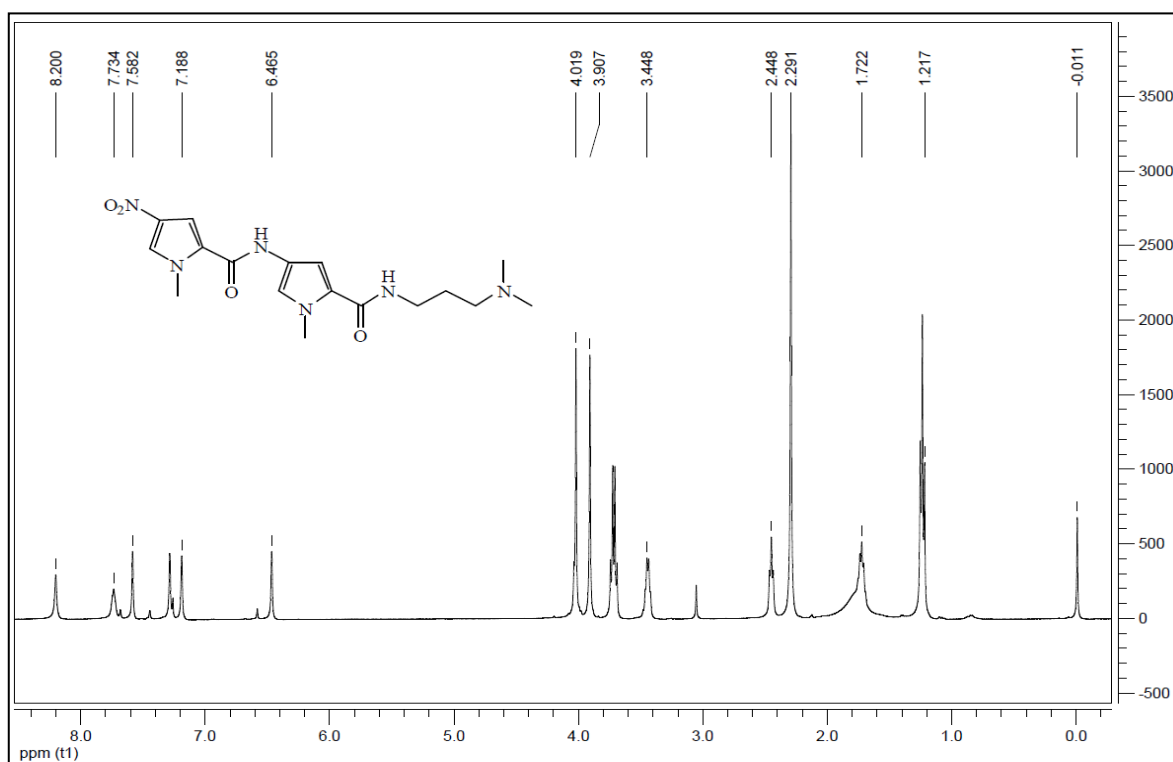


Figura 5.14. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 6.

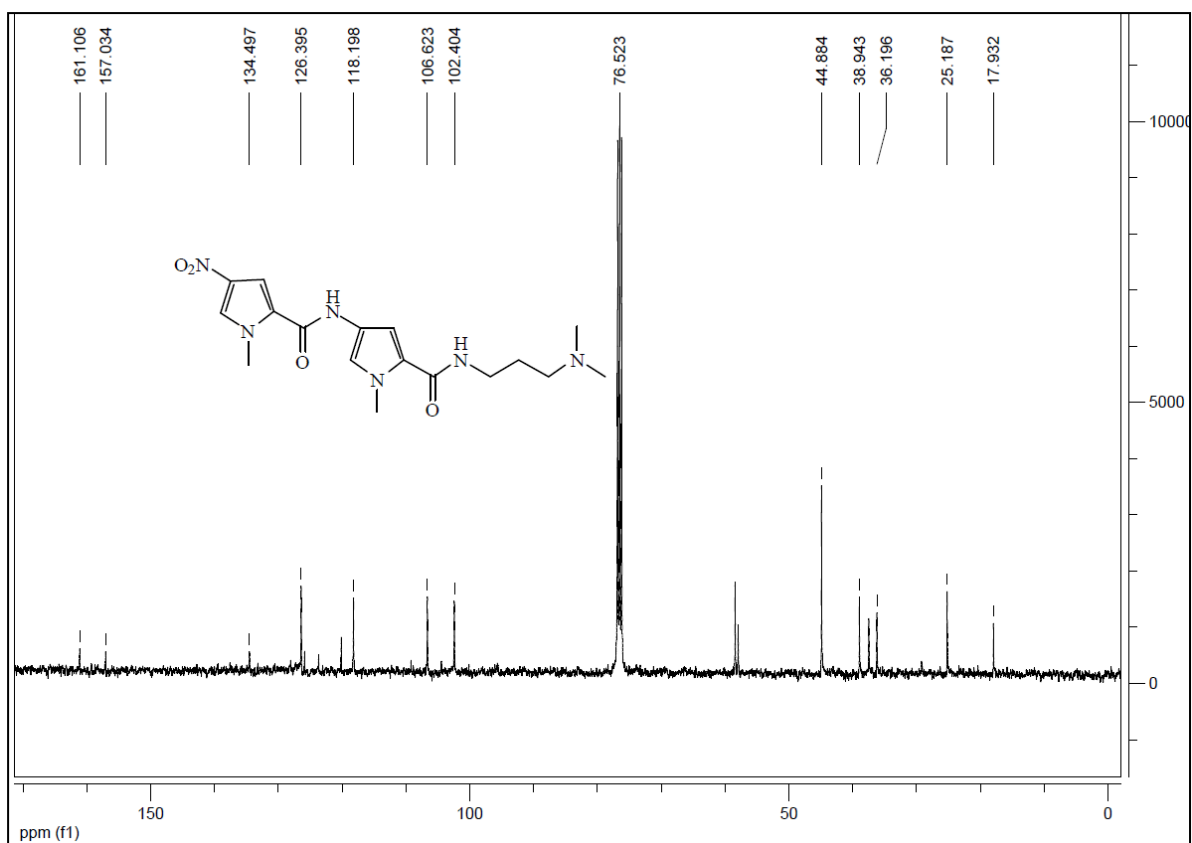


Figura 5.15. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 6.

➤ Espectros relativos ao composto 7

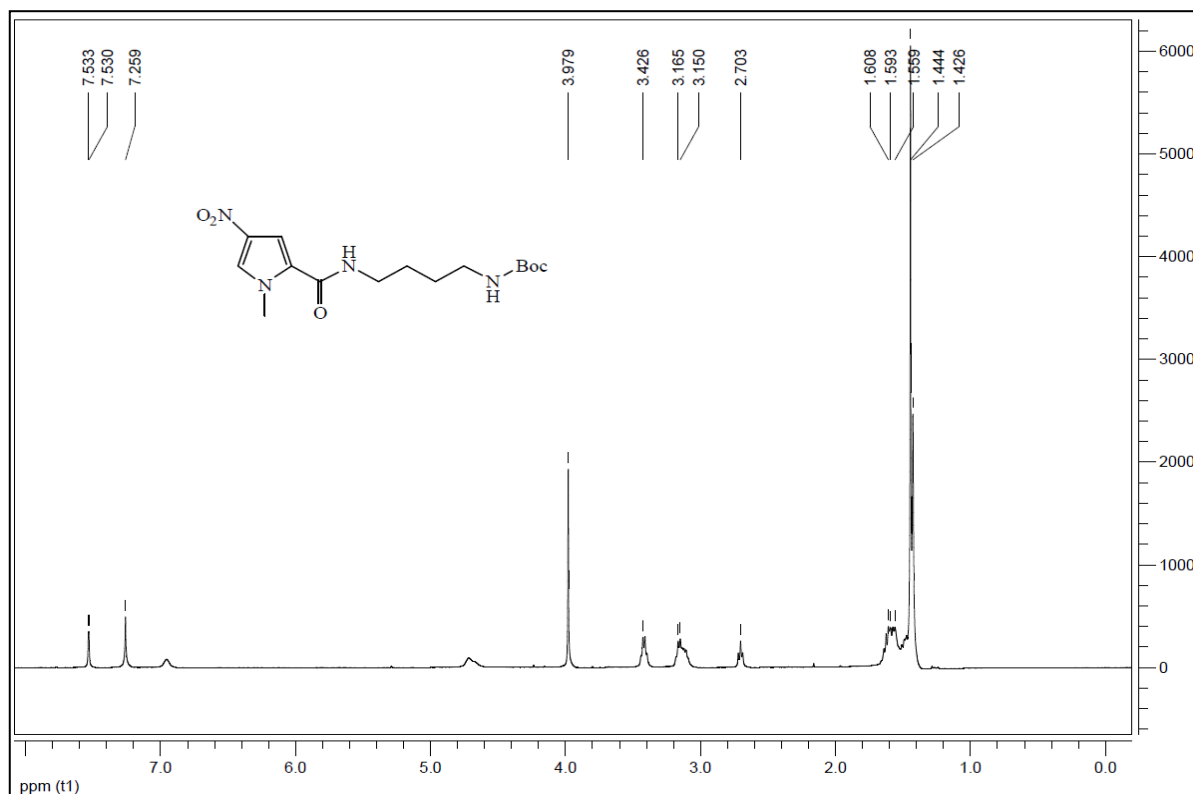


Figura 5.16. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 7.

