



Síntese e avaliação de análogos da Cloroquina e da Quinacrina como novos protótipos antimaláricos

Ana Sofia Martins Gomes

Mestrado em Química

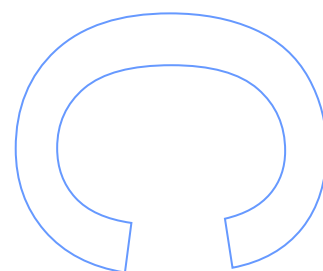
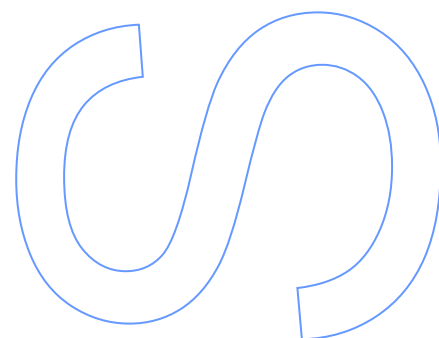
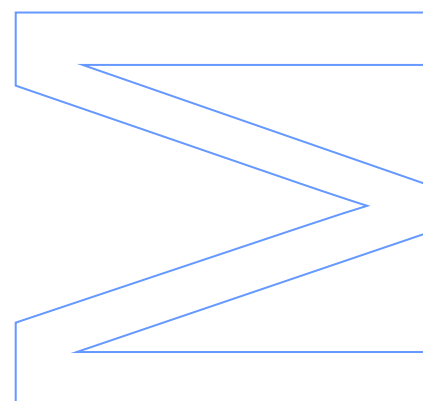
Departamento de Química e Bioquímica
2013

Orientadora

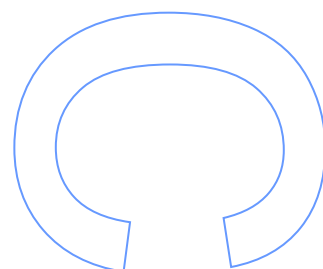
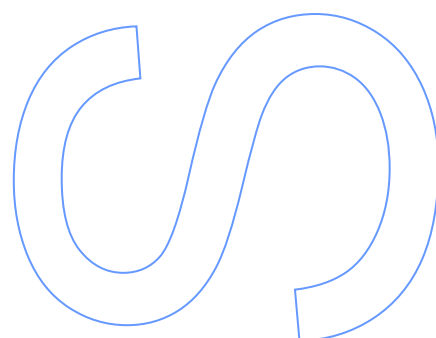
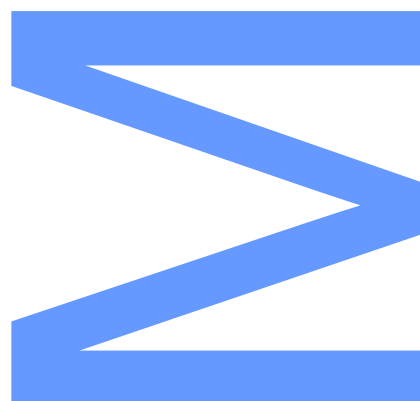
Paula Alexandra de Carvalho Gomes, Professora Auxiliar,
Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto

Coorientadora

Cátia Andreia Silva Teixeira, investigadora doutorada do
Centro de Investigação em Cerâmicas e Materiais
Compósitos da Universidade de Aveiro



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,
Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Antes de começar a escrever, parecia fácil agradecer a todos os que fizeram parte deste caminho, mas não é assim tão simples. Sentimentos como amizade, companheirismo, carinho e compreensão nem sempre se conseguem resumir num punhado de palavras. Neste pequeno agradecimento, espero conseguir transmitir um pouco do que sinto e o quanto foram importantes neste percurso as pessoas que de perto me acompanharam.

Agradeço à Prof^a. Dra. Paula Gomes, orientadora deste trabalho, por toda a ajuda, paciência, ensinamento e pela oportunidade de trabalhar no grupo de investigação. Também agradeço por isto à coorientadora Dra. Cátia Teixeira e por incentivar o bom espírito de equipa.

Não poderia deixar de esquecer a ajuda, dedicação, paciência e carinho com que a Bianca Pérez me acompanhou no laboratório e que tanto me ensinou. A ela deixo um enorme obrigado por tudo o que me ajudou a alcançar e pelos enormes laços de amizade que foram sempre crescendo.

Aos companheiros de laboratório incluindo a Joana Rodrigues e Cláudia Alves agora também amigas de coração, que ao longo deste trabalho me acompanharam na batalha diária, muito obrigado.

Aos amigos de longa data que me ouviram e tentaram compreender nas horas mais difíceis e sorriram comigo nas horas de maior alegria, queria dizer que nunca vou esquecer e estarei também convosco quando precisarem. Não posso deixar de referir alguns deles: “ANTI”, Catarina, Sílvia, Susana, Salete, Juliana e Emília. Em especial agradeço ao Frederico, companheiro de todos os momentos, pela paciência e carinho que nesta fase de muito trabalho foram o porto seguro.

Por fim, mas não menos importantes, agradeço com todo o meu ser, aos meus pais e irmã que, com todo o enorme esforço, carinho e apoio permitiram que fosse possível chegar até aqui. OBRIGADO FAMÍLIA.

"If there is no struggle, there is no progress"

Frederick Douglass

Resumo

A malária é uma doença parasitária que, em cada ano, leva milhares de pessoas à morte, causando grande impacto socio-económico a nível mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em consórcio com outras entidades, estabeleceu como prioridade a eliminação das mortes por malária até 2015 e a redução em 75% da incidência anual de novos casos. Esta iniciativa despoletou um enorme reforço financeiro e científico à escala global que, no entanto, não permitirá atingir as ambiciosas metas estabelecidas pela OMS. Portanto é importante continuar em busca de novos fármacos eficazes contra a malária. Neste contexto, o presente trabalho visou a síntese de potenciais protótipos antimaláricos capazes de atuar contra as formas sanguíneas do parasita, por inibição da formação da hemozoína.

Foram sintetizadas duas famílias de compostos, cada uma delas tendo por base estruturas heterocíclicas presentes em fármacos anti-maláricos conhecidos pela sua capacidade de inibição da formação de hemozoína. Assim, produziram-se análogos da cloroquina (CQ) contendo o núcleo de 4-amino-7-cloroquinolina, e análogos da quinacrina (QCR) contendo o núcleo de 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina. Os produtos alvo foram preparados por rotas sintéticas simples e de baixo custo, usando-se a 4,7-dicloroquinolina e a 6,9-dicloro-2-metoxiacridina como materiais de partida. Todos os produtos finais foram caracterizados por espectrometria de massa (ESI-IT MS), ressonância magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Logrou-se sintetizar todos os produtos-alvo com rendimentos globais de síntese aceitáveis e elevados graus de pureza.

Os compostos sintetizados foram avaliados *in vitro* quanto à sua capacidade de inibir a formação da hemozoína, verificando-se (a) apenas os análogos da CQ com cadeias alifáticas não ramificadas eram ativos e (b) apenas dois dos análogos da QCR foram ativos, não se podendo extrair alguma relação óbvia entre estrutura e atividade. Estes compostos estão também a ser avaliados quanto à sua capacidade de inibição do desenvolvimento de formas hepáticas de *Plasmodium berghei*, e formas sanguíneas de *Plasmodium falciparum* (estirpe sensível e estirpes resistentes à CQ), respetivamente, no Instituto de Medicina Molecular (IMM) e no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), ambos em Lisboa.

Palavras-chave: acridina; antimaláricos; cloroquina; Hemozoína; *Plasmodium*; quinacrina;

Abstract

Malaria is responsible for millions of deaths every year causing a great impact in the world's economy. The World Health Organization (WHO), in consortium with other organizations, launched the challenge of zeroing malaria-related deaths by 2015 and reducing by 75% the annual incidence of new cases. This challenge sparked enormous financial and scientific effort on a global scale that, although contributing to reduction of fatal cases of malaria, do not suffice to meet the WHO's ambitious goals. Therefore, the search for new drugs against malaria must go on. In this context, the present work aimed at the synthesis of potential antimalarial drugs able to act against blood stage parasites by inhibiting hemozoin formation.

Two families of compounds were synthesized, both of which bearing a heterocyclic core present in classic antimalarials known to inhibit hemozoin formation. Hence, one of the families corresponds to chloroquine (CQ) analogues possessing the 4-amino-7-dichloroquinoline moiety, while the other refers to quinacrine (QCR) analogues that bear the 9-amino-6-dichloro-2-methoxiacridine moiety. The compounds were obtained through straightforward and low cost synthesis pathways using 4-amino-7-dichloroquinoline and 9-amino-6-dichloro-2-methoxiacridine as starting materials. All final products were characterized by NMR (NMR-¹H, NMR-¹³C), Mass Spectrometry (ESI-IT MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). The target compounds were obtained in reasonable yields and with high purity degrees.

Once the compounds were synthesized, they were evaluated *in vitro* against hemozoin formation. The results demonstrated that: (a) ramified compounds derived from chloroquine did not present activity and (b) only two quinacrine derivatives displayed activity, but no clear structure-activity relationship could be drawn. Ongoing work involves the *in vitro* testing of these derivatives against blood stage malaria, namely, on CQ-resistant *P. falciparum* and CQ- susceptible *P. falciparum* strains, as well as against liver stage of *P. berghei*, respectively in Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) and Instituto de Medicina Molecular (IMM), both in Lisbon.

Keywords: acridine; antimalarial; chloroquine; Hemozoin; *Plasmodium*; quinacrine;

Índice geral

Agradecimentos	III
Resumo	V
Índice de Esquemas	IX
Índice de figuras	X
Índice de abreviaturas e símbolos.....	XII
Capítulo 1	14
1. Introdução Geral	15
1.1. Malária no Mundo	15
1.2. Parasita e o seu ciclo de vida.....	16
1.3. Fármacos antimaláricos inibidores da formação de hemozoína	20
1.4. Derivatização de 4-aminoquinolinas e acridinas na busca de novos protótipos antimaláricos	24
1.4.1. Estudos recentes de derivatização de 4-aminoquinolinas.....	24
1.4.2. Estudos recentes de derivatização de acridinas	28
Capítulo 2	32
2. Âmbito do trabalho.....	33
2.1. Objetivo.....	33
2.2. Rota sintética	35
Capítulo 3	36
3. Resultados e discussão	37
3.1. Síntese dos análogos de cloroquina.....	37
3.1.1. Reação de Substituição Nucleófila Aromática (S_NAr).....	37
3.1.2. Síntese da 4- <i>N</i> -(aminobutil)amino-7-cloroquinolina (13)	39
3.1.3. Síntese dos compostos 10a-i por condensação de 13 com ácidos carboxílicos ou seus derivados.....	40
3.1.3.1. Reação de Condensação.....	40
3.1.3.2. Síntese dos compostos 10a-g	45
3.1.3.3. Síntese dos compostos 10h,i	50
3.2. Síntese dos análogos de quinacrina.....	52
3.2.1. Otimização da síntese da 9-{ <i>N</i> -[<i>N</i> -(<i>p</i> -metoxi)cinamoíl]amino-butil}aminoacridina (9)	52
3.2.2. Síntese dos novos análogos de quinacrina (11a-f)	55
3.2.3. Tentativa de otimização da síntese dos análogos de quinacrina, por uso de halogenetos de ácido.....	60

3.3. Testes de inibição de formação de hemozoína <i>in vitro</i>	61
Capítulo 4	64
4. Conclusão e Perspetivas de Futuro	65
Capítulo 5	66
5. Procedimento experimental	67
5.1. Reagentes e equipamentos utilizados	67
5.2. Síntese dos análogos da cloroquina.....	69
5.2.1. Síntese da 4-(<i>N</i> -aminobutil)amino-7-cloroquinolina (13)	69
5.2.2. Síntese dos compostos 10a-i.....	70
5.3. Síntese dos análogos de quinacrina.....	77
5.3.1. Síntese da 9-{ <i>N</i> -[<i>N</i> -(<i>p</i> -metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (9)	77
5.3.2. Síntese dos compostos 11a-f	79
5.4. Teste de inibição de formação de hemozoína	84
Referências Bibliográficas	85
Anexos	89

Índice de Esquemas

Esquema 1: Rota geral de síntese dos derivados da QCR com estruturas do tipo β -benzoestireno. Condições reacionais: (I) K_2CO_3/Cu / pentanol, 5 h sob refluxo; (II) $POCl_3$ sob refluxo por 6 h; (III) HCl , etanol, 110 °C durante 8 h; (IV) hidróxido de sódio, metanol, T_{amb} 8-12h. ⁴⁷	29
Esquema 2: Rota geral de síntese dos derivados com melhor atividade preparados por Yu <i>et al.</i> ⁴⁷	30
Esquema 3: Síntese de análogos da QCR (8) previamente descritos por Pérez <i>et al.</i> ⁴⁸	31
Esquema 4: Rota geral de síntese dos compostos em estudo na presente Dissertação.	35
Esquema 5: Mecanismo geral de uma S_NAr (Y= nucleófilo; X= grupo de saída; GEA= grupo eletroatrator)	37
Esquema 6: Mecanismo de S_NAr na 4,7-dicloroquinolina, usando butano-1,4-diamina como nucleófilo.	38
Esquema 7: Mecanismo geral de formação de uma ligação amida mediante ativação <i>in situ</i> do ácido carboxílico.	40
Esquema 8: Formação de uma amida mediada por DCC como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral via O-acilisoureia (via da direita, a preto), bem como a conversão indesejável desta numa N-acilureia (via da esquerda, a preto) e o uso combinado de DCC com HOBT, para evitar esse problema (via central, a azul). ⁵⁴	42
Esquema 9: Formação de uma amida mediada por um sal de amínio (no TBTU, $X^- = BF_4^-$; no HBTU, $X^- = PF_6^-$) como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral (via da direita, a preto), bem como a guanidilação indesejável da amina (via da esquerda, a azul). ⁵⁵	43
Esquema 10: Formação de uma amida mediada por um sal de fosfónio (no PyBOP, $X=CH$; no PyAOP, $X=N$) como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral via éster de benzotriazolilo.	44
Esquema 11: Método de síntese anteriormente utilizado para síntese de derivados 9-[N-(N-cinamoíl)-aminobutil]aminoacridina ⁵⁰ e método já descrito por Anderson <i>et al.</i> (via azul). ⁵⁸	53
Esquema 12: Esquema geral de síntese dos análogos da quinacrina (11a-f).	55
Esquema 13: Síntese do composto 11e por condensação de 14 com cloreto de <i>p</i> -metoxicinamoíl, em DMF, usando diferentes bases.	60
Esquema 14: Metodologia de testes de inibição de formação de hemozoína.	61

Índice de figuras

Fig. 1: Estrutura química da Artemisinina.....	16
Fig. 2: Ciclo de vida do parasita <i>P. falciparum</i> . ¹⁶	18
Fig. 3: Mecanismo de degradação da hemoglobina do hospedeiro dentro do.....	19
Fig. 4: Formas de Hematina em equilíbrio (ácido-base); no VD do parasita, predominará a forma mais à esquerda. ²¹	19
Fig. 5: Estrutura da hemozoína. ²¹	20
Fig. 6: Derivados da 4-amino-7-cloroquinolina desenvolvidos por Casagrande <i>et al.</i> ³⁹	25
Fig. 7: Fatores estruturais essenciais à atividade antimalárica de 4-aminoquinolinas, de acordo com Hocart <i>et al.</i> ⁴⁰	25
Fig. 8: Estrutura das três famílias de análogos da CQ descritas por Pérez <i>et al.</i> ⁴¹⁻⁴³ ..	26
Fig. 9: Estrutura geral dos derivados HEFLECINs ⁴³	28
Fig. 10: Estrutura química do melhor dos derivados da QCR, desenvolvidos por Guetzoyan <i>et al.</i> ⁴⁶	29
Fig. 11: Compostos alvo de estudo no âmbito da presente Dissertação.	33
Fig. 12: Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do composto 10d	47
Fig. 13: Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto 10d	49
Fig. 14: Espectro de ESI-IT MS (modo positivo) da 9-{N-[N-(<i>p</i> - metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (9).	54
Fig. 15: Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) da 9-{N-[N-(<i>p</i> - isopropil)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11f).....	57
Fig. 16: Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da 9-{N-[N-(<i>p</i> - isopropil)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11f).....	58
Fig. 17: Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) da 9-{N-[N-(<i>p</i> - isopropil)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11f).....	58
Fig. 18: Espectro de HMBC do composto 9-{N-[N-(<i>p</i> - isopropil)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11f).....	59