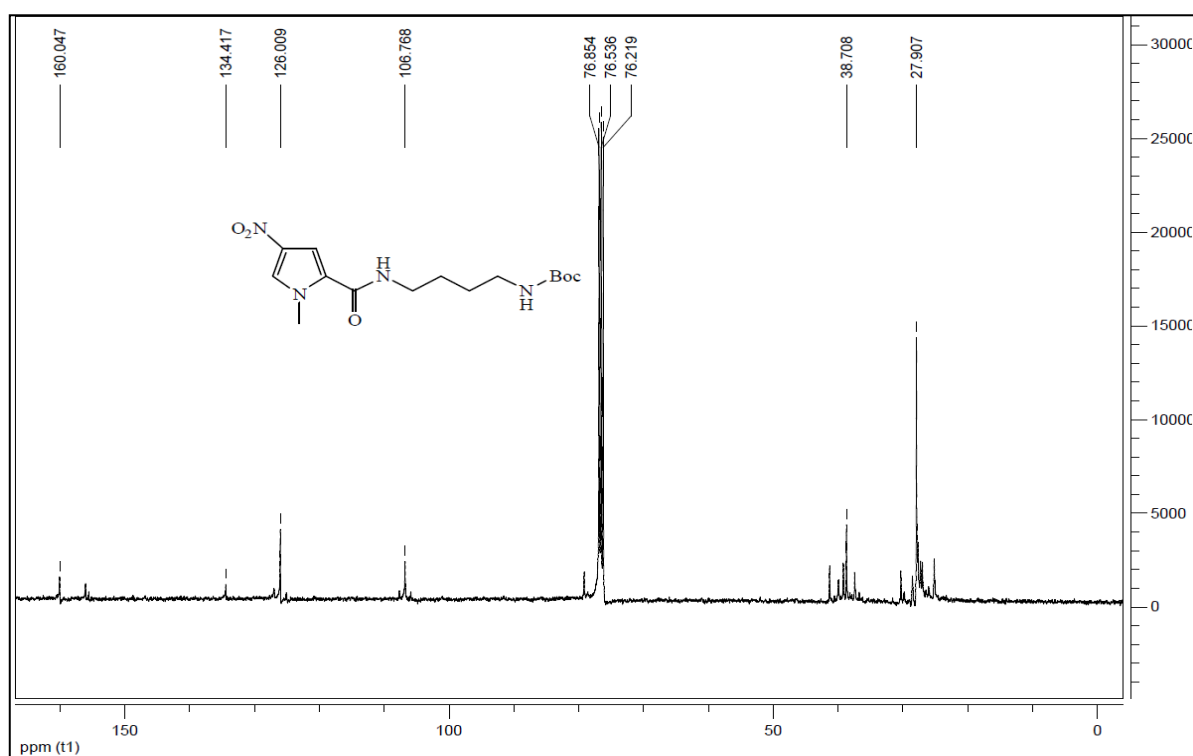


Figura 5.17. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 7.

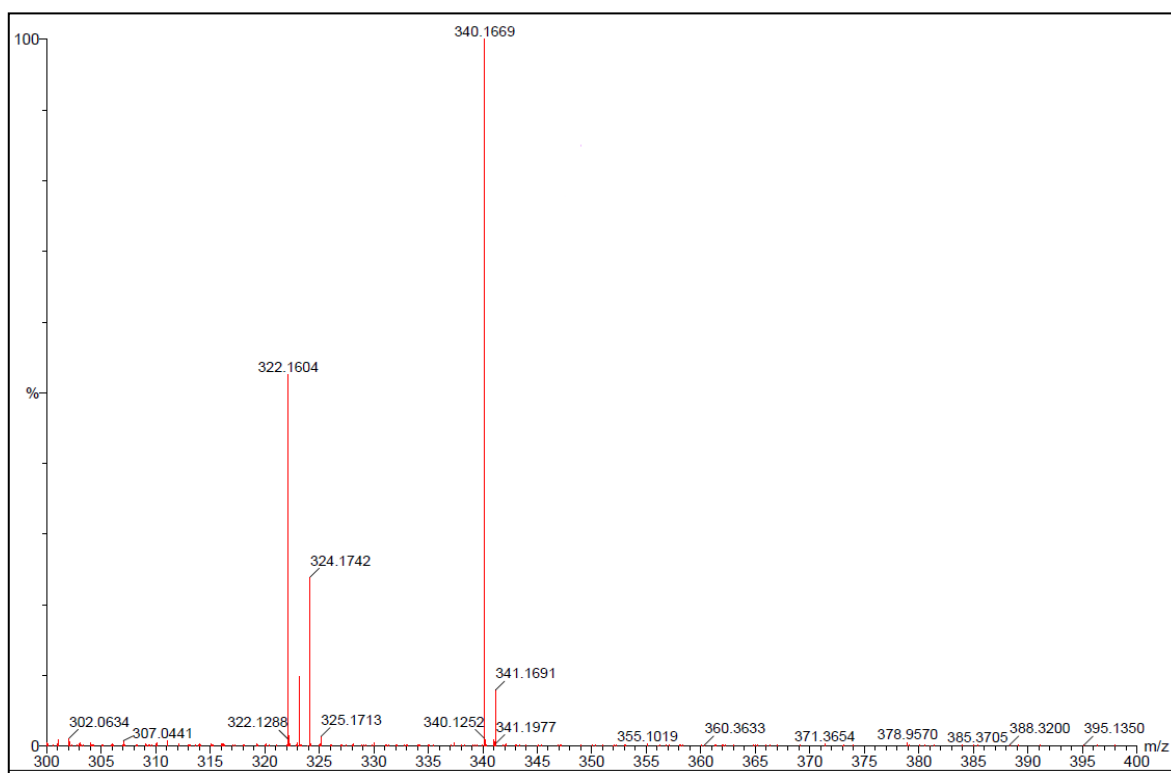


Figura 5.18. Espectro de massa obtido para o composto 7.

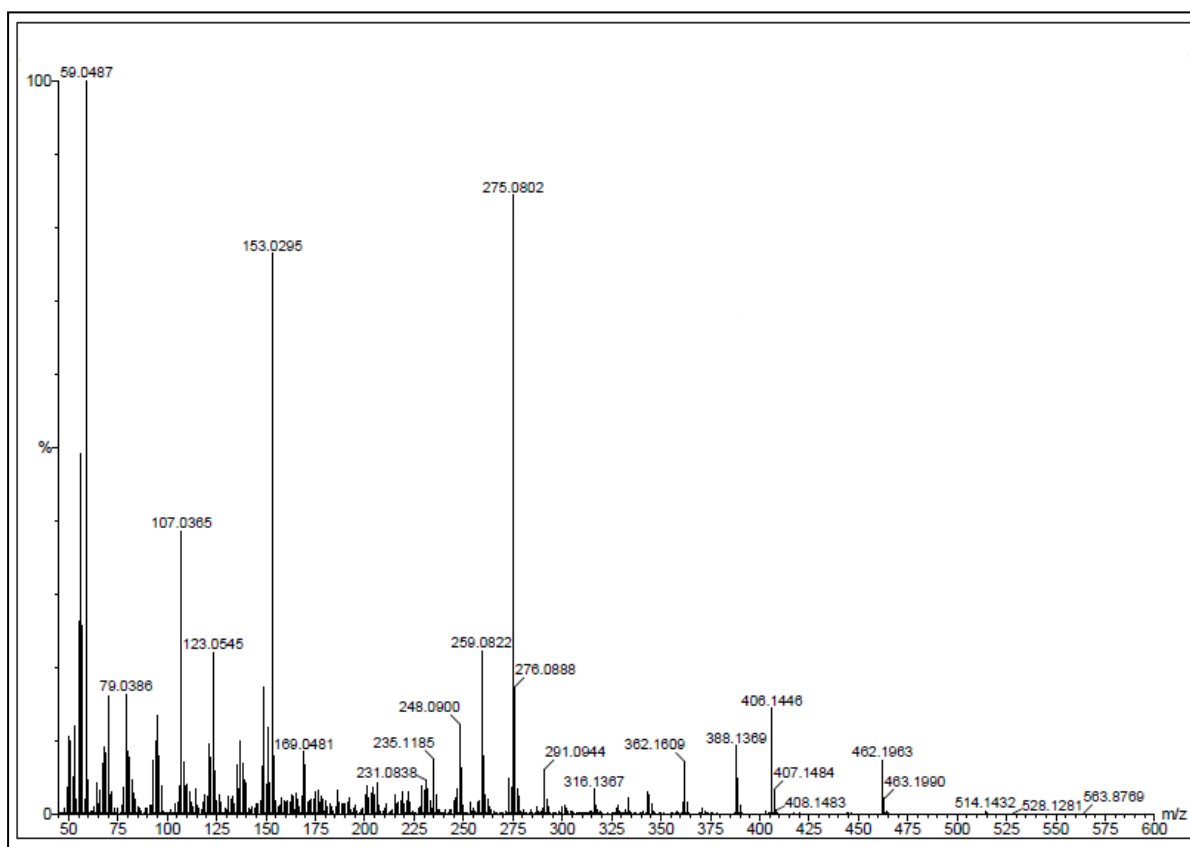
➤ **Espectro relativo ao composto 9**

Figura 5.19. Espectro de massa obtido para o composto 9.

➤ **Espectro relativo ao composto 10**

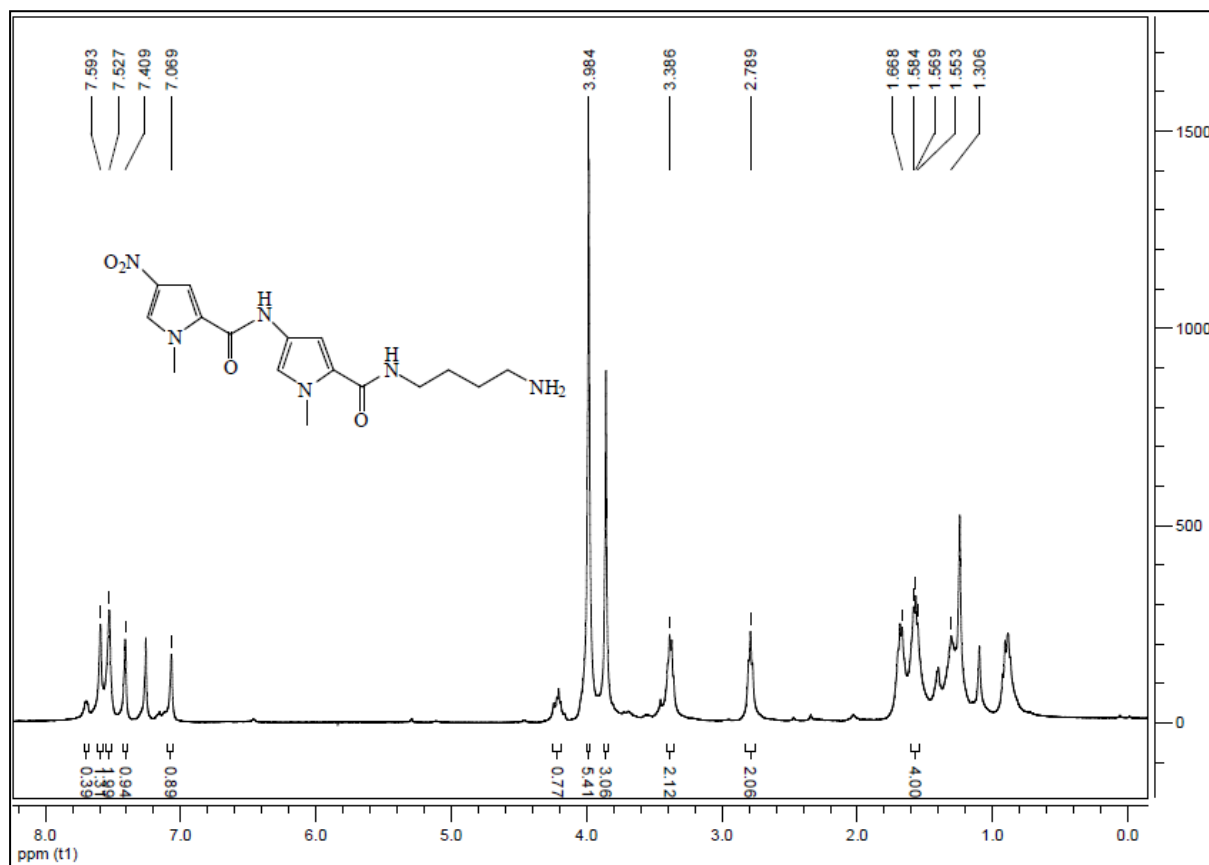


Figura 5.20. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 10.

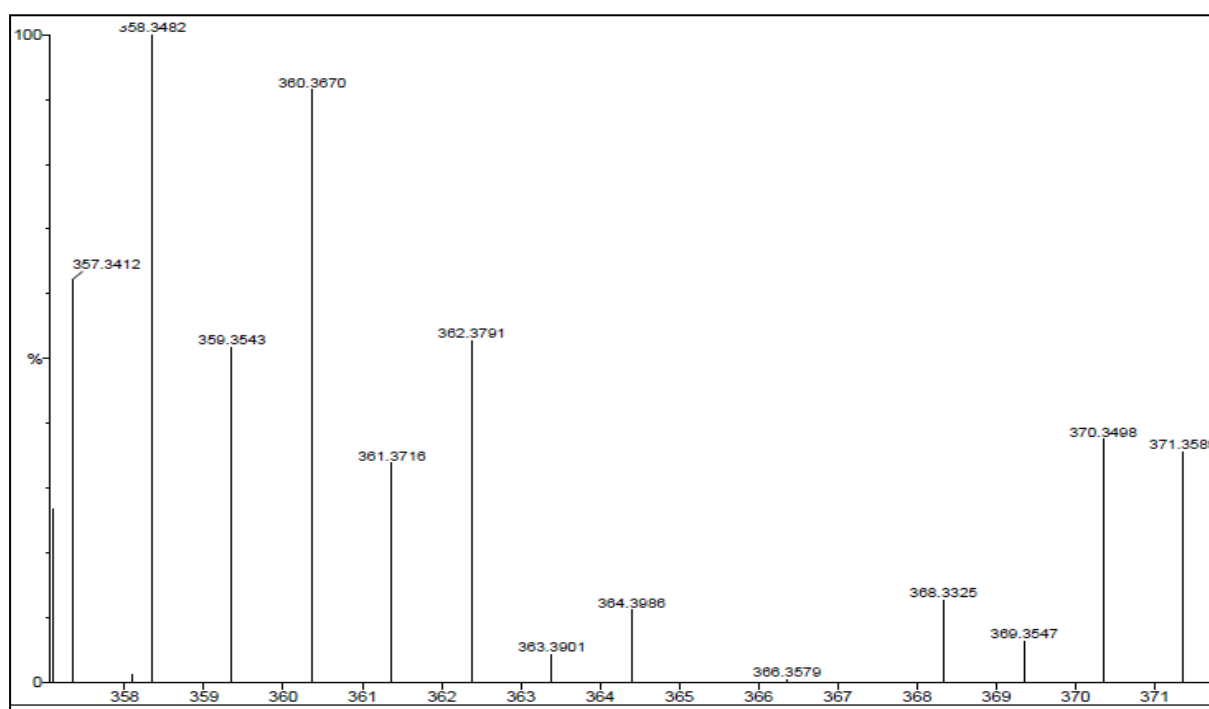


Figura 5.21. Espectro de massa obtido para o composto 10.

➤ Espectros relativos ao composto 12

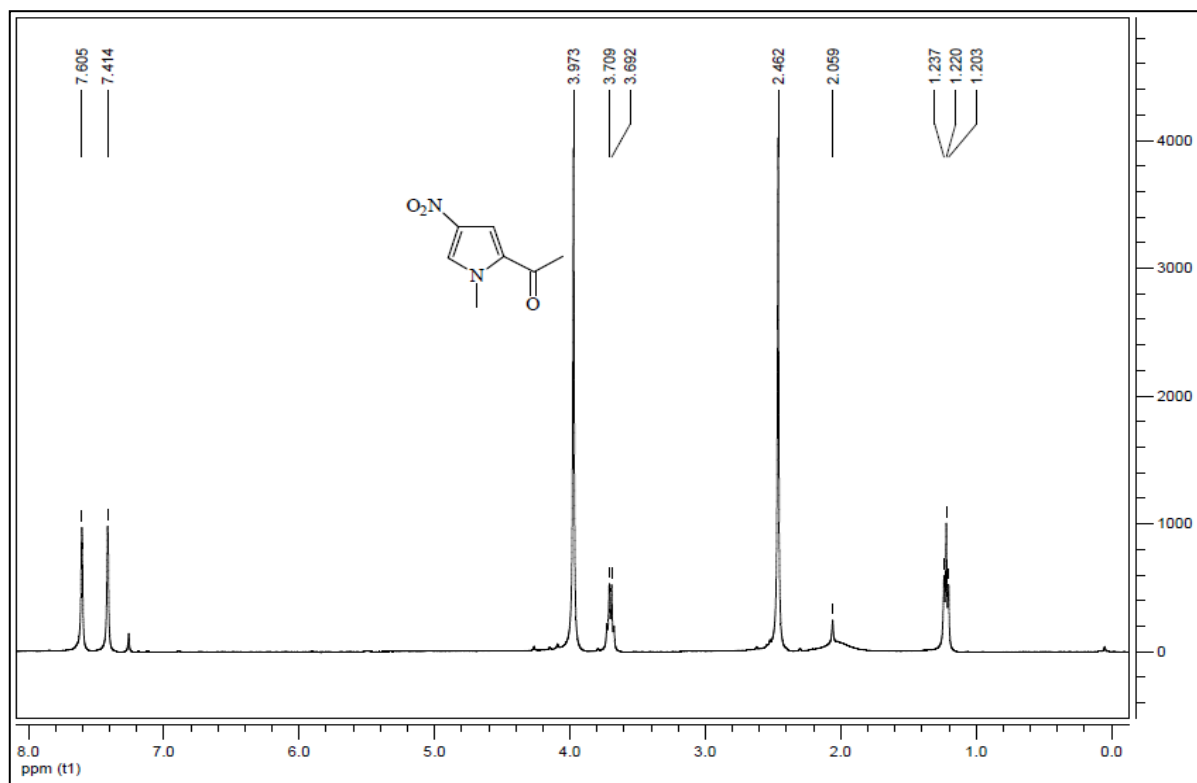


Figura 5.22. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ obtido para o composto 12.