Índice de tabelas

Tabela 1: Dados gerais da síntese dos compostos 10a-g	46
Tabela 2: Dados gerais sobre as diferentes abordagens à síntese dos compostos 10h,i	51
Tabela 3: Dados gerais da síntese dos compostos 11a-f	56
Tabela 4: Dados gerais sobre as diferentes abordagens à síntese do composto 11e .	60
Tabela 5: Resultados do teste de inibição da hemozoína	62

Índice de abreviaturas e símbolos

A

ACN – Acetonitrilo

ACT- terapias combinadas à base de artemisinina (*Artemisinin-based Combination Therapies*)

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AQ - Amodiaquina

C

CCF- cromatografia líquida em camada fina

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CQ – Cloroquina

D

d - Duplete

dd – Duplo Duplete

DCC – Díciclo-hexilcabodiimida

DCM - Diclorometano

DCU – Díciclo-hexilureia

DFT- Teoria do Funcional de densidade (*Density functional theory*)

DIEA - *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido Deuterado

IMM- Instituto de Medicina Molecular

E

ESI-IT MS – Espectroscopia de massa com ionização por electro – spray e deteção por armadilha de iões (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry ion trap*)

Éter 18-Coroa-6 - 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano

F

FDA - *Food and Drug Administration*

FP-Fe(II)- Ferroprotoporfirina IX

FP-Fe(III)- Ferriprotoporfirina IX

H

HBTU - Hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio

HOBt- 1-hidroxibenzotriazole

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HMBC – Espetroscopia de correlação heteronuclear a longa distância (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

I

IC₅₀- Concentração mínima para 50% de inibição *in vitro*

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

M

m – Multiplete

MM- Massa Molar

MeOH – Metanol

O

OBt - Benzotriazole

OMS- Organização Mundial de Saúde

P

P.f – Ponto de fusão

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

PfCRT - *Plasmodium falciparum*
Chloroquine Resistance Transporter

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

PQ – Primaquina

P. vivax – *Plasmodium vivax*

PyBOP - Hexafluorofosfato de
benzotriazole-1-iloxi-(trispírolidin)fosfónio

PyAOP- Hexafluorofosfato de 7-
azabenzotriazol-1-iloxi-(trispírolidin)
fosfónio

Q

Q - quinolina

QCR - quinacrina

QN- quinina

QSAR - *Quantitative Structure-Activity*
Relationship

q- Quarteto

R

RMN - Ressonância Magnética Nuclear de
carbono

RMN-¹³C - Ressonância Magnética Nuclear
de carbono

RMN-¹H - Ressonância Magnética Nuclear
de protão

ROS- Espécies reativas de oxigénio
(*Reactive oxygen species*)

S

s – Singleto

SAR - *structure-activity relationships*

Sl – Singleto largo

S_NAr- Substituição Nucleófila Aromática

T

t – Tripleto

T_{amb} – Temperatura Ambiente

TBTU- Tetrafluoroborato de O-
(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio

TFA – Ácido trifluoroacético

THF – Tetra-hidrofurano

TMS – trimetilsilano

V

VD – vacúolo digestivo

δ – Desvio químico

J - Constante de acoplamento

^m/_z – razão massa carga do ião

u.m.a – unidades de massa atómica

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução Geral

1.1. Malária no Mundo

A malária é uma doença parasitária que, só em 2010, provocou a morte a mais de 600 mil pessoas, 86% das quais sendo crianças abaixo dos 5 anos. Esta doença é endêmica em 106 países, onde cerca de 200 milhões de pessoas se encontravam infectadas em 2010, havendo ainda 3,3 mil milhões de pessoas em risco de contrair a doença.¹

A malária está normalmente associada à pobreza, devido à sua prevalência em países em vias de desenvolvimento, que não podem investir na criação de novos fármacos ou em prestação de cuidados de saúde adequados aos doentes. O clima e a ecologia dos países endêmicos são também determinantes na propagação desta doença, uma vez que o mosquito tem tendência a propagar-se em regiões quentes, húmidas e chuvosas.^{2, 3} Segundo a OMS, o número estimado de pessoas infectadas com a doença em 2010 foi substancialmente inferior ao verificado em 2009.⁴ No entanto, um problema grave associado a esta doença é o rápido desenvolvimento de resistência, pelo parasita, aos fármacos em uso clínico. Um dos piores desenvolvimentos da quimioterapia da malária foi o surgimento, a partir do último terço do século XX, de resistência à cloroquina (CQ), que se poderia quase considerar um “antimalárico perfeito”, dado o seu baixo custo, elevada eficácia e segurança comprovada mesmo em grávidas e recém-nascidos. Tal levou à introdução das terapias combinadas à base de artemisinina (ACT) como terapêutica de primeira linha, especialmente em África, onde prevalecem as estirpes de parasita resistentes à CQ.⁵ As ACT proporcionaram bons resultados terapêuticos, mas há sinais evidentes do surgimento de estirpes resistentes também à artemisinina (Figura 1).⁶

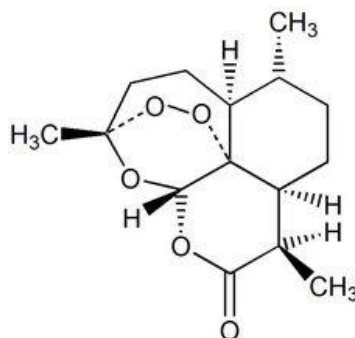


Fig. 1: Estrutura química da Artemisinina.

Como forma de prevenção, a OMS recomenda o uso de redes mosquiteiras tratadas com inseticidas sobre as camas. Estas redes previnem a picada de insetos que atuam como vetores de doenças infecciosas, como a malária ou as tripanossomíases, entre outras.⁷ Ainda ao nível de prevenção da malária, está a ser desenvolvida uma vacina que se encontra na fase 3 de ensaios clínicos.⁸ Porém, ainda que surja como ideal a prevenção da doença através de uma vacina que atue contra formas pré-eritrocitárias do parasita, no cenário atual, as únicas armas disponíveis para o combate à malária são a proteção com redes mosquiteiras e o tratamento com fármacos.

1.2. Parasita e o seu ciclo de vida

O parasita da malária, do género *Plasmodium*, apresenta cinco espécies responsáveis pela doença em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, tendo esta última sido associada a malária humana apenas em 2009-2010, por até então se julgar capaz de causar a doença apenas em macacos do sudeste asiático. As duas espécies mais prevalentes a nível global são o *P. vivax* e o *P. falciparum*. O *P. vivax* é o que se encontra disseminado numa área mais vasta do globo, e o que melhor se adapta a condições climáticas menos favoráveis, estando por isso associado a formas hepáticas dormentes, os hipnozoítos, que despoletam recidivas ocasionais. Estas recidivas são estimuladas por mecanismos ainda desconhecidos, mas que parecem associados ao surgimento de condições propícias à propagação;⁹⁻¹¹ na realidade, a ocorrência de hipnozoítos em *P. vivax* (também em *P. ovale*, mas substancialmente menos prevalente) é atualmente considerada a maior barreira à erradicação da doença. Porém, apesar deste facto, e da elevada morbidade associada à malária *vivax*, é o *P. falciparum* que causa as formas mais agressivas da infeção, sendo responsável pela maior taxa de mortalidade por malária.

O *P. falciparum* é, também, a espécie de plasmódio prevalente em África, e aquela para a qual já emergiram várias estirpes resistentes às terapias antimaláricas clássicas.¹²

Uma das grandes dificuldades em erradicar a malária é, desde logo, o complexo ciclo de vida do *P. falciparum* que envolve diferentes estádios (Figura 2). O ciclo inicia-se quando uma fêmea de mosquito *Anopheles*, o género responsável pela propagação da malária, injeta esporozoítos alojados nas suas glândulas salivares para a corrente sanguínea do hospedeiro humano (I); através da corrente sanguínea, os esporozoítos chegam às células hepáticas (II), atravessando várias até se alojarem numa célula final;¹³ aí, os esporozoítos diferenciam-se em milhares de merozoítos, que são depois libertados de novo na corrente sanguínea (III), observando-se que a célula hepática na maioria dos casos sobrevive.¹⁴ Os merozoítos libertados invadem então os eritrócitos, dando continuidade ao seu ciclo de reprodução assexuada para gerar novos merozoítos; ocorre depois a rotura da hemácia infetada (IV), para libertação desses merozoítos, que irão invadir outros glóbulos vermelhos saudáveis, iniciando-se novo ciclo de infeção sanguínea, que é responsável pelos sintomas da doença.¹⁵ Algumas das formas sanguíneas do parasita diferenciam-se em formas sexuadas (gametócitos femininos e masculinos), que podem posteriormente ser ingeridas por um mosquito, aquando da sua refeição sanguínea (V), iniciando-se assim um ciclo reprodução (sexuada) no trato gastrointestinal do mosquito (VI).¹⁶ O mosquito, agora portador da doença, pode transmiti-la a outro hospedeiro humano, atuando como vetor de propagação.

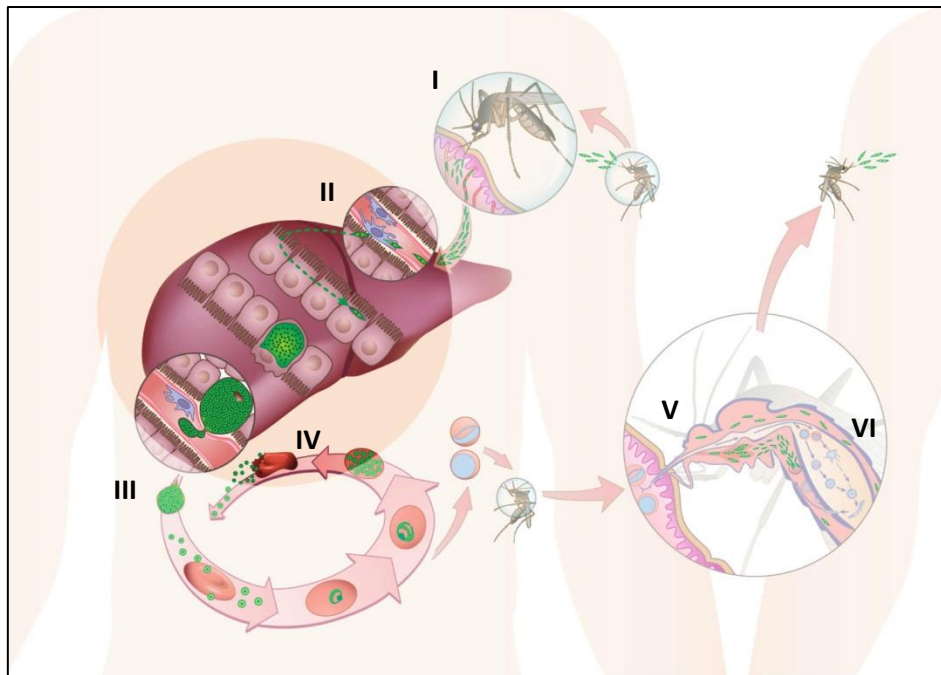


Fig. 2: Ciclo de vida do parasita *P. falciparum*.¹⁶

A fase sanguínea do desenvolvimento do parasita é muito importante, não só no diagnóstico, como também na terapia da malária, pois é esta a fase sintomática que está associada aos efeitos prostrantes da doença, bem como às suas formas mais graves, como malária cerebral. Por isso, a esmagadora maioria dos medicamentos antimaláricos em uso clínico é dirigida contra a fase sanguínea. Para além disso, nesta fase existem vários alvos terapêuticos potenciais, muitos deles relacionados com a dependência do parasita na degradação da hemoglobina do hospedeiro; de facto, o desenvolvimento das formas sanguíneas do *Plasmodium* depende de nutrientes essenciais, muitos dos quais aminoácidos e oligopéptidos resultantes da degradação da hemoglobina por ação de enzimas do parasita. Na figura 3, esquematiza-se o processo de degradação da hemoglobina dentro da hemácia infetada, e que se inicia com a decomposição daquela metaloproteína na respetiva aloproteína (globina) e grupo prostético (heme), principalmente por ação de proteases aspárticas, como as plasmepsinas I e II. A globina é depois degradada em cadeias polipeptídicas mais pequenas, por ação de proteases cisteínicas, denominadas falcipainas. Assim, estas enzimas desenvolvem um papel vital para o parasita, pois permitem-lhe aceder a nutrientes essenciais. Por estes motivos, as proteases plasmódicas, como as plasmepsinas ou as falcipainas, têm sido encaradas como alvos terapêuticos promissores na quimioterapia da malária.^{17, 18}

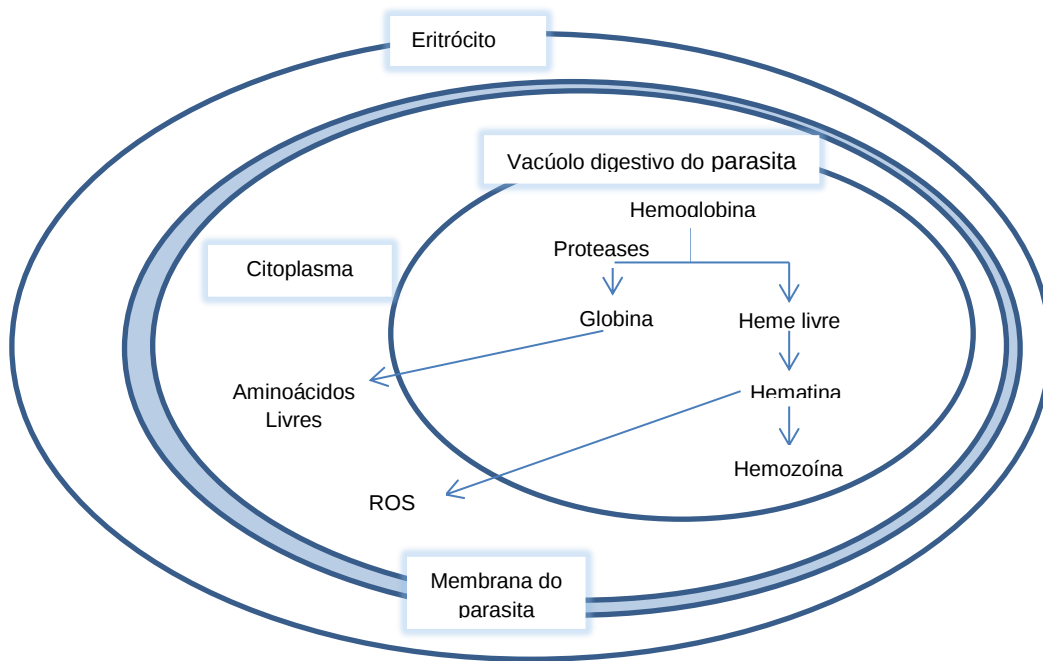


Fig. 3: Mecanismo de degradação da hemoglobina do hospedeiro dentro do vacúolo digestivo do parasita.¹⁹

A degradação da hemoglobina do hospedeiro ocorre no vacúolo digestivo (VD) do parasita, um compartimento intracelular ácido, no qual o grupo heme (ferroprotoporfirina IX; FP-Fe(II)) libertado na hemoglobinólise sofre oxidação para formar hematina (ferriprotoporfirina IX; FP-Fe(III)). A hematina pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando stress oxidativo no parasita e levando-o à morte. A hematina apresenta-se sob várias formas em equilíbrio ácido-base entre si (Figura 4), havendo predominância da forma zwitteriônica (Figura 4, esquerda) ao pH do VD; crê-se que estas formas dimerizam facilmente, e que os dímeros polimerizam para formar hemozoína, que não é tóxica para o parasita.²⁰⁻²²

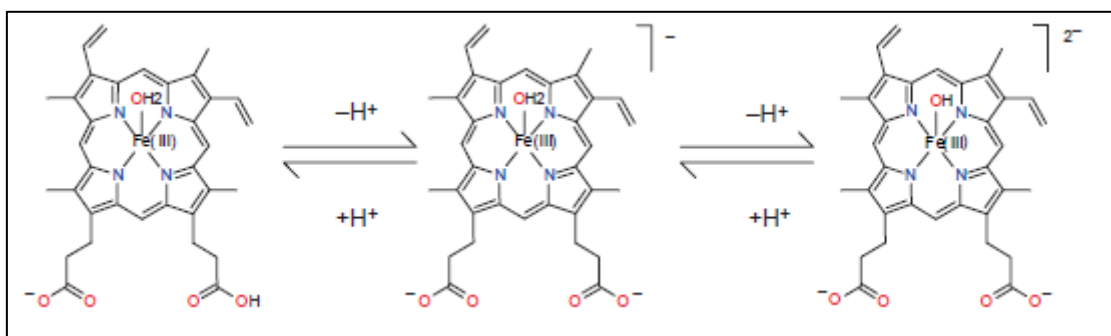


Fig. 4: Formas de Hematina em equilíbrio (ácido-base); no VD do parasita, predominará a forma mais à esquerda.²¹