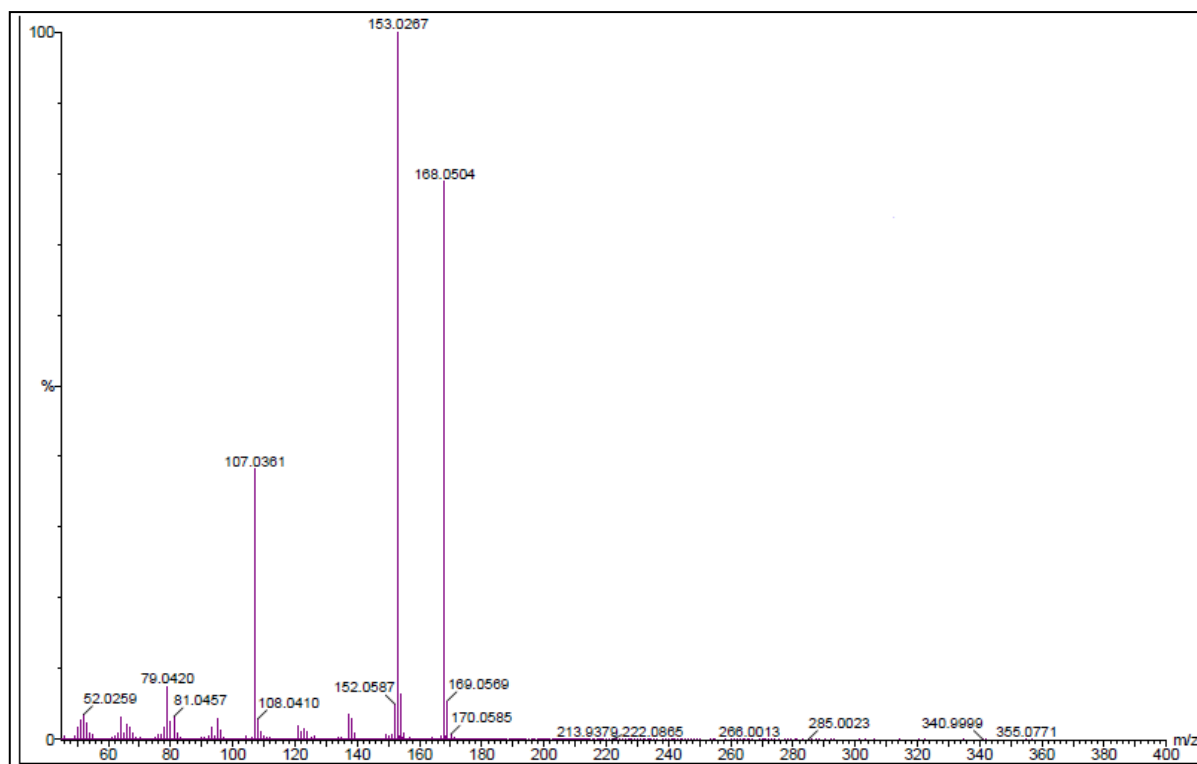


Figura 6.23. Espectro de massa obtido para o composto 12.

➤ Espectros relativos ao composto 14

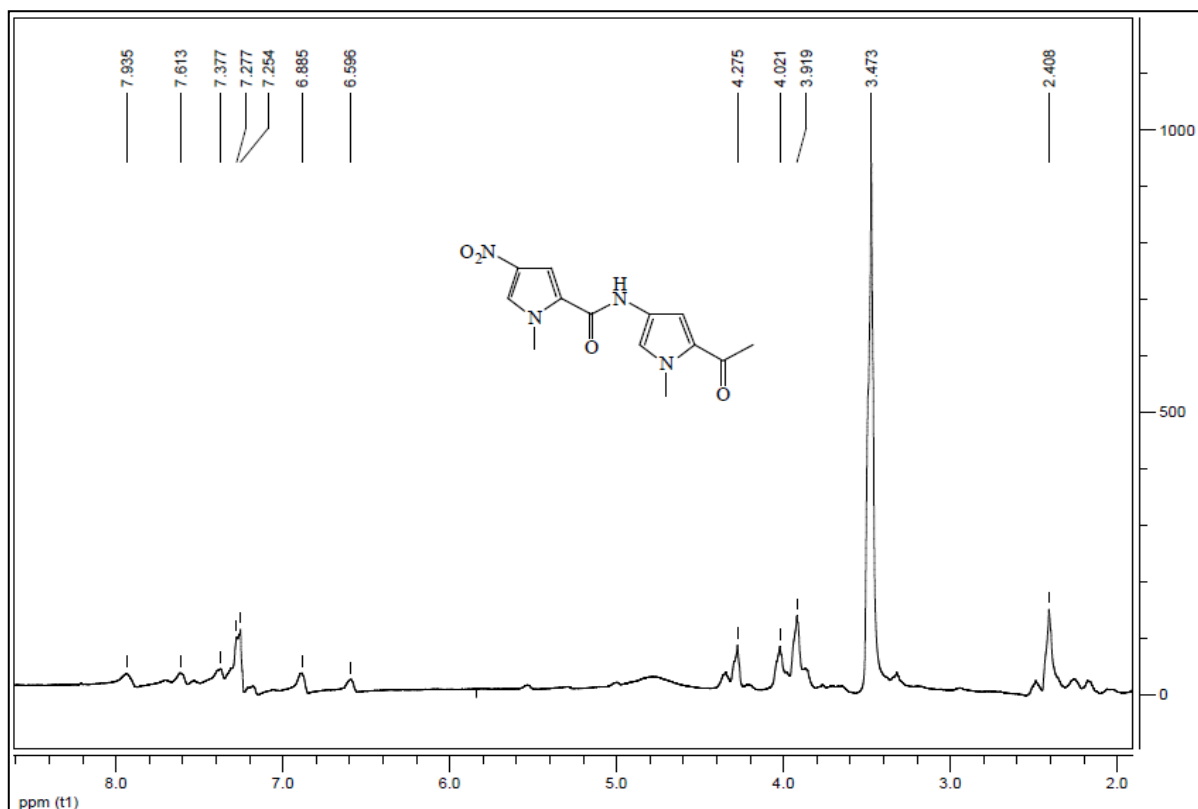


Figura 5.24. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ obtido para o composto 14.

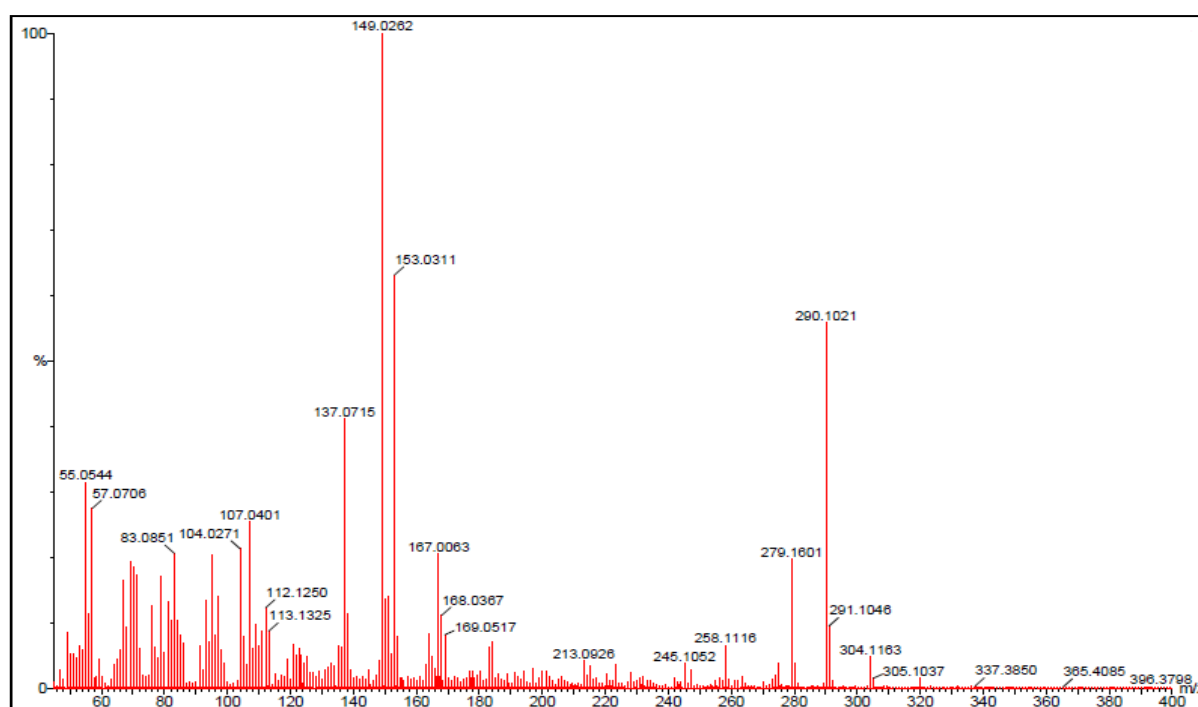


Figura 5.25. Espectro de massa obtido para o composto 14.

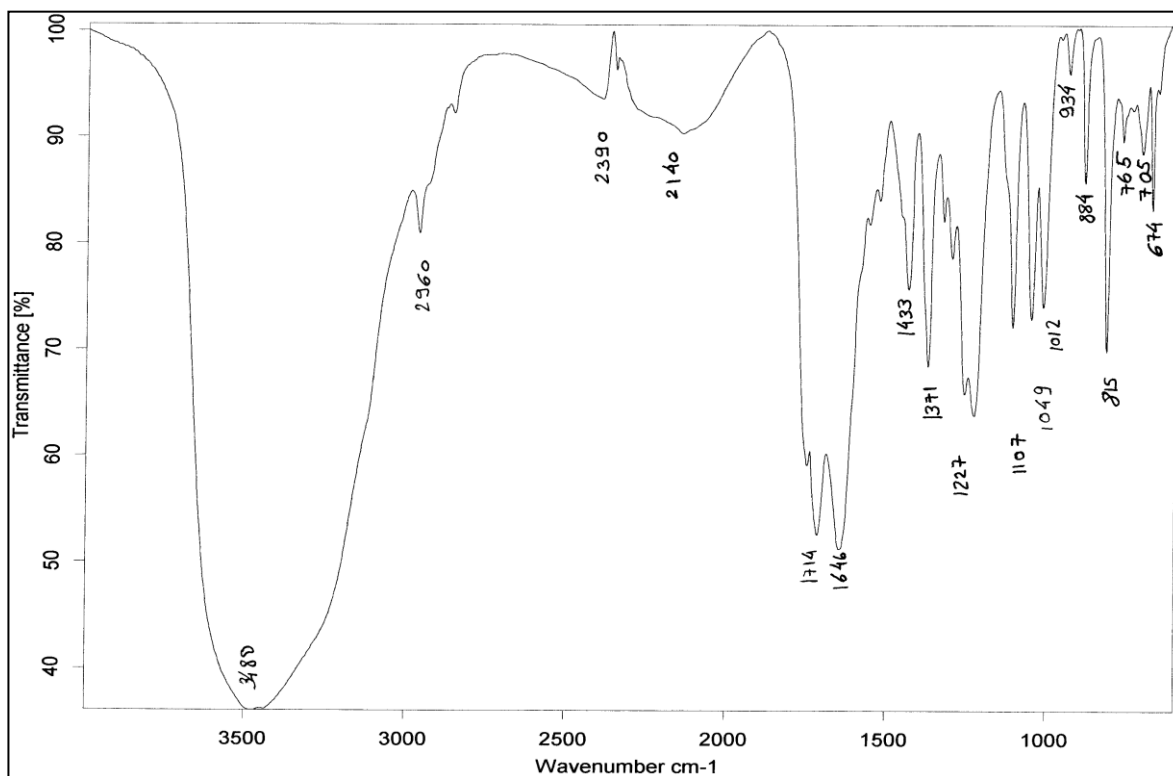
➤ **Espetro relativo ao composto 15**

Figura 5.26. Espectro de infravermelho obtido para o composto 15.

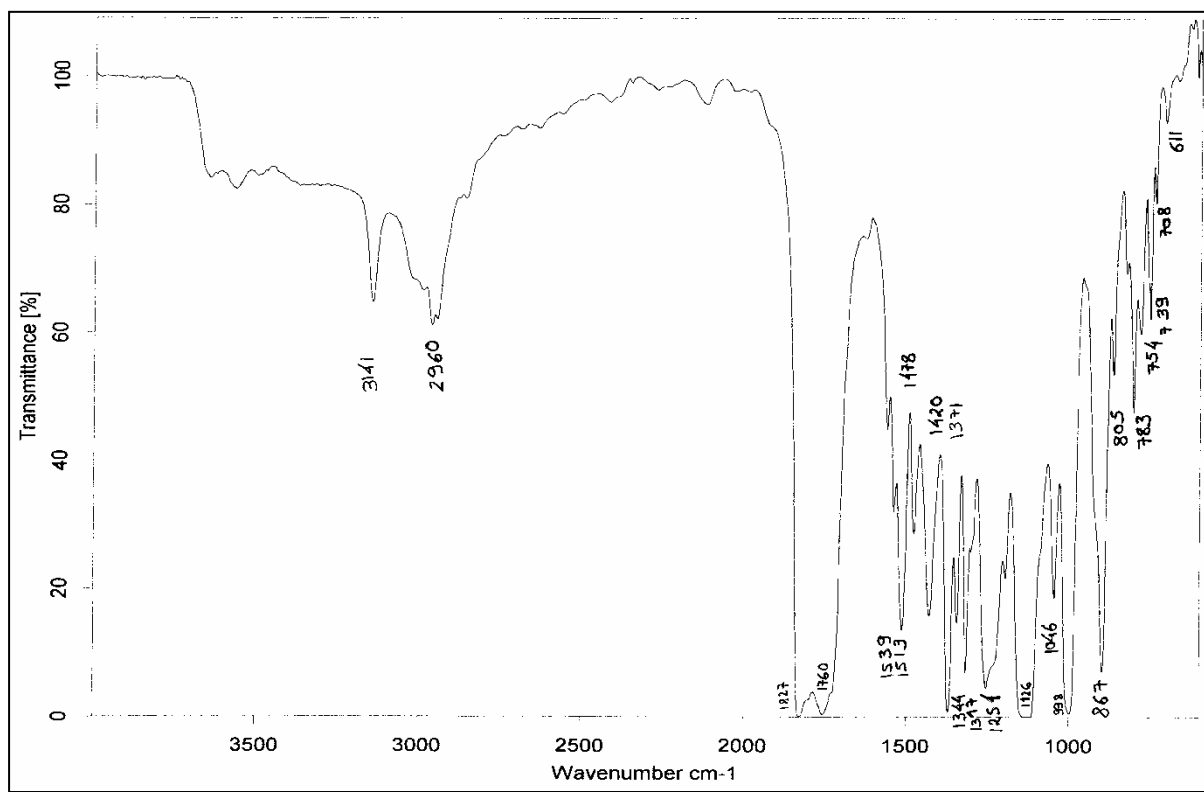
➤ **Espetro relativo ao composto 16**

Figura 5.27. Espetro de infravermelho obtido para o composto 16.

➤ Espectros relativos ao composto 18

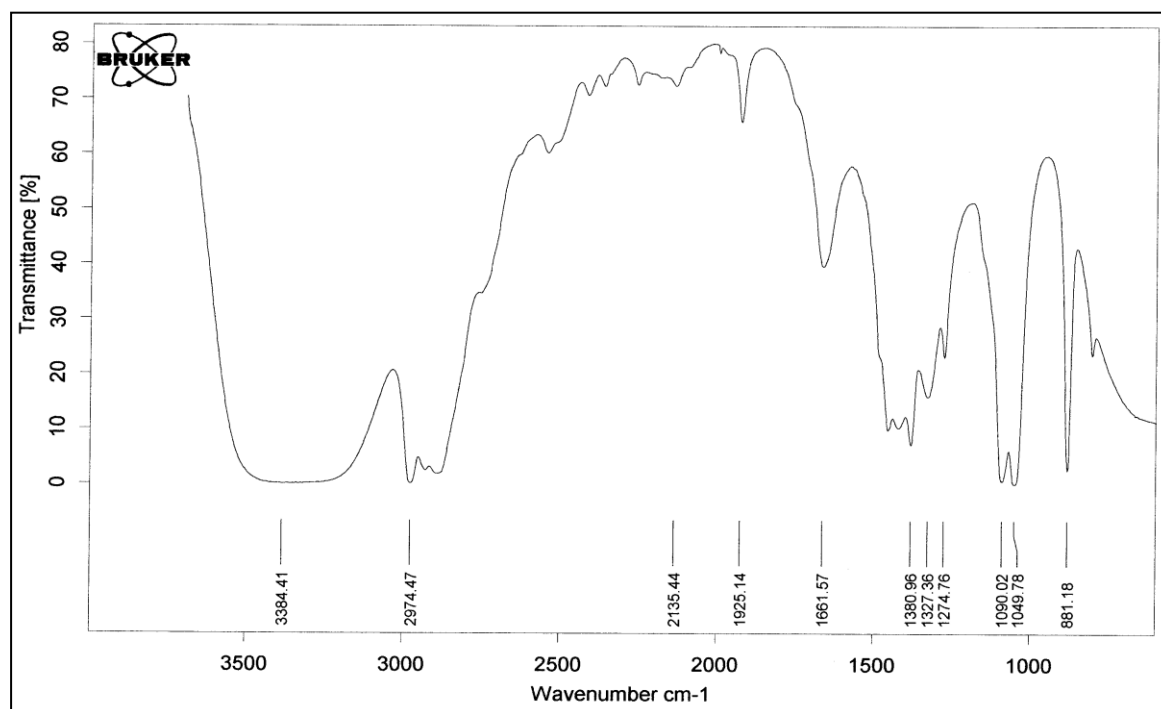


Figura 5.28. Espectro de infravermelho obtido para o composto 18.