A hemozoína é um cristal escuro, inerte e insolúvel, também conhecido como “pigmento da malária”. Acredita-se atualmente que a sua estrutura consta da repetição de dímeros cíclicos, estabelecidos à custa de pontes de hidrogénio entre os grupos carboxílicos das cadeias laterais e de interações de van der Waals. Os dímeros ligam-se entre si através da coordenação entre o átomo de Fe(III) de um dímero e o grupo carboxilato da cadeia lateral do dímero vizinho (figura 5).²¹ Estudos computacionais corroboram esta hipótese, permitindo também salientar a importância das interações π - π entre os dímeros, de modo a iniciar espontaneamente o processo de formação do cristal e ajudar a estabilizar toda a estrutura. Nestes mesmos estudos, Klonis *et al.* observaram que o átomo de Fe(III) estará parcialmente exposto ao solvente, o que poderá levar à sua participação em reações redox.²³

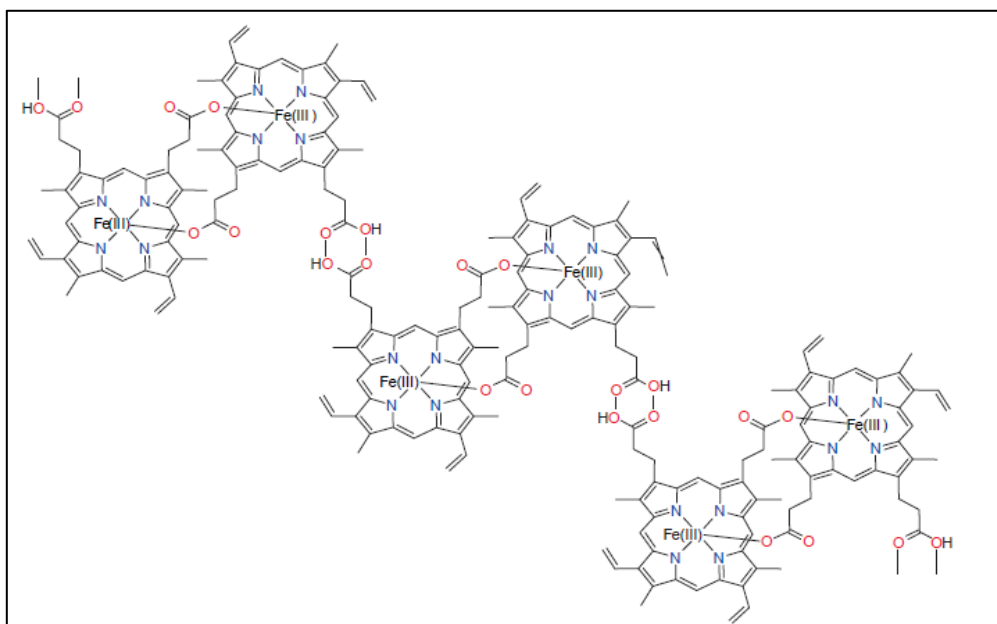
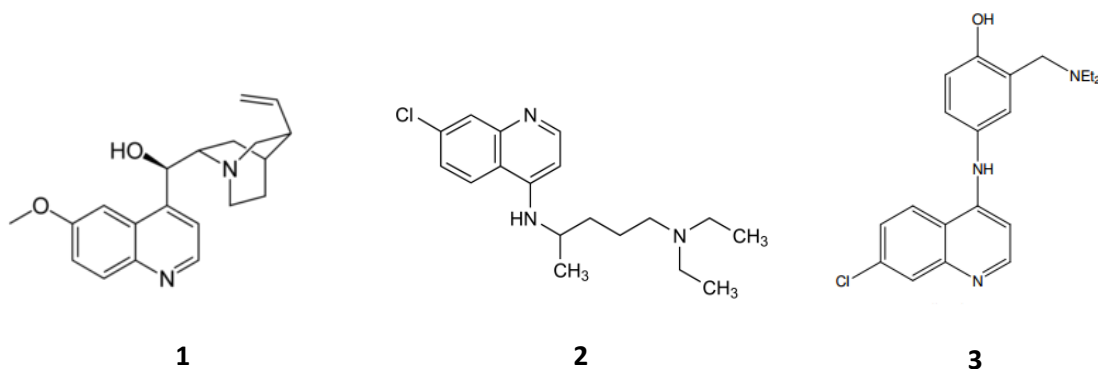


Fig. 5: Estrutura da hemozoína.²¹

1.3. Fármacos antimaláricos inibidores da formação de hemozoína

A inibição da formação de hemozoína foi há muito considerada uma excelente estratégia de combate à malária, na medida em que impede os parasitas intraeritrocíticos de recorrerem a esse mecanismo de destoxificação, levando-os à morte por stress oxidativo.²⁴ Por outro lado, acreditava-se que, ao ter-se como alvo terapêutico uma substância não proteica, isto é, não codificada geneticamente, não se correria o risco de desenvolvimento de resistência aos fármacos por mutações nesse alvo.²⁰

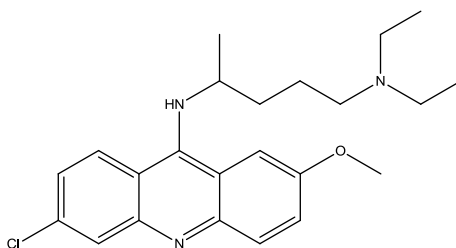
A quinina (QN, **1**), o primeiro agente antimalárico reconhecido como tal, e com origem na casca de um arbusto da América Latina (do género *Cinchona*), é um dos fármacos que parece dever a sua ação terapêutica principalmente à inibição da formação de hemozoína; no entanto, devido à sua elevada toxicidade, a quinina usa-se apenas quando a infeção já atingiu um estado avançado e, consequentemente, muito grave.²⁵ Tal conduziu à busca de novos fármacos quinolínicos alternativos à QN, surgindo as 4-aminoquinolinas sintéticas, como a cloroquina (CQ, **2**) ou a amodiaquina (AQ, **3**), como a mais conhecida classe de fármacos antimaláricos associados à inibição da formação de hemozoína.



A CQ é uma base fraca, que atravessa a membrana lipofílica do VD do parasita por difusão passiva; após a entrada nessa região de baixo pH, a CQ passa a apresentar-se na forma protonada, e não volta a atravessar a membrana para o exterior do VD, justificando-se assim a elevada concentração que aí atinge, o que está subjacente à sua elevada eficácia contra estirpes sensíveis de *Plasmodium*.^{26, 27} No entanto, foi também avançado que a acumulação de CQ no VD poderia, alternativa ou adicionalmente, dever-se à ligação que este fármaco estabelecerá com os dímeros de hematina.²⁸ Alguns autores consideraram a hipótese de ser a lactato desidrogenase parasítica o verdadeiro alvo terapêutico da CQ,²⁹ o que levou Aguiar *et al.* a realizar um estudo experimental e computacional com o intuito de apurar o mecanismo de ação da CQ e compostos análogos no VD; desse estudo, os autores concluíram que os compostos ativos eram capazes de inibir a formação de hemozoína e apresentavam o anel 4-aminoquinolínicos (forma protonada) paralelo ao anel porfirínico de um dímero FP-Fe(III), estabelecendo-se entre eles uma ponte de hidrogénio; assim, considerou-se que a inibição da formação de hemozoína seria o principal mecanismo de ação antimalárica da CQ, em detrimento da inibição da enzima lactato desidrogenase, cuja interação com o fármaco se descreveu como muito fraca.³⁰

Também Portela *et al.* investigaram, mediante estudos computacionais usando a teoria do funcional de densidade (*DFT, density functional theory*), a interação entre estruturas 4-aminoquinolínicas e os dímeros de hematina; estes autores constataram que a região de potencial positivo das moléculas ativas interage com a região do dímero onde se localiza o núcleo de ferro ligado aos grupos pirrólicos, e que a região de potencial negativo do fármaco é capaz de interagir com a zona periférica, de potencial positivo, do dímero, corroborando assim a hipótese da hematina como alvo terapêutico da CQ e moléculas afins.³¹

Outra classe de agentes antimaláricos para os quais se tem vindo a considerar a possibilidade de atuarem também por inibição da formação da hemozoína é a das acridinas, como a quinacrina, ou mepacrina (QCR, **4**). Ao longo dos tempos surgiram várias propostas para o mecanismo de ação antimalárica da QCR, não estando ainda definitivamente estabelecida qualquer uma delas. Sabe-se, no entanto, que as acridinas têm capacidade de interferir com o ADN, possivelmente por intercalação na dupla-hélice e/ou por inibição de topoisomerases.³² Por este motivo, as acridinas são também alvo de estudo contra o cancro, tendo por principal alvo o ADN tumoral.^{33, 34}



4

No entanto, tem vindo a ser defendido que o ADN parasítico não será o principal alvo terapêutico da QCR e estruturas afins, na medida em que várias acridinas e acridonas capazes de intercalar com o ADN são desprovidas de atividade antimalárica.³⁵ Por este motivo, têm sido sugeridos outros mecanismos de ação antimalárica para as acridinas, entre os quais inibição do complexo mitocondrial bc1³² ou inibição da formação de hemozoína.³³

A QCR foi o primeiro fármaco antimalárico de síntese que veio substituir a QN, nos anos 30 do século XX, mas os seus efeitos adversos fizeram com que fosse destronada pela CQ a partir do final da 2ª Guerra Mundial. De facto, como já referido, a CQ emergiu nessa altura como um dos mais promissores fármacos antimaláricos de sempre.³⁶ Precisamente por isso, a CQ foi amplamente usada em todas as regiões onde a malária é endémica, aplicando-se de imediato em estados febris, mesmo antes de poder ser confirmado o diagnóstico de infeção malárica; tal conduziu à ampla disseminação de estirpes de *P. falciparum* resistentes a CQ, especialmente em África. Julga-se que o fator subjacente a essa resistência será uma mutação numa proteína transmembranar do VD do parasita, *PfCRT* (*Plasmodium falciparum* *Chloroquine Resistance Transporter*), que passará a atuar como bomba de efluxo da CQ, não permitindo que esta se acumule em quantidade suficiente no VD para aí exercer a sua ação terapêutica.²⁶

Segundo o último Relatório Global de Malária (*World Malaria Report 2012*), as atuais terapêuticas antimalárias de primeira linha, à base de artemisinina, são utilizadas em 90% dos países onde a malária é endémica, estando o uso da CQ praticamente confinado a algumas regiões da América onde ainda prevalecem estirpes de parasita sensíveis a este fármaco. No entanto, as evidências recentes do surgimento de estirpes resistentes à própria artemisinina³⁷ poderão significar que também este fármaco, e seus derivados ou análogos, poderão vir a perder rapidamente a sua eficácia. Por estes motivos, a malária continua a exigir uma busca incansável de novos fármacos, quer estes atuem apenas numa fase específica do ciclo de vida do parasita ou, idealmente, em dois ou mais potenciais alvos terapêuticos (fármacos de ação dual ou múltipla). Esta procura deverá, também, ter em atenção que qualquer novo fármaco contra a malária deverá ter baixo custo de produção, atendendo ao baixo nível sócio-económico que caracteriza a maioria dos países onde a malária é endémica.

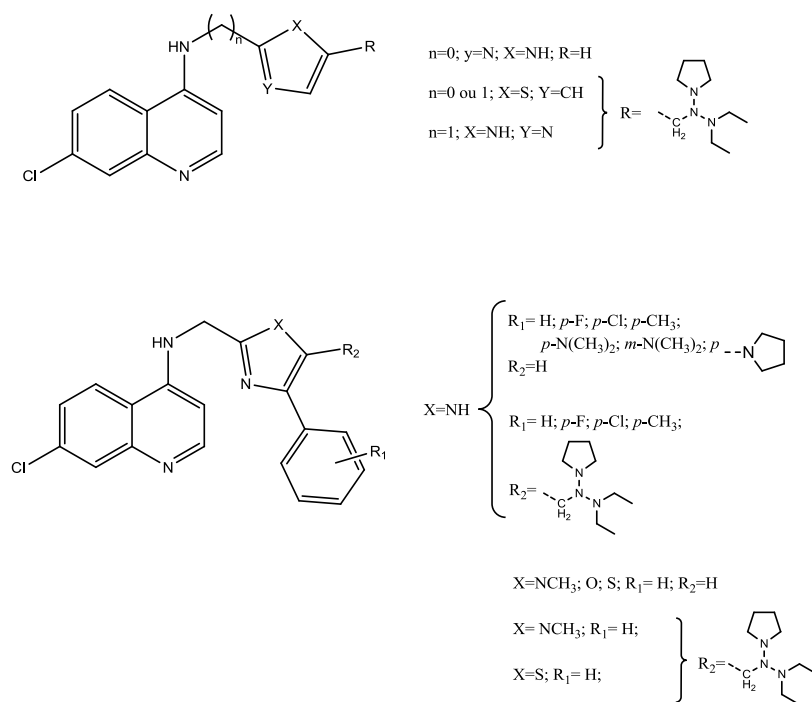
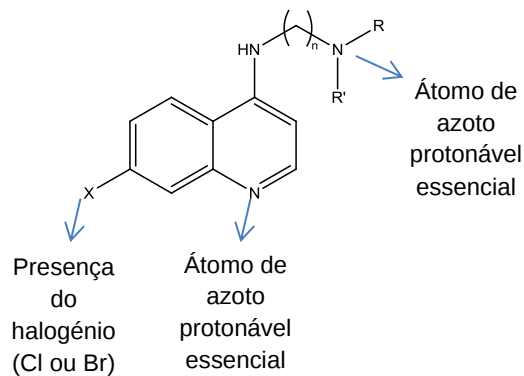
1.4. Derivatização de 4-aminoquinolinas e acridinas na busca de novos protótipos antimaláricos

1.4.1. Estudos recentes de derivatização de 4-aminoquinolinas

As 4-aminoquinolinas mais conhecidas, no cenário da quimioterapia da malária, são a CQ e a AQ. Enquanto o uso da primeira está limitado por causa dos problemas de resistência já atrás referidos, já no caso da AQ, foram os efeitos secundários, como hepatotoxicidade e anemia, que levaram a OMS a proibir o seu uso em 1990. No entanto, atendendo à sua elevada eficácia, a OMS aprovou a sua re-introdução em 1993 para tratamento de casos graves de malária, mas não como tratamento de primeira linha.³⁸ Têm surgido vários estudos com o intuito de criar novas 4-aminoquinolinas, análogas da CQ e da AQ, com perfis terapêuticos eventualmente melhorados. Neste contexto, Casagrande *et al.* desenvolveram a síntese e avaliação de novos compostos nos quais preservaram o anel 4-amino-7-cloroquinolínico (figura 6). A síntese destes compostos envolveu bastantes passos, mas permitiu encontrar um grupo de derivados com elevada atividade *in vitro* ($IC_{50} < 60$ nM) contra estirpes de parasita resistente à CQ.³⁹

Noutro estudo, Hocart *et al.* realizaram um estudo computacional das relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR, *Quantitative Structure Activity Relationships*), de modo a verificar quais os parâmetros estruturais essenciais para a atividade antimalárica da CQ e estruturas relacionadas; o conjunto de compostos contemplado no estudo QSAR havia sido previamente alvo de testes *in vitro*, sendo que 55% dos compostos foram ativos contra o *Plasmodium* resistente à CQ, com IC_{50} inferiores a 25 nM. Deste estudo, verificou-se que os compostos ativos apresentavam em comum as seguintes características (figura 7):

- (i) um halogénio como o cloro ou o bromo na posição 7 do anel quinolínico;
- (ii) o anel quinolínico sem substituições alquílicas;
- (iii) um átomo de azoto protonável na posição 1 e outro átomo de azoto protonável no final da cadeia alquílica.⁴⁰

Fig. 6: Derivados da 4-amino-7-cloroquinolina desenvolvidos por Casagrande *et al.*³⁹Fig. 7: Fatores estruturais essenciais à atividade antimalárica de 4-aminoquinolinas, de acordo com Hocart *et al.*⁴⁰

Porém, estudos recentes de Pérez *et al.* sugerem que não será essencial a presença de um azoto protonável no final da cadeia alquílica ligada ao grupo anilino da 4-amino-7-cloroquinolina.⁴¹⁻⁴³ De facto, estes autores desenvolveram três famílias de análogos da CQ, por conjugação da 4-amino-7-cloroquinolina com ácidos cinâmicos, usando diferentes espaçadores entre o núcleo heterocíclico e o grupo cinamoílo (Figura 8):