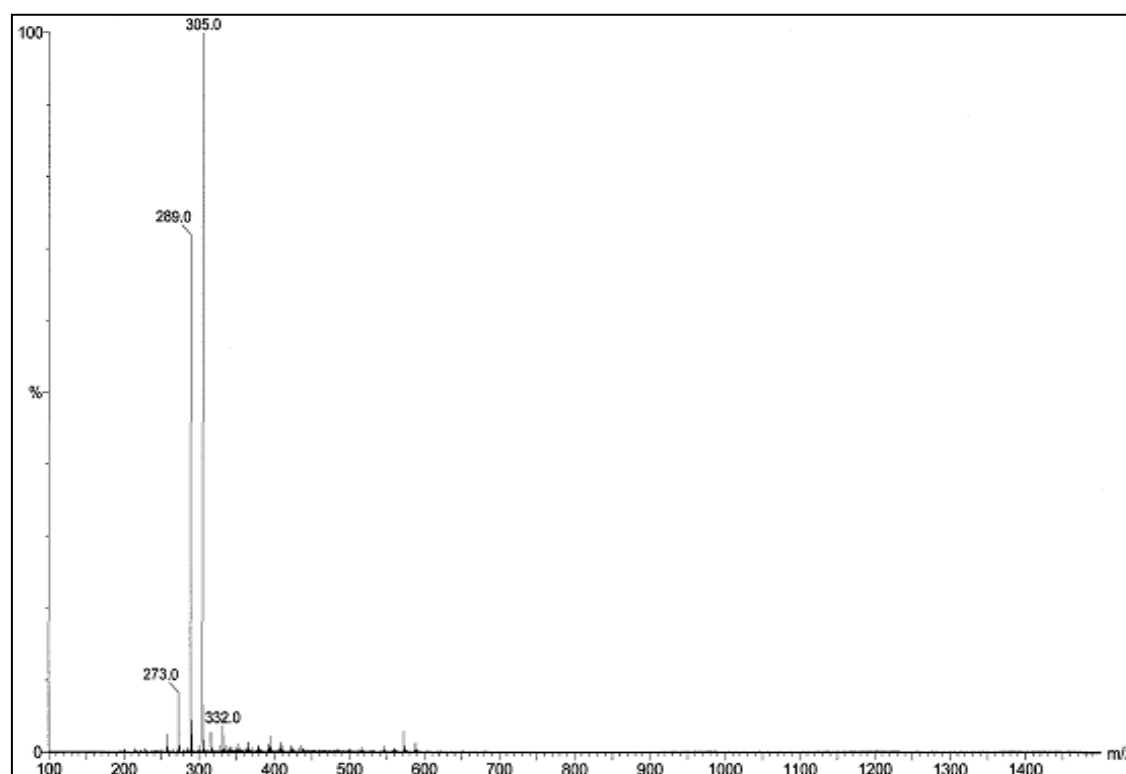


Figura 5.29. Espectro de massa obtido para o composto 18.

5.2. Espectros dos diferentes peróxidos

➤ Espectro relativo ao composto 22

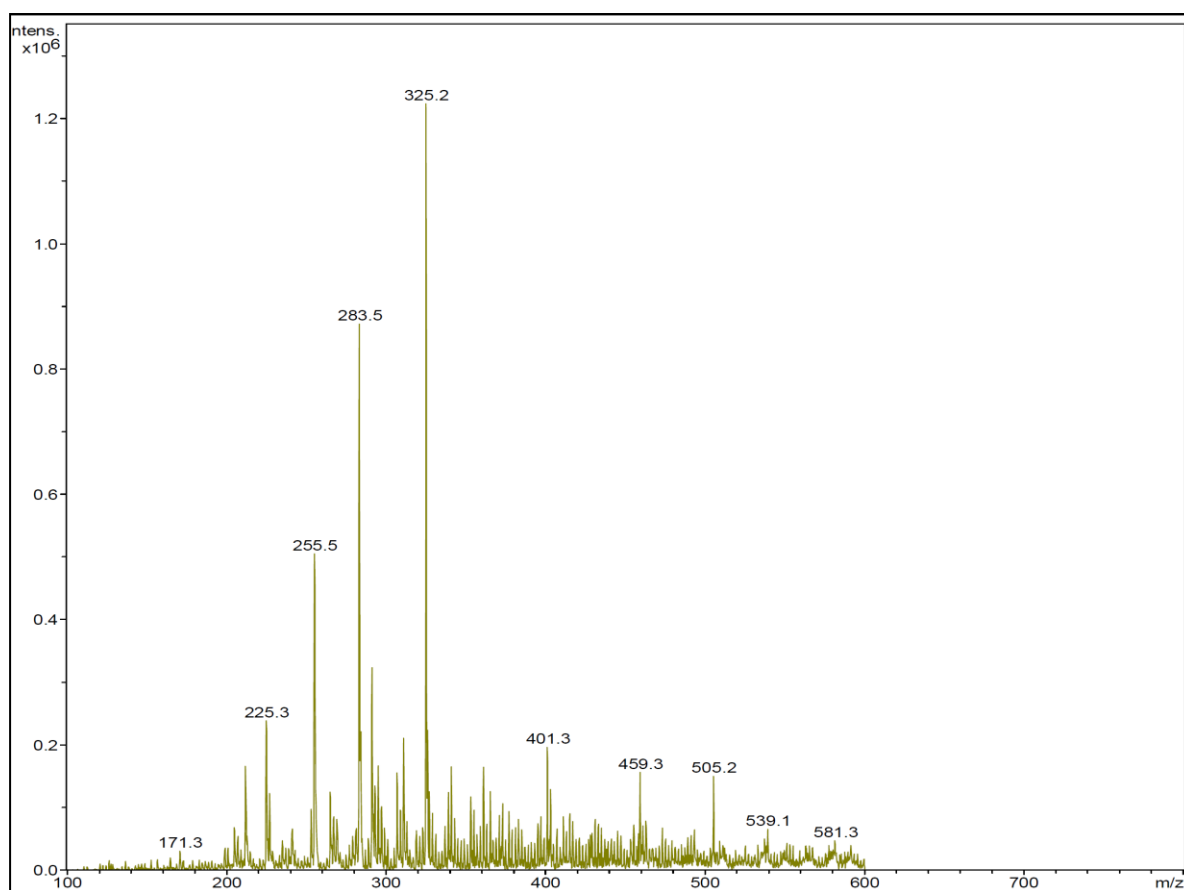


Figura 5.30. Espectro de massa obtido para o composto 22.

➤ Espectro relativo ao composto 25

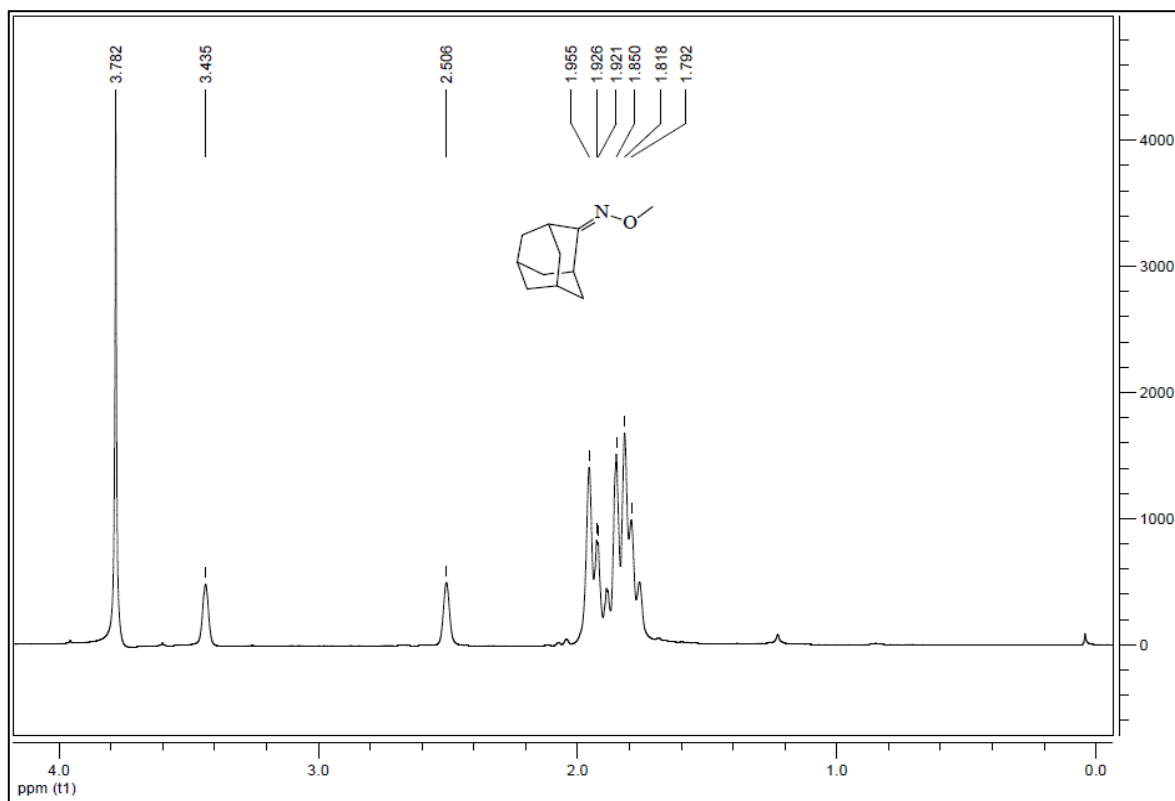


Figura 5.31. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 25.