- (i) HECINs (**5**) – condensação direta do núcleo heterocíclico ao grupo cinamoílo, ou seja, ausência de espaçador;⁴²
- (ii) HEDICINs (**6**) – uso de espaçador dipeptídico entre o núcleo heterocíclico e o grupo cinamoílo;⁴¹
- (iii) HEFLECINs (**7**) – uso de espaçadores flexíveis (cadeias alquílicas não ramificadas) entre o núcleo heterocíclico e o grupo cinamoílo;^{42, 43}

Uma dessas famílias (HEFLECINs, **7**) exibiu potente atividade *in vitro* contra formas sanguíneas de estirpes de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à CQ, apesar da ausência do referido átomo de azoto protonável nas respetivas estruturas.^{42, 43}

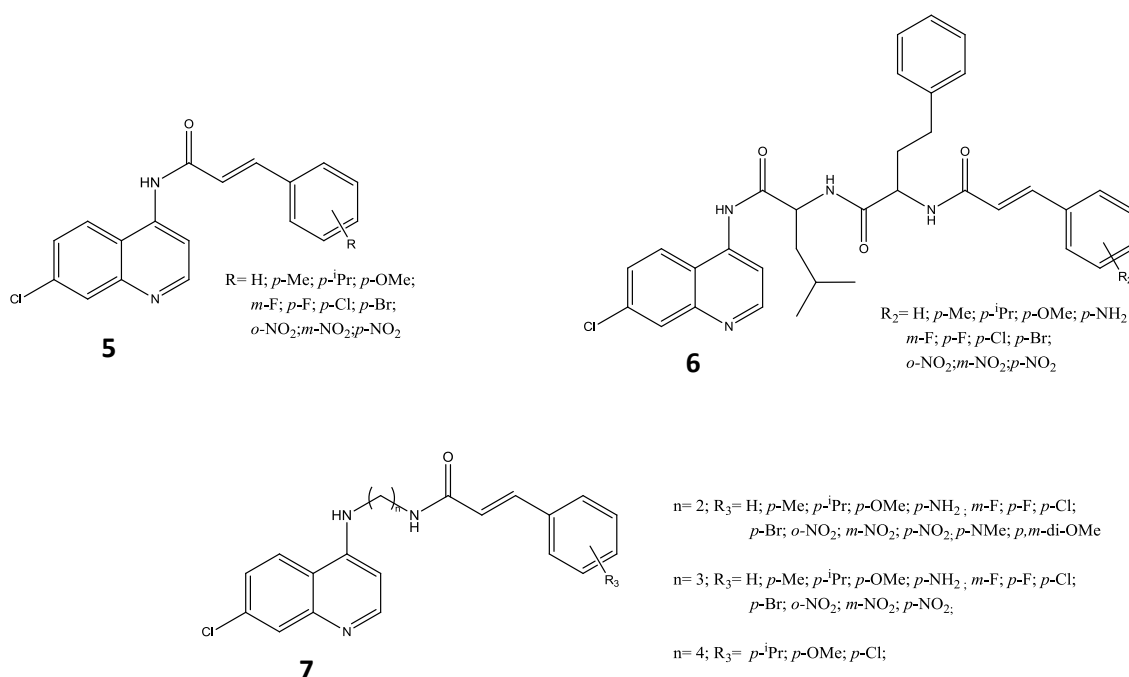
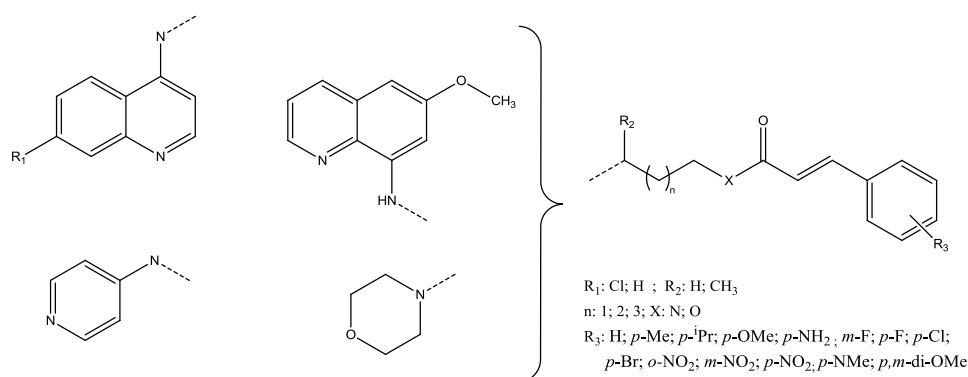


Fig. 8: Estrutura das três famílias de análogos da CQ descritas por Pérez *et al.*⁴¹⁻⁴³

Estas três famílias de compostos foram desenhadas com o intuito de criar, através de metodologias sintéticas simples e de baixo custo, protótipos antimaláricos de ação dual, potencialmente capazes de inibir (a) a formação de hemozoína (núcleo de 4-amino-7-cloroquinolina), e (b) a ação hemoglobinolítica das falciparinas parasíticas (sistema carbonilo α,β -insaturado no grupo cinamoílo).⁴¹ Foi possível verificar que apenas as HECINs apresentavam alguma capacidade, ainda que modesta, de inibir as falciparinas *in vitro*, não tendo no entanto qualquer atividade contra as formas sanguíneas de *P. falciparum*. Por seu turno, as HEDICINs e as HEFLECINs não foram capazes de inibir as falciparinas *in vitro*^{41, 42} apresentando porém atividades antiplasmódicas que se revelaram modestas no primeiro caso ($IC_{50} > 0,8 \mu M$), e potentes no segundo ($IC_{50} < 80 nM$). Portanto, foi possível verificar a importância de substituir um espaçador rígido (dipéptido) por um flexível (alquílico) para o aumento considerável da atividade antimalárica destes análogos da CQ, sendo que esta atividade não parece totalmente correlacionada com a capacidade dos compostos em inibir a formação de hemozoína.⁴¹⁻⁴³

Adicionalmente, as HEFLECINs revelaram ter também potente ação *in vitro* contra formas hepáticas de *P. berghei*, o que constituiu uma revelação sem precedentes para derivados ou análogos da CQ. Os mesmos autores sintetizaram um conjunto adicional de compostos estruturalmente relacionados com as HEFLECINs, com vista a estabelecer relações de estrutura-atividade (SAR, *structure-activity relationships*), constatando que (Figura 9):⁴³

- (i) o tamanho ideal do espaçador alquílico é de 4 carbonos;
- (ii) a substituição no grupo cinamoílo não influencia de forma significativa a atividade antimalárica, ainda que pareçam preferidos grupos monossubstituídos na posição *para*;
- (iii) é preferida uma ligação amida a uma ligação éster entre o espaçador e o grupo cinamoílo;
- (iv) o núcleo de 4-amino-7-cloro-quinolina é essencial para a preservação da atividade antimalárica dual (isto é, contra formas sanguíneas e hepáticas);
- (v) a remoção do átomo de cloro do núcleo acima referido leva a uma diminuição substancial da atividade.

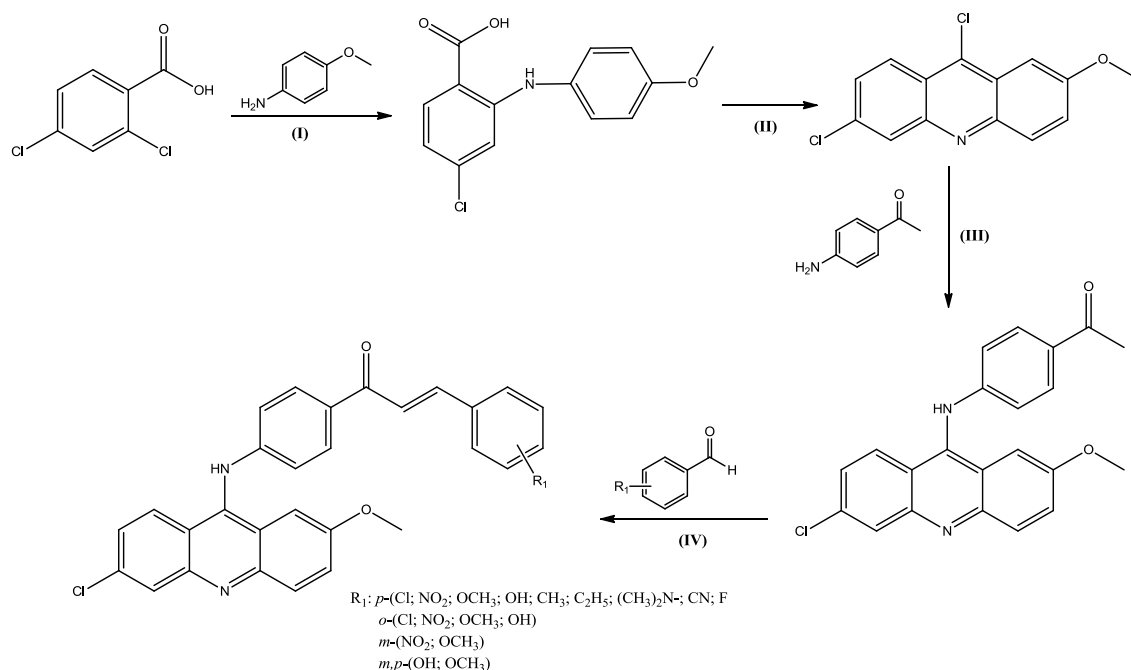
Fig. 9: Estrutura geral dos derivados HEFLECINs ⁴³

Este trabalho abriu novas perspectivas ao nível da “reciclagem” de fármacos antimaláricos clássicos, nomeadamente, da CQ, com vista à produção, a baixo custo, de novos protótipos antimaláricos de ação dual.

1.4.2. Estudos recentes de derivatização de acridinas

A QCR é o exemplo mais emblemático de acridinas antimaláricas, tendo também sido utilizado como agente anti-bacteriano,⁴⁴ anti-tumoral,⁴⁵ anti-helmíntico e fungicida.⁴⁶ Devido a este amplo leque de aplicações, a QCR tem sido alvo de estudos de natureza diversa, salientando-se, no âmbito desta dissertação, alguns dos que se centraram na modificação química da QCR visando novos protótipos antimaláricos.

Prajapati e colaboradores mostraram que a substituição da cadeia alifática da QCR por estruturas do tipo β -benzoestireno (Esquema 1) permitiu preservar a atividade antimalárica e especificidade em alguns casos.⁴⁷ Apesar da síntese destes compostos ser simples, iniciando-se pela preparação do núcleo 6,9-dicloro-2-metoxiacridina, e posterior reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) com o β -(4-aminobenzil)estireno, os compostos mais ativos contra a fase sanguínea do parasita apresentaram valores de IC₅₀ apenas razoáveis, entre 0,30 e 0,52 μ M.



Esquema 1: Rota geral de síntese dos derivados da QCR com estruturas do tipo β-benzoestireno. Condições reacionais: (I) K₂CO₃/Cu/ pentanol, 5 h sob refluxo; (II) POCl₃ sob refluxo por 6 h; (III) HCl, etanol, 110 °C durante 8 h; (IV) hidróxido de sódio, metanol, T_{amb} 8-12h.⁴⁷

Guetzoyan *et al.* sintetizaram análogos da QCR por ligação de diferentes cadeias alifáticas ao núcleo de 6-cloro-2-metoxiacridina, através de um único passo reacional (S_NAr). Sintetizaram, também, um análogo cujo núcleo de acridina era desprovido dos substituintes metoxilo e cloro, respetivamente, nas posições 2 e 6, para avaliar o efeito da remoção destes substituintes na atividade antimalária. Este estudo permitiu constatar que (i) os referidos substituintes são importantes para a preservação de atividade antimalária contra estirpes resistentes de *P. falciparum*, e (ii) tal atividade requer a presença de grupo terminal protonável na cadeia alifática. Na figura 10 está representado o composto que apresentou maior atividade contra uma estirpe sensível (3D7) à CQ, (IC₅₀ 42 nM) e três estirpes resistentes à CQ, nomeadamente, W2 (IC₅₀ 0,25 μM), FCR3 (IC₅₀ 0,33 μM) e Bre1 (IC₅₀ 0,28 μM).⁴⁸

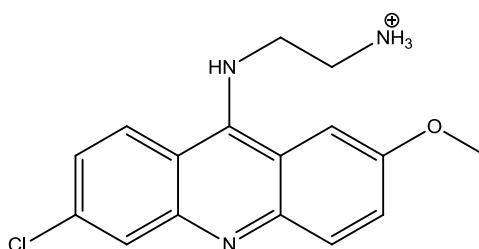
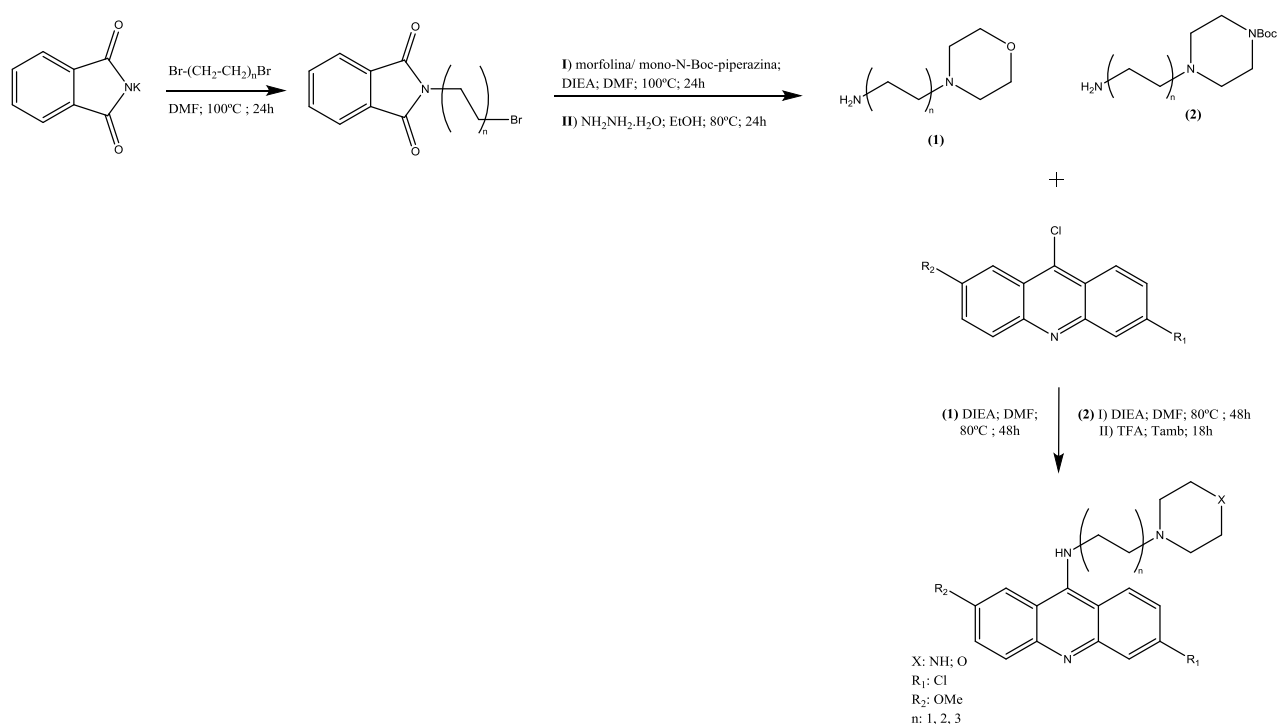


Fig. 10: Estrutura química do melhor dos derivados da QCR, desenvolvidos por Guetzoyan *et al.*⁴⁶