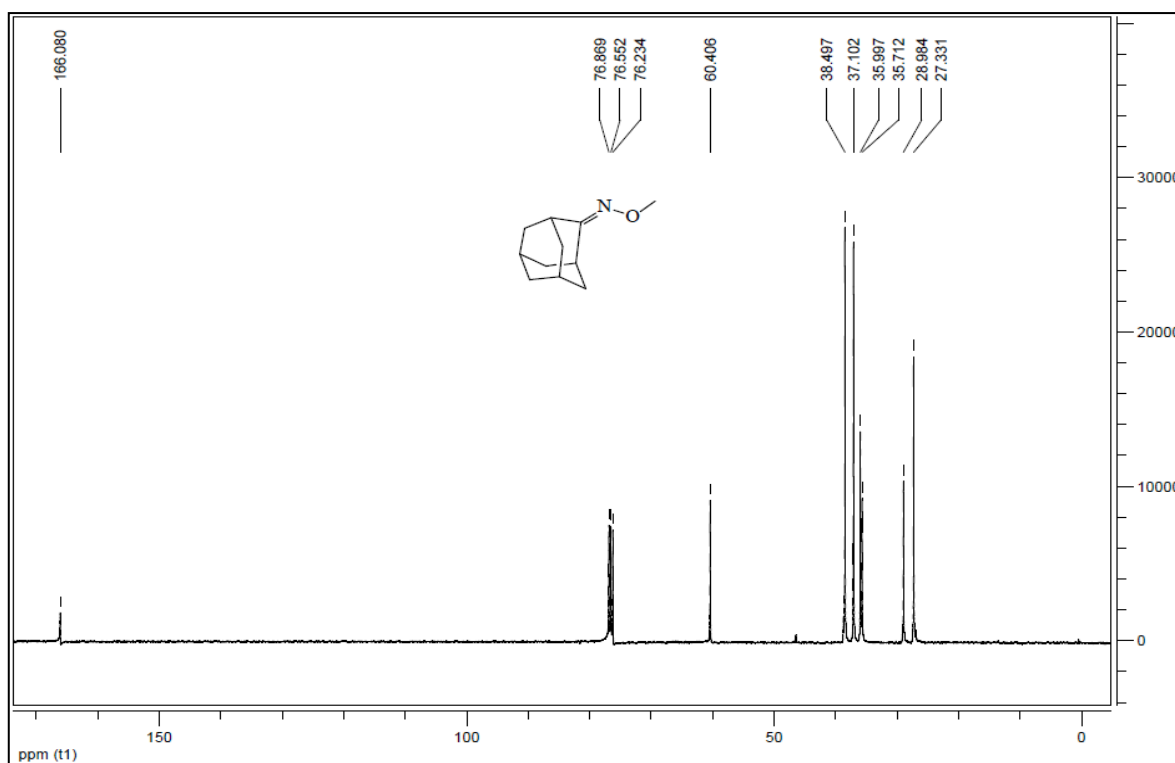


Figura 5.32. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto 25.

➤ Espectro relativo ao composto 26

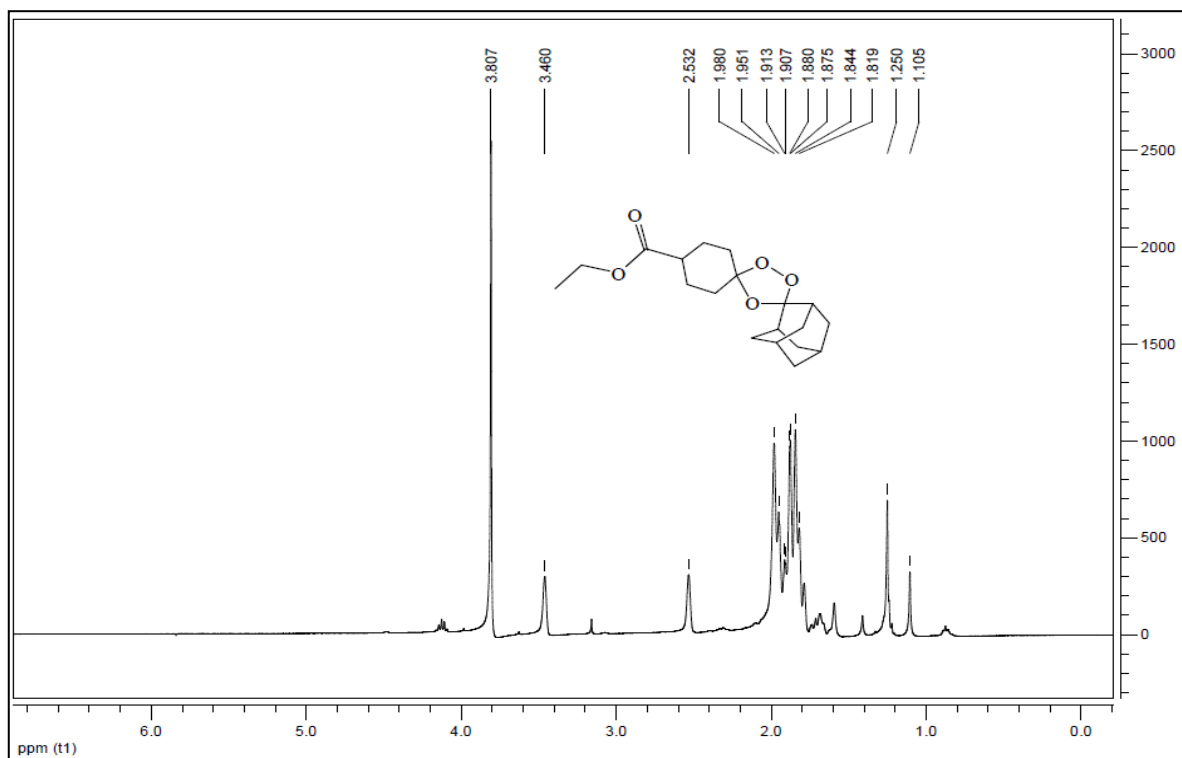


Figura 5.33. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto 26.

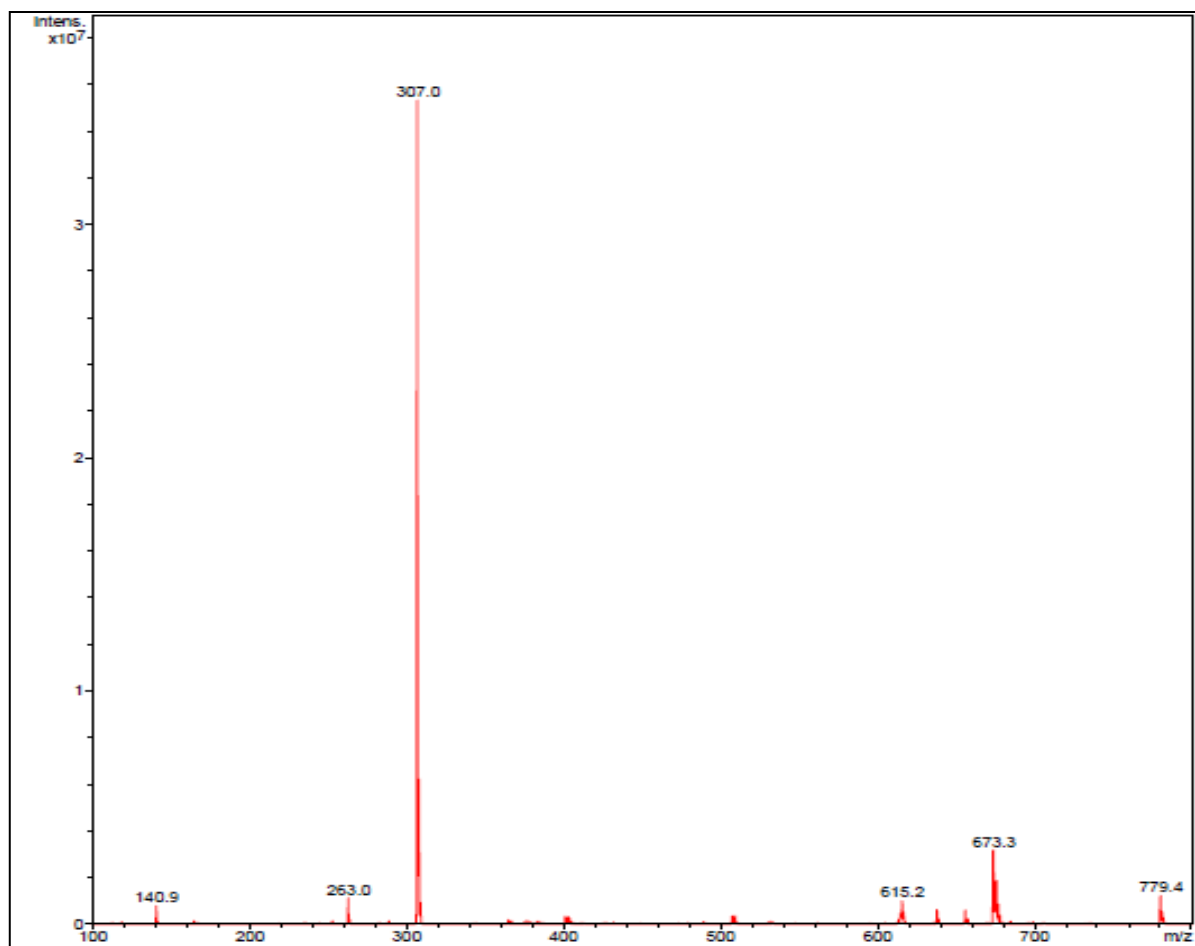
➤ **Espetro relativo ao composto 27**

Figura 5.34. Espetro de massa obtido para o composto 27.