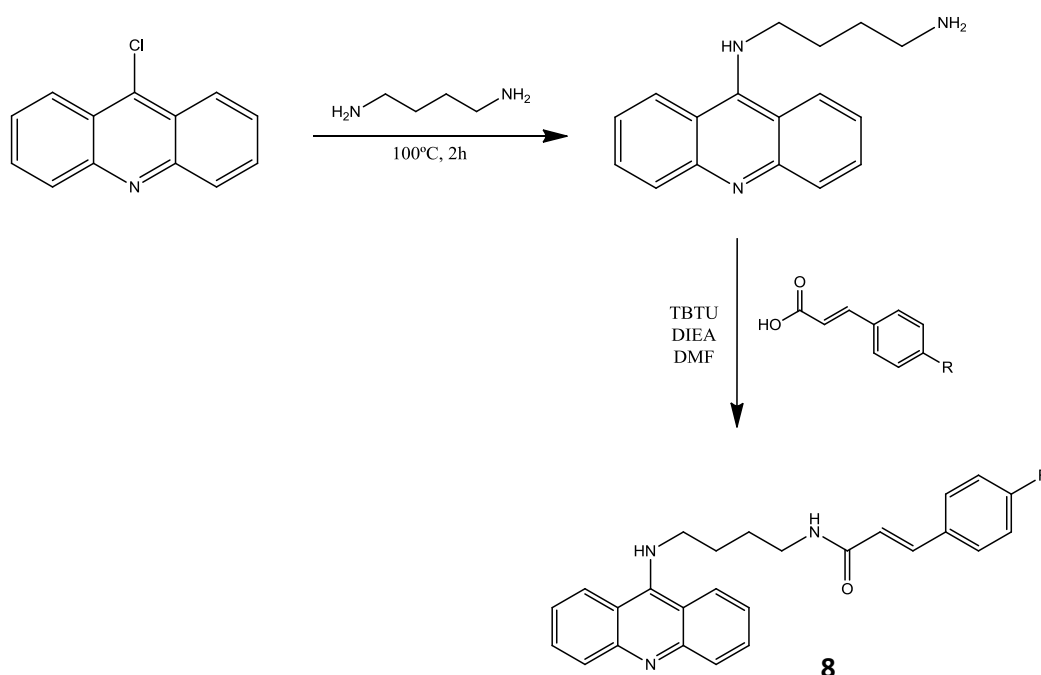
Yu *et al.* ampliaram o estudo com derivados semelhantes aos anteriores, desenvolvendo compostos a cuja cadeia alifática ($n = 1, 2$ ou 3 , Esquema 2) foram adicionados grupos heterocíclicos terminais. A rota sintética adotada envolveu vários passos reacionais, começando pela conjugação dos sistemas heterocíclicos às cadeias alifáticas, e posterior introdução da estrutura resultante no núcleo da QCR (Esquema 2). Os autores do estudo concluíram que o aumento da cadeia alifática (n crescente) conduzia a uma diminuição da atividade, ao passo que pouca diferença houve entre os derivados mais ativos ($n=1$) contendo um grupo terminal piperazina ou pirrolidina (IC_{50} , respectivamente, de 250 e 260 nM contra uma estirpe de *P. falciparum* resistente à CQ, cujo IC_{50} contra a mesma estirpe foi de 460 nM).⁴⁹



Esquema 2: Rota geral de síntese dos derivados com melhor atividade preparados por Yu *et al.*⁴⁷

Mais recentemente, Pérez *et al.*, na sequência dos bons resultados obtidos com os análogos *N*-cinamoilados da CQ já referidos na secção anterior,^{42, 43} prepararam análogos da QCR por conjugação de grupos cinamoílamino butilo com o núcleo de 9-aminoacridina (**8**, Esquema 3); em termos práticos, estes autores usaram como material de partida a 9-cloroacridina, que fizeram reagir com butano-1,4-diamina, (S_NAr), seguindo-se a condensação do grupo amino primário do produto obtido com um ácido cinâmico apropriado (Esquema 3).⁵⁰

Ainda que os compostos mais ativos tenham exibido uma atividade que não ultrapassou a da própria CQ (IC_{50} 126 – 145 nM) contra formas sanguíneas da estirpe de *P. falciparum* W2 (parcialmente resistente à CQ), verificou-se que apresentavam atividade contra formas hepáticas de *P. berghei*.⁵⁰ Tal constituiu um resultado sem precedente, na medida em que a QCR está descrita como desprovida de atividade contra formas hepáticas dos *Plasmodia*.⁵¹ Por outras palavras, o composto com melhor razão citotoxicidade/atividade apresentou uma atividade na fase sanguínea (IC_{50} 138 nM) semelhante à da CQ, e uma atividade na fase hepática (IC_{50} 3,2 μ M) aproximadamente três vezes superior à da PQ (IC_{50} 8 μ M), que é o fármaco de referência nessa fase.



Esquema 3: Síntese de análogos da QCR (8) previamente descritos por Pérez *et al.*⁴⁸

Verificou-se, também, que as 9-[N-(N-cinamoil)aminopropyl]aminoacridinas descritas no mesmo estudo não apresentaram qualquer atividade na inibição da formação da hemozoína; assim, os autores avançaram a hipótese de intercalação com o ADN parasitário na base do mecanismo de ação antimalárica daqueles compostos, não descartando, porém, a possibilidade de estarem em jogo outros alvos anteriormente sugeridos para as acridinas, como a topoisomerase II ou o complexo bc1 mitocondrial.⁵⁰ Este trabalho veio reforçar que, à semelhança do que o mesmo grupo verificou para análogos N-cinamoilados da CQ,^{42, 43} o desenvolvimento de análogos N-cinamoilados da QCR poderá conduzir a novos protótipos de ação dual contra a malária.

Capítulo 2

Âmbito do trabalho

2. Âmbito do trabalho

2.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese de derivados de 9-aminoacridinas e 4-aminoquinolinas como potenciais protótipos antimaláricos, na continuidade de um projeto de investigação coordenado pela Professora Doutora Paula Alexandra de Carvalho Gomes (orientadora desta Dissertação), do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e do Centro de Investigação em Química da mesma Universidade, e em que também participam a Doutora Cátia Andreia da Silva Teixeira (co-orientadora desta Dissertação), e a doutoranda Bianca Celidet Pérez de Lucani.

Os objetivos específicos deste trabalho de Dissertação foram os seguintes:

- (i) otimização da síntese de uma 9-aminoacridina já anteriormente descrita, a 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (**9**, Figura 11);
- (ii) síntese, purificação e caracterização estrutural de uma nova família de derivados 4-aminoquinolínicos (**10a-i**, Figura 11) análogos da CQ;
- (iii) síntese, purificação e caracterização estrutural de uma nova família de derivados 9-aminoacridínicos (**11a-f**, Figura 11) análogos da QCR;
- (iv) avaliação da inibição da formação de hemozoína *in vitro* por ação dos novos compostos referidos nos dois pontos anteriores (compostos **10a-i** e **11a-f**).

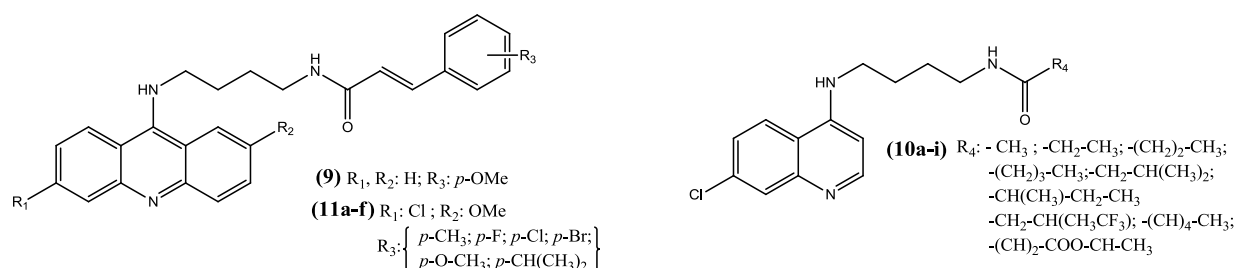


Fig. 11: Compostos alvo de estudo no âmbito da presente Dissertação.

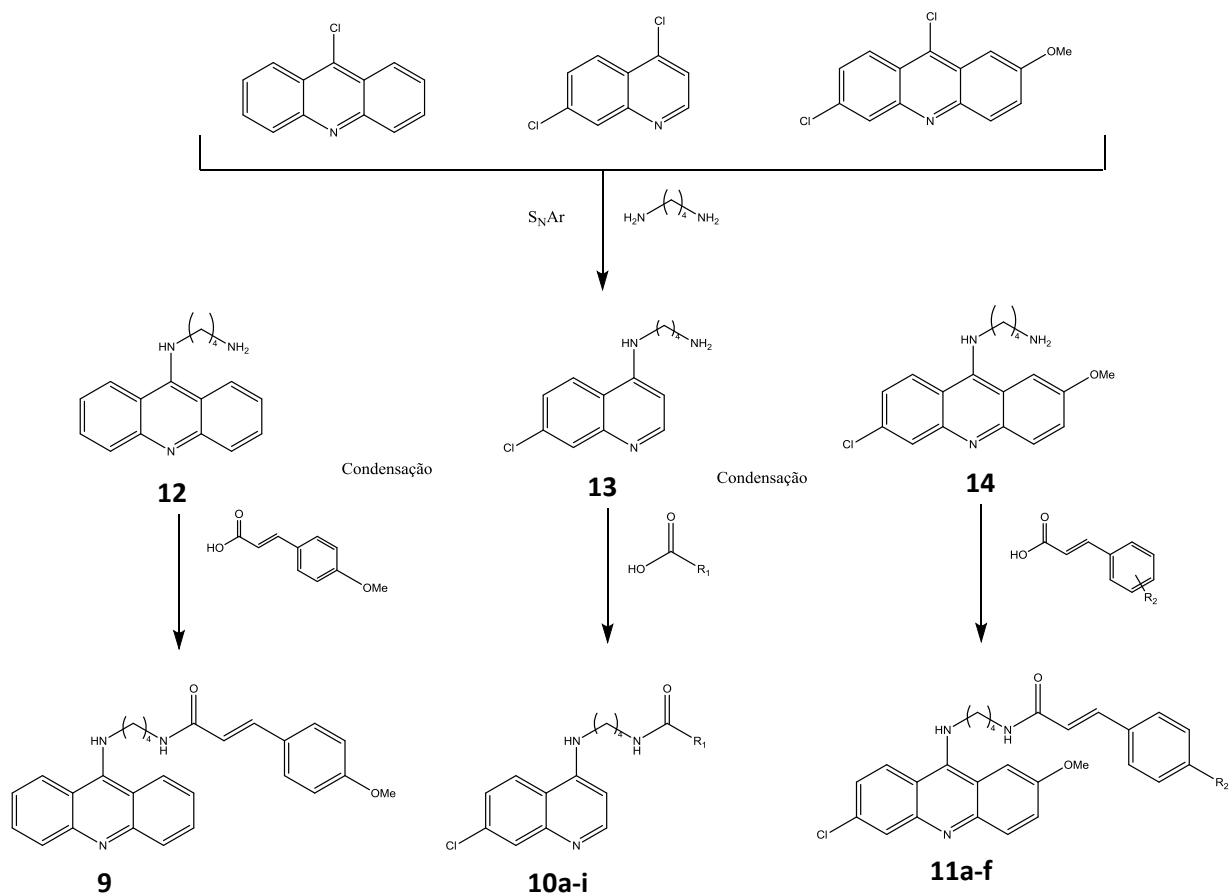
A seleção dos novos compostos-alvo, **10a-i** e **11a-f**, teve por base anteriores resultados obtidos pelo grupo de investigação, já referidos no Capítulo anterior. Assim:

- i) a família de 4-aminoquinolinas **10a-i** foi planeada de forma a que se possa testar o efeito, na atividade antimalárica, da substituição do grupo cinamoílo existente nas HEFLECINs (**7**, Figura 8) por diferentes grupos alcenoílo e alcenoílo; portanto, comparativamente às HEFLECINs **7**, mantêm-se inalterados o núcleo de 4-amino-7-cloroquinolina e o espaçador de 4 carbonos;
- ii) a família de 9-aminoacridinas **11a-f** foi concebida por analogia às 9-aminoacridinas **8** (Esquema 3), pretendendo-se avaliar o efeito da introdução dos substituintes 2-metoxilo e 6-cloro no núcleo de acridina na atividade antimalárica; assim, foram selecionadas como molde as 9-aminoacridinas **8** de atividade mais promissora, sintetizando-se as suas análogas por substituição do núcleo de acridina pelo núcleo de 6-cloro-2-metoxiacridina, mantendo a restante estrutura inalterada.

Os novos compostos produzidos serão oportunamente avaliados quanto à sua atividade *in vitro* contra formas hepáticas e formas sanguíneas do *Plasmodium*, em colaboração, respetivamente, com o Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, e com o Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

2.2. Rota sintética

À semelhança do anteriormente descrito para as HEFLECINs (**7**) e seus análogos de acridina, **8**, a rota de síntese dos compostos **9**, **10a-i** e **11a-f** foi delineada conforme se apresenta no Esquema 4: partiu-se do derivado heterocíclico relevante, possuindo um substituinte cloro na posição a modificar, ou seja, partiu-se de 9-cloroacridina, 4,7-dicloroquinolina e 6,9-dicloro-2-metoxiacridina para a síntese de, respetivamente, **9**, **10a-i** e **11a-f**. O reagente de partida foi submetido a uma S_NAr , usando butano-1,4-diamina como nucleófilo, para se obter, conforme o caso, 9-(*N*-aminobutil)aminoacridina (**12**), 4-(*N*-aminobutil)amino-7-cloroquinolina (**13**) ou 9-(*N*-aminobutil)amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**14**); cada um destes derivados aminobutilados reagiu, posteriormente, com o ácido carboxílico apropriado (na presença de um agente de condensação *in situ*) ou com um derivado reativo do ácido carboxílico relevante (cloreto de ácido).



Capítulo 3

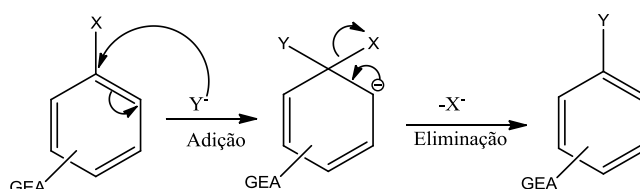
Resultados e Discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Síntese dos análogos de cloroquina

3.1.1. Reação de Substituição Nucleófila Aromática (S_NAr)

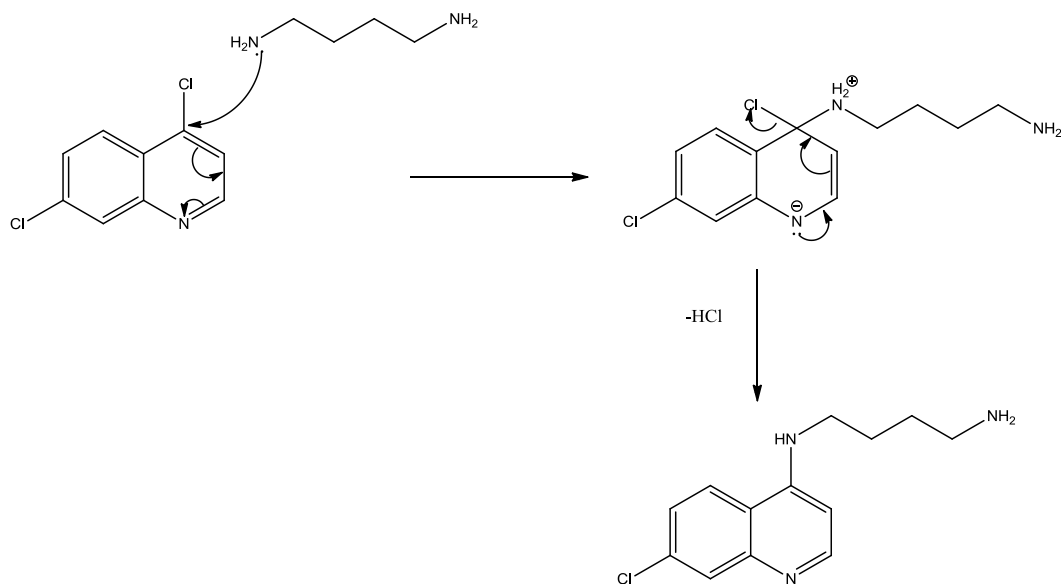
As reações de substituições nucleófila em sistemas aromáticos ocorrem por um mecanismo de adição-eliminação. Este mecanismo (Esquema 5) processa-se em dois passos: (i) o nucleófilo é adicionado ao halogeneto de arilo, seguindo-se (ii) a eliminação do halogeneto (grupo de saída).⁵²



Esquema 5: Mecanismo geral de uma S_NAr (Y= nucleófilo; X= grupo de saída; GEA= grupo eletroatrator)

De um modo geral, os anéis aromáticos não são propensos a sofrer substituições nucleófilas, dada a elevada densidade eletrônica associada aos elétrons π deslocalizados sobre os anéis. No entanto, quando esses anéis possuem substituintes atraidores de elétrons, ou quando existe um heteroátomo eletronegativo incorporado no anel aromático, a ocorrência de uma substituição nucleófila poderá estar facilitada. Um exemplo simples deste último caso é o da piridina, cujo caráter nucleófilo é significativamente inferior ao do benzeno, devido à elevada eletronegatividade do átomo de azoto inserido no anel heteroaromático; assim, torna-se mais fácil realizar uma S_NAr sobre um anel de piridina do que sobre um anel de benzeno. Da mesma forma, o forte caráter eletroatrator do grupo nitro faz com que seja mais fácil a ocorrência de uma S_NAr no nitrobenzeno do que no benzeno.

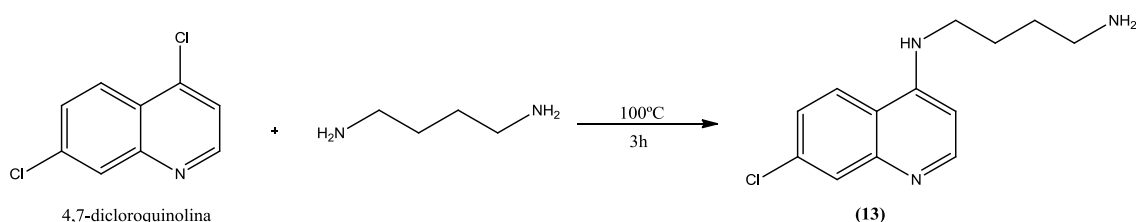
No caso particular deste trabalho, começou-se por realizar uma S_NAr sobre a 4,7-dicloroquinolina, usando butano-1,4-diamina como nucleófilo (Esquema 6); neste caso, o ataque nucleofílico ocorre preferencialmente no carbono 4 do anel quinolínico, dado ser este o carbono mais eletrofílico, por estar simultaneamente ligado a um átomo de cloro (que será o grupo de saída) e em posição *para* relativamente ao azoto do anel heterocíclico.



Esquema 6: Mecanismo de S_NAr na 4,7-dicloroquinolina, usando butano-1,4-diamina como nucleófilo.

3.1.2. Síntese da 4-*N*-(aminobutil)amino-7-cloroquinolina (**13**)

A reação entre a 4,7-dicloroquinolina e a butano-1,4-diamina (Equação 1) ocorreu a uma temperatura de 100 °C durante 3 horas, de acordo com a metodologia já utilizada por Pérez *et al.*⁴² A reação ocorreu sem problemas e com elevado rendimento (85%), o que se pode considerar como demonstrativo do bom caráter nucleófilo da diamina e de que o sistema heteroaromático usado está suficientemente ativado para sofrer a S_NAr desejada.

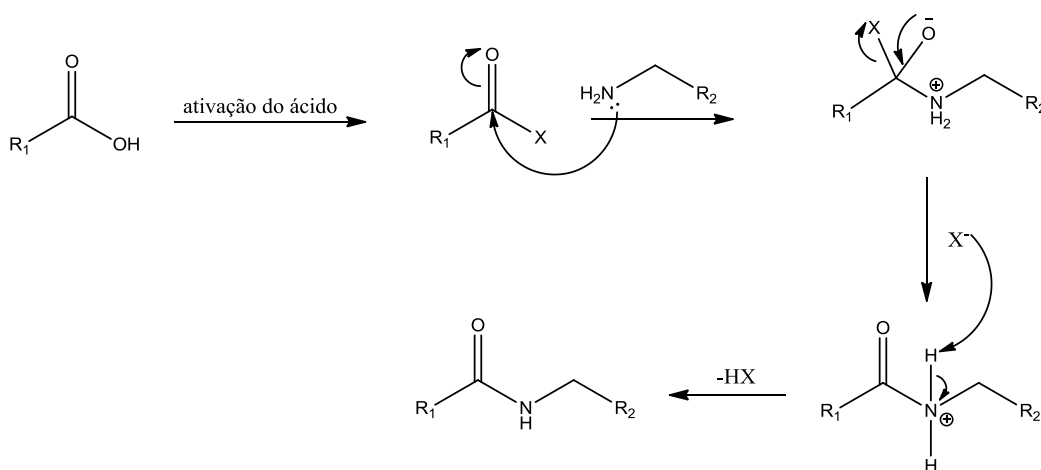


O produto obtido, **13**, apresentou-se como um sólido branco, cujo ponto de fusão e dados espectroscópicos, obtidos quer por espectrometria de massa (ESI-IT MS), quer por Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN-¹H) e de carbono (RMN-¹³C), estavam de acordo com dados anteriormente publicados para o mesmo composto.⁴²

3.1.3. Síntese dos compostos **10a-i** por condensação de **13** com ácidos carboxílicos ou seus derivados

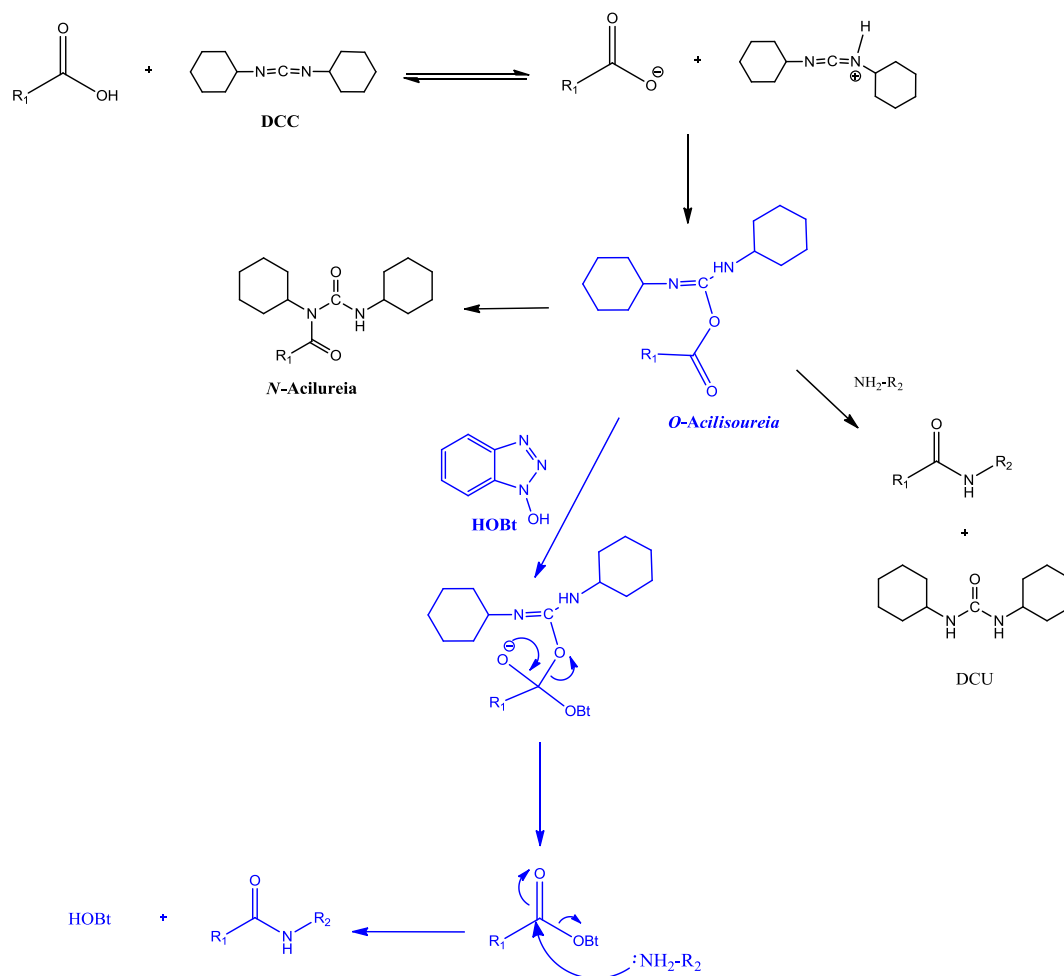
3.1.3.1. Reação de Condensação

A reação entre um ácido carboxílico e uma amina, à temperatura ambiente e na ausência de outros agentes, conduz à formação do correspondente carboxilato de amónio numa reação ácido-base. No entanto, se a amina for primária ou secundária, e a reação for realizada a elevada temperatura, ou se forem usados derivados reativos dos ácidos carboxílicos (por exemplo, halogenetos de alcanoílo ou anidridos), forma-se uma amida, por um mecanismo de adição-eliminação (condensação).⁵³ Os derivados reativos dos ácidos carboxílicos podem ser formados *in situ*, mediante adição de agentes de ativação, acoplamento ou condensação. Estes agentes reagem prontamente com o ácido carboxílico, transformando-o num derivado reativo cujo carbono carbonílico será mais eletrófilo que no ácido carboxílico de partida e estará ligado a um grupo X que se comporta como melhor grupo abandonante que o –OH do grupo carboxílico original (Esquema 7).



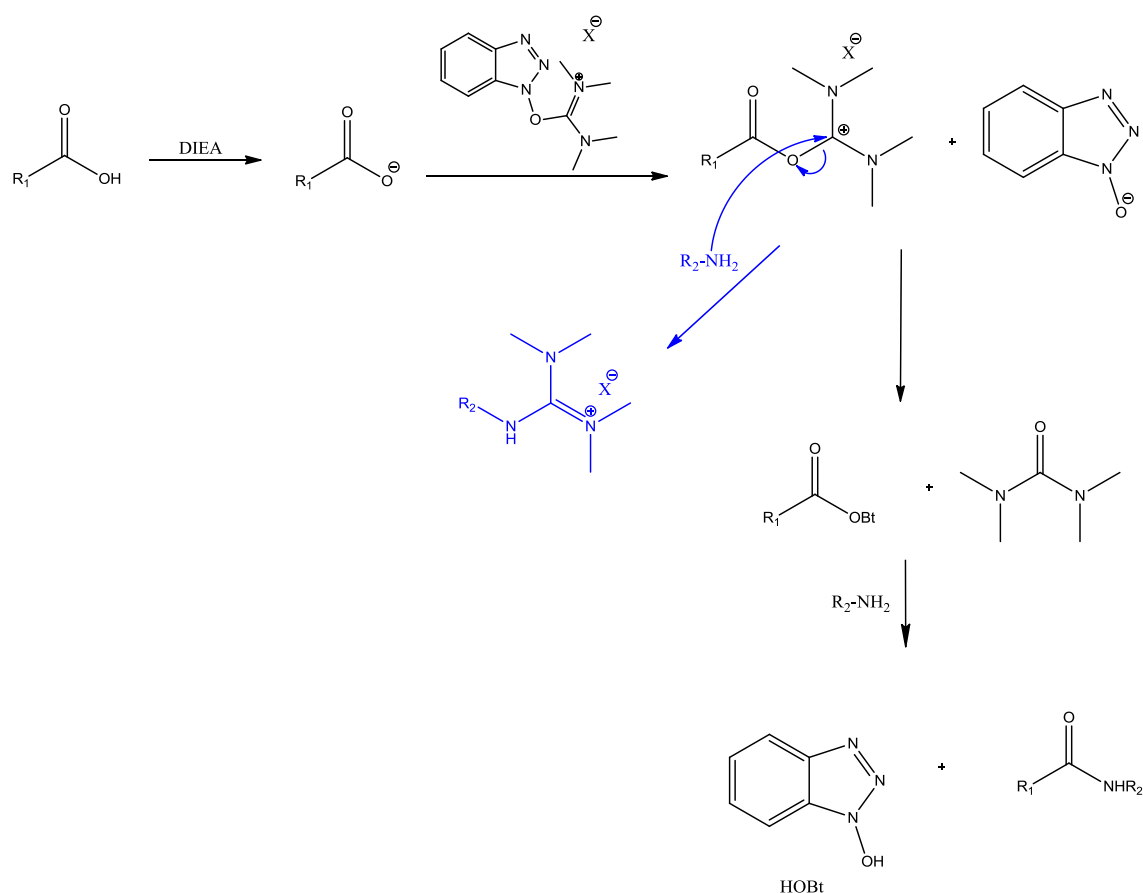
Esquema 7: Mecanismo geral de formação de uma ligação amida mediante ativação *in situ* do ácido carboxílico.

O desenvolvimento de agentes de condensação *in situ* foi grandemente impulsionado, a partir de meados do século XX, devido à intensa procura de métodos suaves e eficazes de síntese química de péptidos e proteínas, que podem ser vistas como poliamidas resultantes da condensação sequencial entre α -aminoácidos. Os primeiros agentes de *acoplamento in situ* desenvolvidos com este fim foram as carbodiimidas, de que é exemplo a diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), ainda utilizada pela sua eficácia e baixo custo. A utilização da DCC como agente de condensação tem a vantagem de envolver a formação de diciclo-hexilureia (DCU) como produto lateral (Esquema 8), cuja formação é termodinamicamente favorecida (favorecendo, portanto, a reação de condensação no sentido da formação da amida) e cuja baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos correntes facilita a sua eliminação, por filtração. No entanto, quando a amina não tem caráter nucleofílico pronunciado, ou seja, quando o seu ataque à *O*-acilisourea intermediária é muito lento, ocorre preferencialmente a formação de uma *N*-acilureia, por ataque nucleofílico intramolecular do azoto imínico ao carbonilo ativado (Esquema 8).⁵⁴ Tal constitui um problema, pois a *N*-acilureia é muito estável, impedindo, portanto, a formação da amida desejada. Este problema pode ser minimizado por combinação da carbodiimida com um nucleófilo auxiliar como o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt), que reage prontamente com a *O*-acilisourea, resultando um éster de benzotriazolilo; este, sendo mais estável que a *O*-acilisourea, é ainda suficientemente reativo para sofrer o ataque nucleofílico por parte da amina. Adicionalmente, em síntese peptídica, o HOBt tem a vantagem de diminuir o risco de epimerização do carbono do aminoácido ativado, dado o seu caráter ligeiramente ácido.^{54, 55}



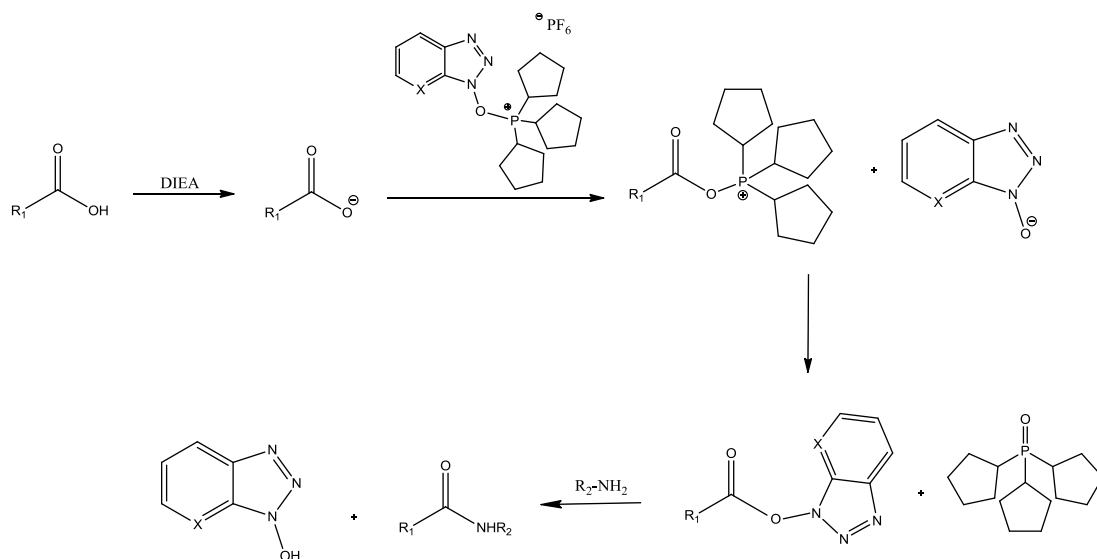
Esquema 8: Formação de uma amida mediada por DCC como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral via O -acilisourea (via da direita, a preto), bem como a conversão indesejável desta numa N -acilureia (via da esquerda, a preto) e o uso combinado de DCC com HOBt , para evitar esse problema (via central, a azul).⁵⁴

Outros agentes de condensação muito utilizados, e que se popularizaram a partir dos anos 1980, são os sais de amínio como o tetrafluoroborato ou o hexafluorofosfato de O -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, respetivamente, TBTU ou HBTU. O uso destes agentes de condensação não requer a utilização de nucleófilos auxiliares, na medida em levam à formação de HOBt *in situ*, com a subsequente formação do éster de benzotriazolilo, à semelhança do que acontece quando se combina HOBt com carbodiimidas (Esquema 8). No entanto, o uso de sais de amínio requer a adição de aminas terciárias como a N -etil- N,N -diisopropilamina (DIEA), para desprotonação do ácido carboxílico (Esquema 9). Regra geral, os sais de amínio são agentes de acoplamento eficazes e pouco problemáticos, mas quando a condensação tem que ser prolongada devido a uma baixa nucleofilicidade da amina, há o risco desta ser guanidilada (Esquema 9), diminuindo o rendimento da condensação.⁵⁴



Esquema 9: Formação de uma amida mediada por um sal de amínio (no TBTU, $X^-=\text{BF}_4^-$; no HBTU, $X^-=\text{PF}_6^-$) como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral (via da direita, a preto), bem como a guanidilação indesejável da amina (via da esquerda, a azul).⁵⁵

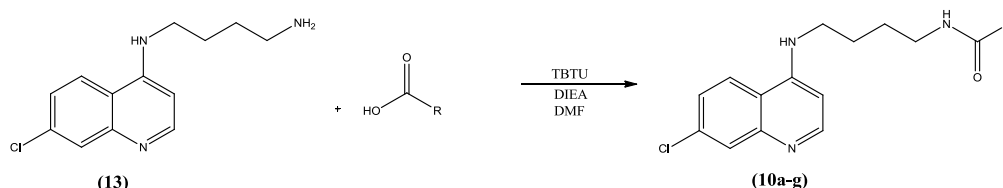
Para ultrapassar o problema da guanidilação, podem ser utilizados sais de fosfónio, como o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidin)fosfónio (PyBOP) ou o hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidin)fosfónio (PyAOP), sendo este mais eficiente que o anterior. O mecanismo de condensação mediado por estes sais de fosfónio é semelhante ao dos sais de amínio, sendo o componente carboxílico primeiramente desprotonado pelo uso de uma base como a DIEA e de seguida ativado *in situ* para gerar o éster de benzotriazolilo (Esquema 10).