➤ Espetros relativos ao composto 29

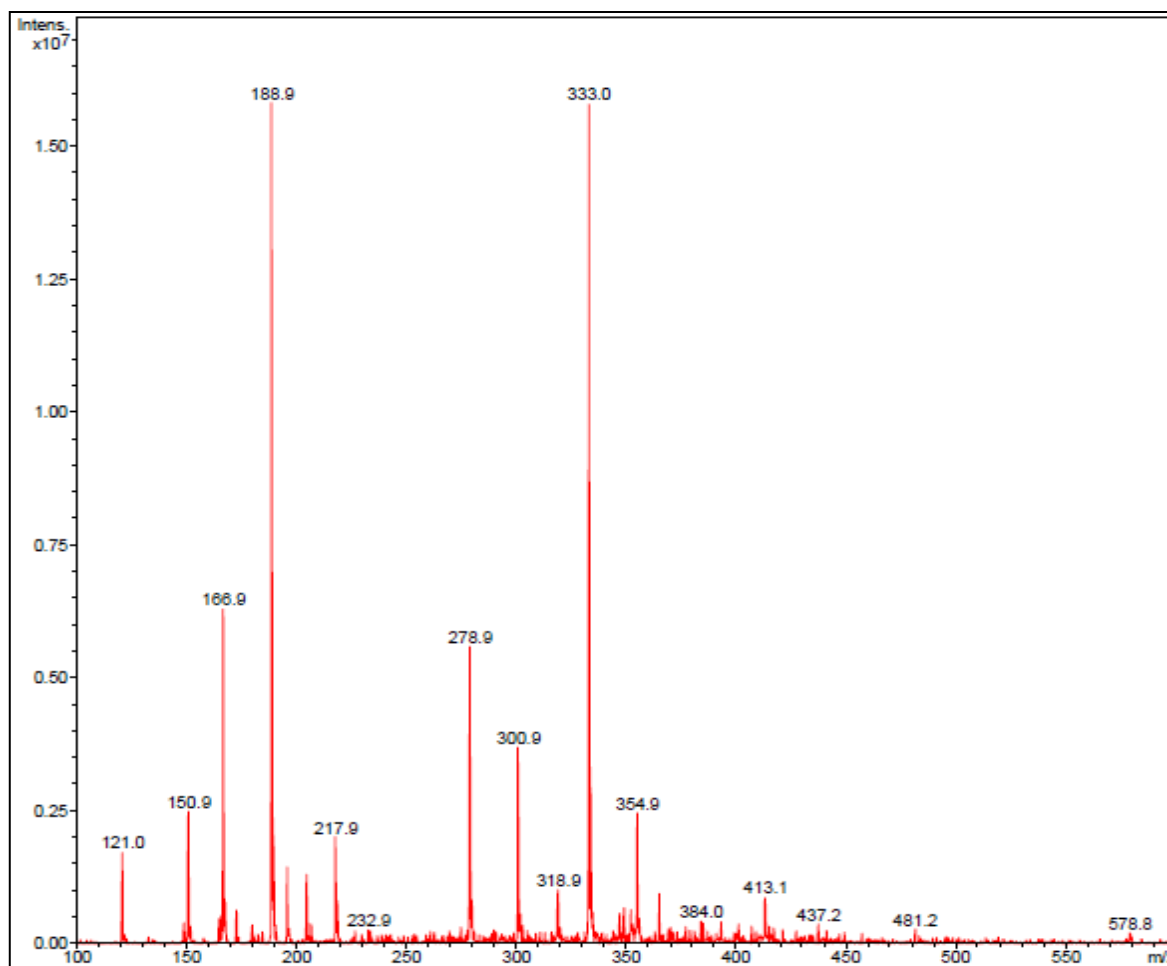


Figura 5.35. Espectro de massa obtido para o composto 29.

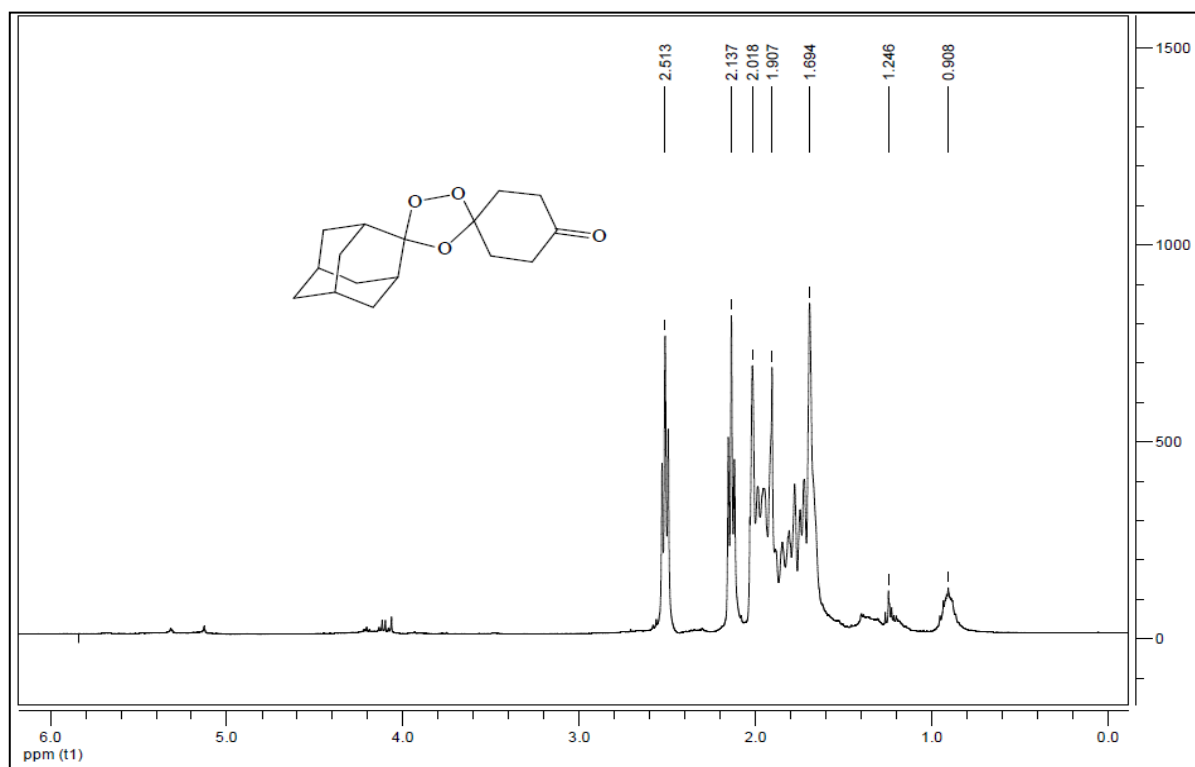


Figura 5.36. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ obtido para o composto 29.

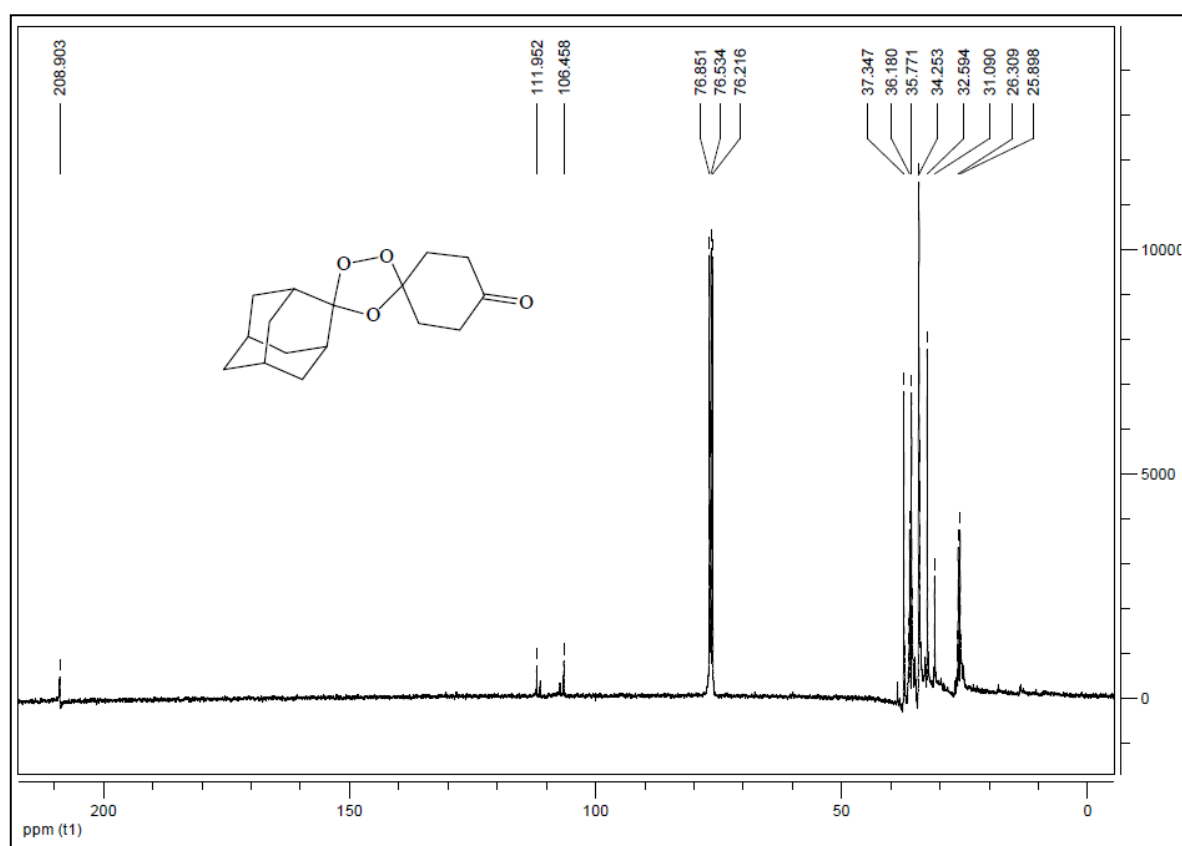


Figura 5.37. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ obtido para o composto 29.