Esquema 10: Formação de uma amida mediada por um sal de fósforo (no PyBOP, $X=\text{CH}$; no PyAOP, $X=\text{N}$) como agente de ativação do ácido carboxílico; ilustra-se o mecanismo geral via éster de benzotriazolilo.

No âmbito deste trabalho, foi geralmente usado o TBTU para promover a reação final de condensação, tendo-se ocasionalmente testado a utilização do PyBOP e do PyAOP, ou o uso de derivados de ácidos carboxílicos (cloretos de ácido), com vista à otimização do rendimento de algumas das condensações realizadas.

3.1.3.2. Síntese dos compostos 10a-g



Equação 2

A síntese da maioria dos novos análogos de CQ, nomeadamente, dos compostos **10a-g**, foi realizada por condensação do composto **13** com diferentes ácidos carboxílicos, de acordo com a equação química geral acima representada (Equação 2). As reações foram realizadas ao longo de um dia, à temperatura ambiente e usando-se TBTU como agente de condensação e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente. De uma forma geral, o seguimento das reações por cromatografia líquida em camada fina (CCF) mostrou tratarem-se de reações “limpas”, ou seja, sem formação significativa de produtos secundários, o que simplificou a purificação dos produtos-alvo, realizada por extração líquido-líquido, seguida de cromatografia líquida em coluna de gel de sílica.

Conforme se ilustra na Tabela 1, os produtos desejados foram obtidos com rendimentos razoáveis a bons, e elevados graus de pureza, estes determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Apenas se salienta o mais baixo rendimento obtido para o produto **10a**, cuja maior solubilidade em água, em comparação com os restantes, levou a que parte dele se perdesse na fase aquosa, aquando das extrações líquido-líquido. Tentou-se, sem sucesso, contornar este problema de duas formas distintas:

- a) substituição do TBTU por PyBOP, de modo a se ter uma mistura reacional mais simples e assim se poder prescindir da etapa separativa por extração líquido-líquido; no entanto, este procedimento não permitiu separar o produto-alvo do excesso de DIEA presente na mistura reacional, dado co-eluírem em diferentes sistemas de eluentes;

- b) reação direta entre o componente amino (**13**) e o ácido acético a 120 °C, na presença de filtros moleculares de 3 Å e na ausência de solvente, de acordo com o método descrito por Gooßen *et al.*,⁵⁶ após algumas horas sem ser detetada a formação de produto, adicionou-se um pequeno volume de DMF, mas não se obteve melhor resultado.

A caracterização estrutural dos compostos isolados, por ESI-IT MS e por RMN (¹H e ¹³C), permitiu identificá-los como sendo os produtos-alvo, de acordo com os dados espectroscópicos descritos detalhadamente na Parte Experimental. A título de exemplo, apresentam-se os espectros obtidos (Figuras 12 a 15) para o composto **10d**, que resultou da condensação de **13** com ácido pentanóico (ou valérico).

Tabela 1: Dados gerais da síntese dos compostos **10a-g**

Produto-alvo	MM (g.mol ⁻¹)	Rendimento (%)	Massa final obtida (mg)	Pureza* (%)	Ponto de fusão (°C)	Aspetto
10a	291,78	18,9%	22,4	92,74	168-176	Sólido Branco
10b	305,80	42,2%	52,3	94,92	175-184	
10c	319,83	54,1%	73,6	94,51	174-181	
10d	333,86	57,1%	87,7	96,81	158-165	
10e	333,86	83,3%	112,4	94,23	146-154	
10f	333,86	68,5%	96,0	93,21	160-167	
10g	387,83	55,5%	21,7	97,21	156-160	

*Determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com gradiente de eluição entre 10 e 70% de acetonitrilo (ACN) em água, ao longo de 25 minutos; fluxo de 1mL.min⁻¹ e detecção a 260nm.

Como se pode ver na Figura 12, o espectro de ESI-IT MS do produto **10d** apresenta o pico-base a m/z 334,40, o que é compatível com o ião quasi-molecular (MH⁺) do produto esperado, cuja massa exata é 333,16 unidades de massa atômica (u.m.a.). É, ainda, possível observar um pico minoritário a m/z 666,67, compatível com o ião molecular de um dímero de **10d** (M₂⁺).

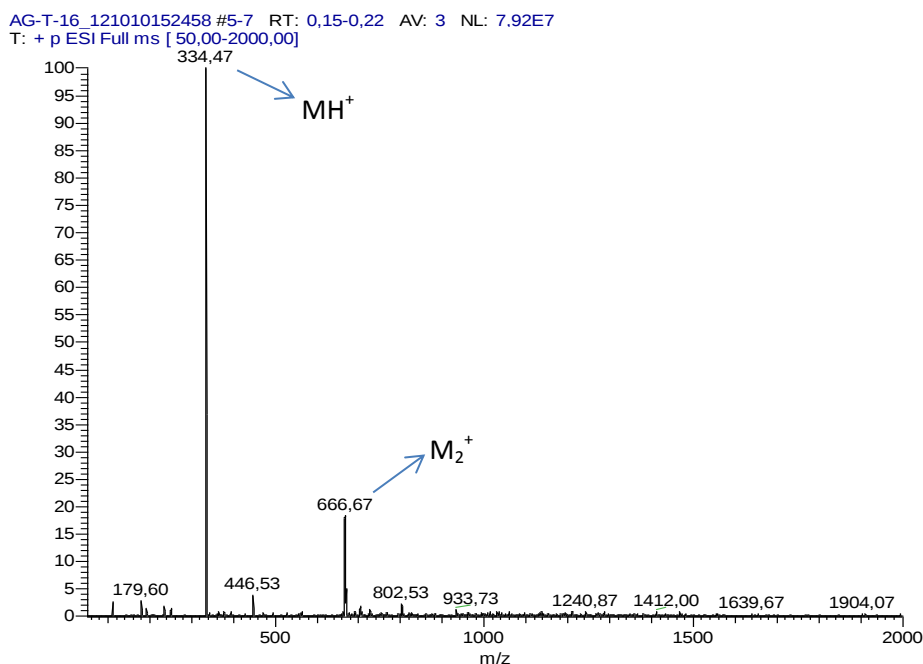
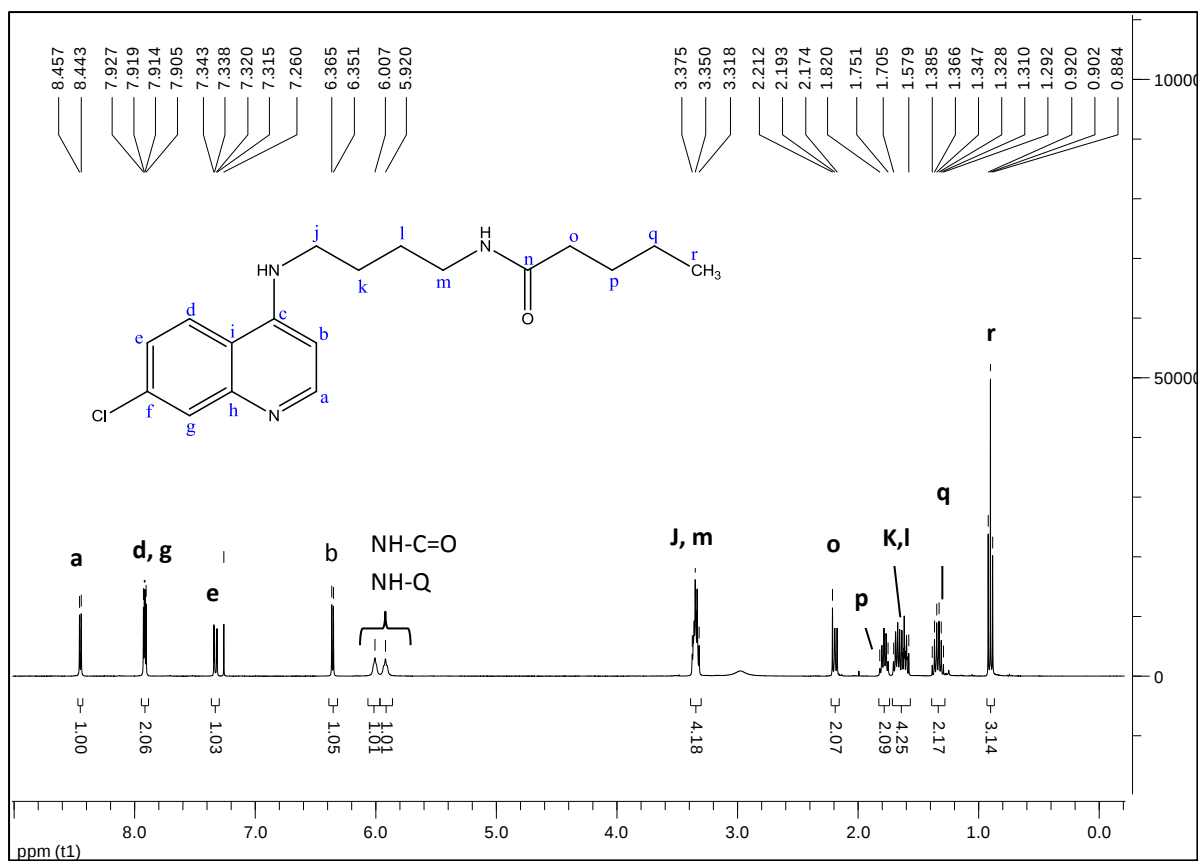
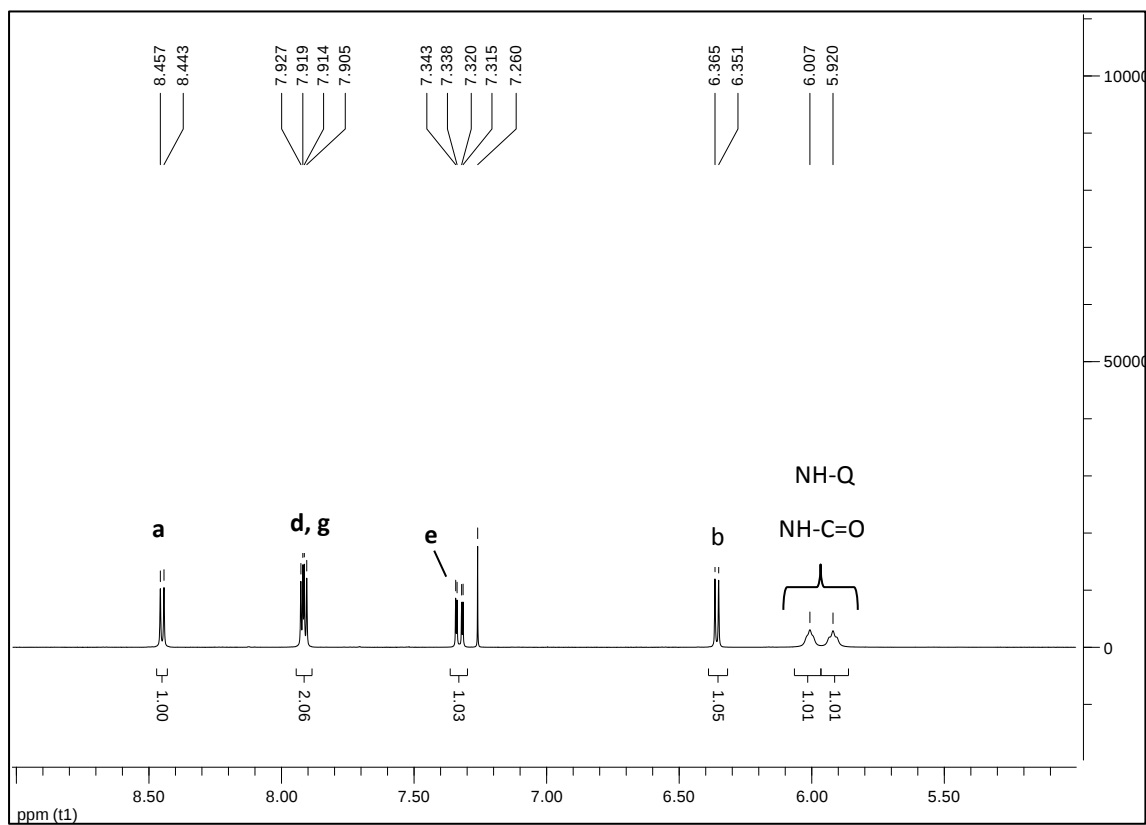


Fig. 12: Espetro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) do composto **10d**.

O espectro de RMN-¹H do composto **10d** está reproduzido na figura 13 (ampliação da zona entre 5,0 e 9,0 ppm na Figura 14), sendo possível confirmar a presença: (i) dos prótons do anel quinolínico, Ha,b,d,e,g, entre 6,351 e 8,457 ppm; (ii) dos prótons metilénicos, quer do espaçador butilo entre a amina e a amida (Hj-Hm), quer do grupo pentanoílo (Ho-Hq); e (iii) dos prótons metílicos, Hr, a 0,902 ppm. Também foi possível identificar os prótons amínico e amídico, que surgiram muito próximos um do outro, a 5,920 e 6,007 ppm. As atribuições, multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de RMN-¹H, quer deste composto, quer dos restantes da família, encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

Fig. 13: Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **10d**.Fig. 14: Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **10d** no intervalo de 5,0 a 9,0 ppm.

Na figura 15 apresenta-se o espectro de RMN- ^{13}C do mesmo composto, **10d**, cujos sinais se apresentaram igualmente de acordo com o esperado. Assim, observou-se (i) o pico correspondente ao carbono da ligação amida (Cn) a 173,793 ppm; (ii) os nove picos devidos aos carbonos do anel quinolínico (Ca-Ci), entre 151,102 e 98,791 ppm; (iii) os sete picos correspondentes aos carbonos metilénicos (Cj-Cm e Co-Cq), entre 43,158 e 22,384 ppm; e (iv) o pico devido ao carbono metílico (Cr), a 13,766 ppm.

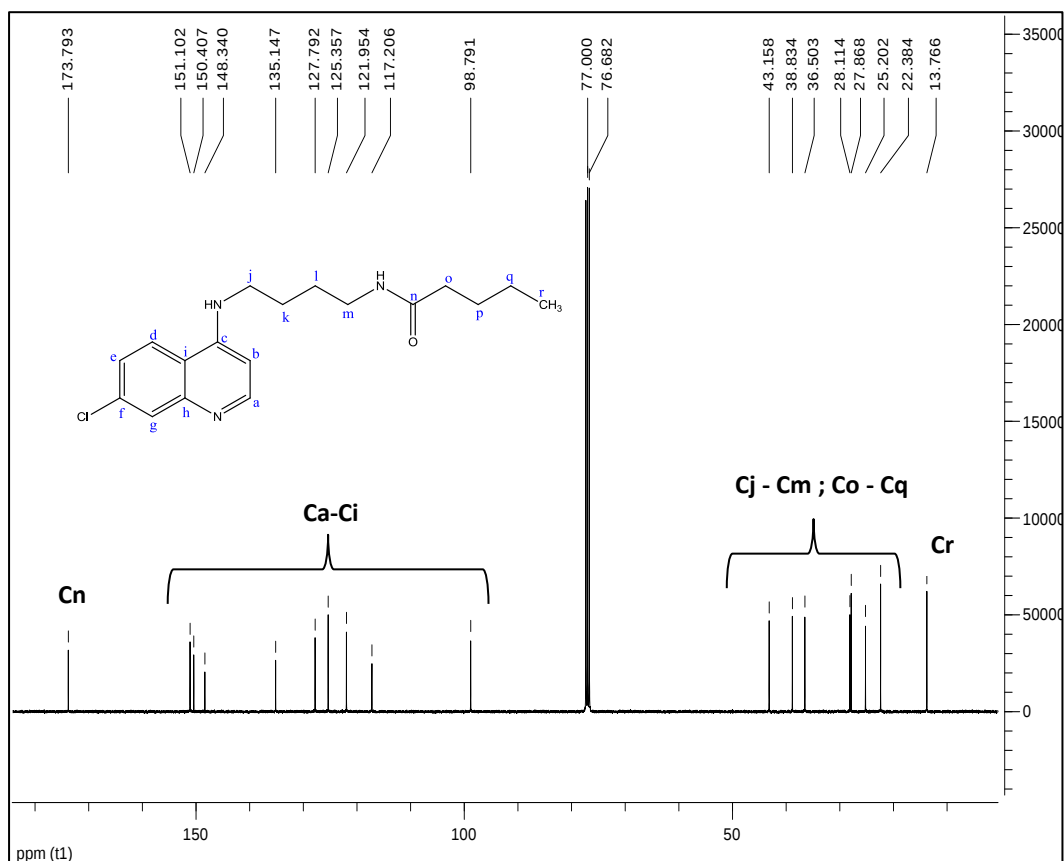
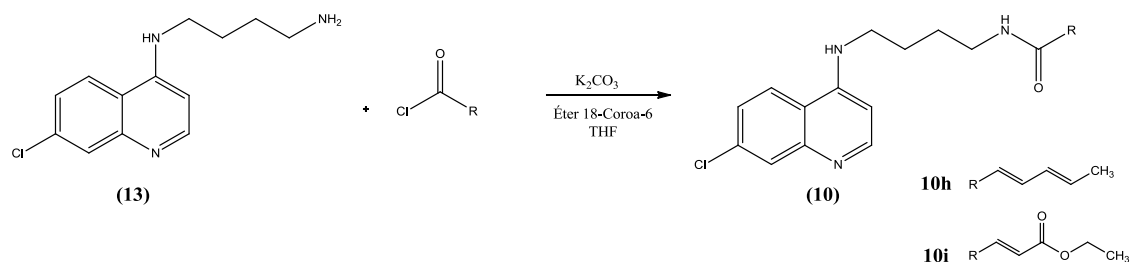


Fig. 15: Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **10d**.

3.1.3.3. Síntese dos compostos **10h,i**



A síntese dos análogos de CQ **10h,i** foi abordada de forma ligeiramente diferente à atrás descrita, na medida em que não se fez reagir o composto **13** com ácidos carboxílicos, mas antes com os correspondentes cloretos de ácido, disponíveis comercialmente. Assim, não foi necessário o recurso a um agente de acoplamento para ativação *in situ* do grupo carboxílico, tendo-se começado por realizar a condensação entre **13** e cada cloreto de ácido na presença de carbonato de potássio e de 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano (éter 18-coroa-6), usando tetra-hidrofurano (THF) como solvente (Equação 3). No entanto, não se obteve os resultados desejados, dado que, nestas condições, a formação dos produtos-alvo ou não foi sequer detetada (**10h**), ou ocorreu em extensão quase desprezável (**10i**, detetado em quantidade vestigial por ESI-IT MS). Perante este resultado, optou-se por testar o uso de outras bases e solventes (Tabela 2), de acordo com um trabalho anteriormente descrito por Zhang *et al.*⁵⁷ Tal permitiu observar que:

- (i) é possível obter o produto-alvo **10h**, ainda que em rendimento modesto (27,2%), por substituição do par K_2CO_3 / éter 18-coroa-6 por carbonato de céσιο, mantendo-se THF como solvente;
- (ii) o rendimento da síntese de **10h**, referida na alínea anterior, é substancialmente melhorado (57,2%), se o solvente THF for substituído por DMF;
- (iii) da mesma forma que em (ii), o melhor resultado de síntese de **10i**, dentro das condições testadas, foi aquele em que se usou Cs_2CO_3 como base e DMF como solvente;
- (iv) a substituição do par Cs_2CO_3 /DMF por trietilamina/diclorometano (Et_3N /DCM) conduz a piores resultados, ou seja, não permite detetar a formação de **10h** e leva a uma diminuição do rendimento de síntese de **10i**.

As estruturas dos análogos de CQ **10h,i** foram confirmadas por ESI-IT MS, RMN-¹H e RMN-¹³C, conforme demonstram os dados espectrais constantes da Parte Experimental.

Tabela 2: Dados gerais sobre as diferentes abordagens à síntese dos compostos **10h,i**

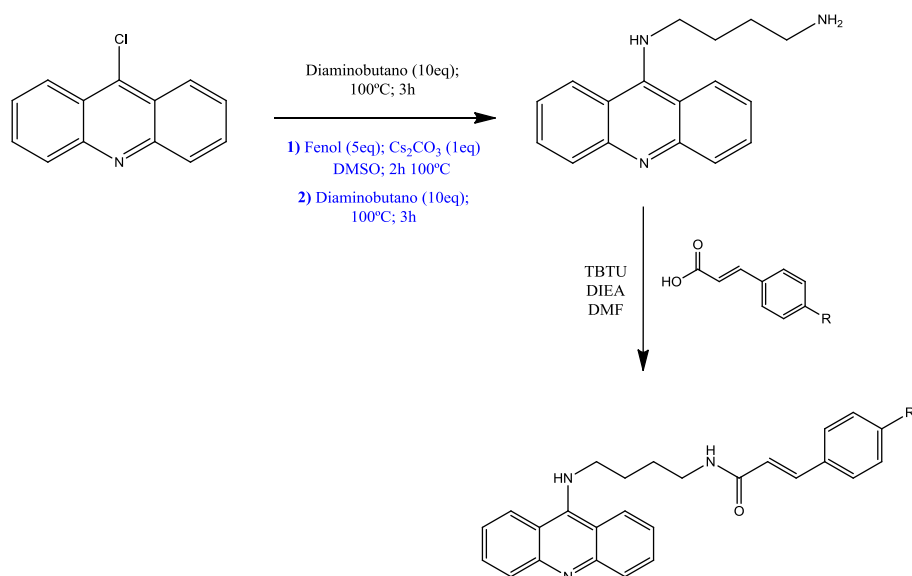
Produto-alvo	MM (g.mol ⁻¹)	Solvente	Base	Rendimento (%)	Pureza* (%)	P.f (°C)	Aspetto
10h	343,85	THF	K ₂ CO ₃ (2,5 eq) /éter 18-coroa-6	-	100,00	165- 171	Sólido branco
		DCM	Et ₃ N (2,0eq)	-			
		THF	Cs ₂ CO ₃ (2,5eq)	27,2%			
		DMF		57,2%			
10i	375,85	THF	K ₂ CO ₃ (2,5 eq) /éter 18-coroa-6	3,3%	95,89	189- 193	
		DCM	Et ₃ N (2,0eq)	7,0%			
		DMF	Cs ₂ CO ₃ (2,5eq)	11,0%			

* Determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com gradiente de eluição entre 10 e 70% de acetonitrilo (ACN) em água, ao longo de 25 minutos; fluxo de 1mL.min⁻¹ e detecção a 260nm.

3.2. Síntese dos análogos de quinacrina

3.2.1. Otimização da síntese da 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (**9**)

De acordo com o que já foi referido na apresentação do âmbito e objetivos da presente Dissertação, esta surgiu na continuidade de estudos anteriores do grupo, centrados na criação de novos protótipos antimaláricos, por “reciclagem” de sistemas heterocíclicos existentes em agentes antimaláricos clássicos. Neste contexto, foi anteriormente sintetizada uma série de 9-[N-(N-cinamoíl)aminobutil]aminoacridinas cuja atividade antimalárica se revelou promissora.⁵⁰ Por isso, foi avançada a hipótese de se produzir, no âmbito desta Dissertação, novos análogos potencialmente mais ativos (**11a-f**), possuindo o núcleo de 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina existente na QCR. No entanto, devido aos baixos rendimentos de síntese (2 a 22%) anteriormente registados para as 9-[N-(N-cinamoíl)aminobutil]aminoacridinas (Esquema 11), decidiu-se começar por tentar otimizar o rendimento de síntese de uma delas, a 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (**9**), antes de se avançar para a preparação dos compostos **11a-f**. Assim, e dado que se havia anteriormente considerado que a S_NAr seria o passo reacional com maior influência no baixo rendimento global da síntese de **9**, e dos restantes compostos da mesma série, abordou-se este passo reacional tendo por base um método semelhante ao descrito por Anderson *et al.* (Esquema 11, via a azul).⁵⁸ Neste método, procede-se à prévia ativação da cloroacridina com fenol, na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) anidro, Cs₂CO₃ e filtros moleculares de 3 Å, durante 2 h e a 100°C; só depois se adiciona a amina, deixando-se reagir por mais 3 h. Segundo os autores, estas condições de pré-ativação permitem evitar a formação concorrente de acridonas, tendo-se reações de S_NAr mais limpas e de maior rendimento. Efetivamente, a aplicação deste método à síntese de **9** permitiu verificar, por CCF, que o passo de S_NAr se apresentava mais limpo, pelo que se avançou de imediato para o passo de condensação com o ácido *p*-metoxicinâmico, ativado *in situ* com TBTU, como anteriormente descrito.⁵⁰



Esquema 11: Método de síntese anteriormente utilizado para síntese de derivados 9-[N-(N-cinamoil)-aminobutil]aminoacridina⁵⁰ e método já descrito por Anderson *et al.* (via azul).⁵⁸

Ainda que se tenha logrado obter o composto-alvo, como se pode verificar pelo pico-base observado na análise do produto por ESI-IT MS (a m/z 426,40, compatível com o íão quasi-molecular de **9**, ver Figura 16), o rendimento global desta síntese foi igualmente muito baixo (2,2%). Assim, optou-se por tentar otimizar também o passo de condensação, substituindo-se o TBTU pelo PyAOP, conhecido pela sua elevada eficácia.⁵⁹ No entanto, tal proporcionou apenas um aumento de 3% no rendimento global de síntese.

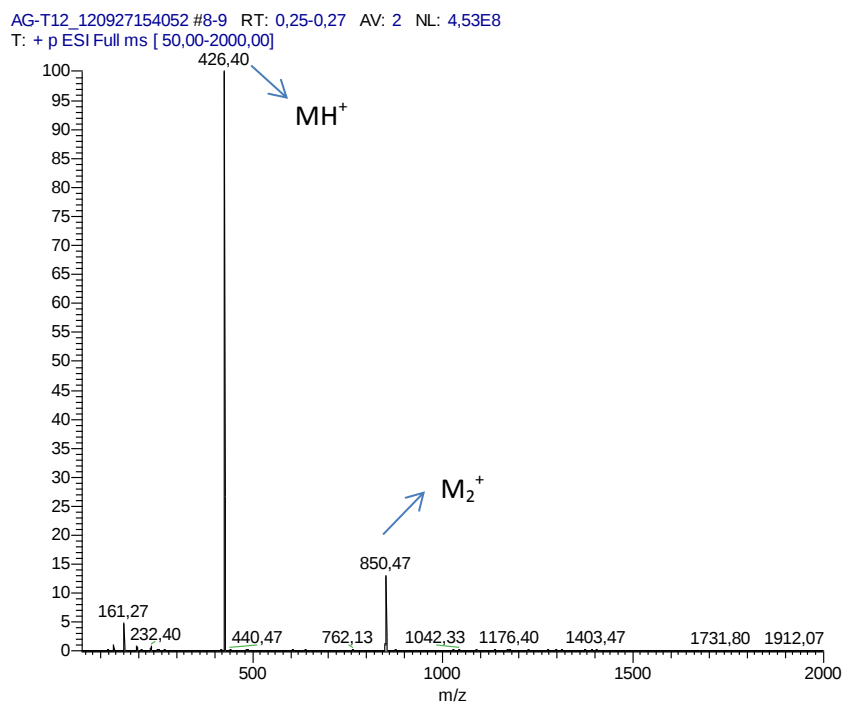
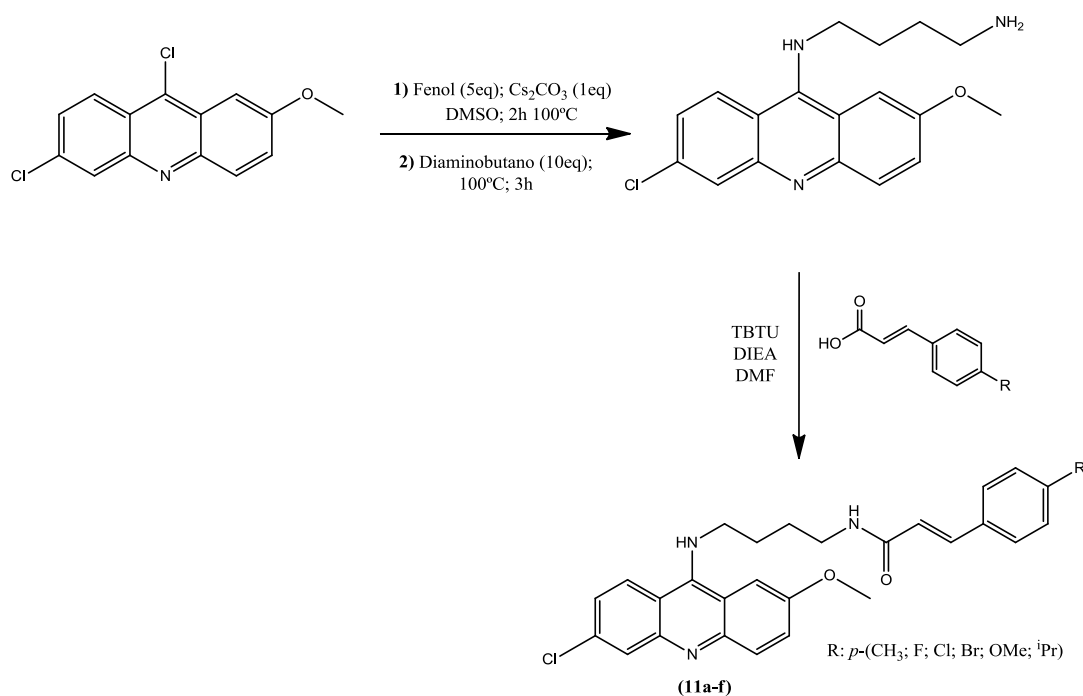


Fig. 16: Espectro de ESI-IT MS (modo positivo) da 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (**9**).

Perante estes resultados, decidiu-se avançar para a síntese dos compostos **11a-f**, optando-se por adotar o método de Anderson *et al.* no passo de S_NAr, pelo facto de proporcionar uma reação mais limpa, e por manter o uso do TBTU como agente de ativação dos ácidos cinâmicos no passo de condensação, em virtude daquele agente ser substancialmente mais barato que o PyAOP.

3.2.2. Síntese dos novos análogos de quinacrina (**11a-f**)

A síntese dos análogos de QCR **11a-f** foi realizada de forma semelhante à anteriormente descrita para as 9-[N-(N-cinamoíl)aminobutil]aminoacridinas,⁵⁰ começando-se por realizar uma reação de S_NAr entre a 6,9-dicloro-2-metoxiacridina e a butano-1,4-diamina, optando-se pelo método de Anderson *et al.*, já referido no ponto anterior. O produto da S_NAr (a 9-(N-aminobutil)amino-6-cloro-2-metoxiacridina, **14**) foi usado de imediato, sem purificação, no passo subsequente de condensação com o ácido cinâmico adequado (Esquema 12). De uma forma geral, os produtos-alvo foram obtidos e isolados com elevados graus de pureza, sendo o rendimento global das sínteses superior ao anteriormente registado para as 9-[N-(N-cinamoíl)aminobutil]aminoacridinas análogas (Tabela 3). A análise estrutural dos compostos por ESI-IT MS e RMN permitiu identificá-los como se tratando dos produtos-alvo, de acordo com os dados espectroscópicos apresentados em detalhe na Parte Experimental.



Esquema 12: Esquema geral de síntese dos análogos da quinacrina (**11a-f**).

Tabela 3: Dados gerais da síntese dos compostos **11a-f**.

Produto-alvos	MM (g.mol ⁻¹)	Rendimento %	Massa final obtida (mg)	%Pureza*	P.f (°C)	Aspeto
11a	473,99	16,7%	45,4	94,11	79-87	
11b	477,96	26,7%	44,9	97,04	84-87	
11c	494,41	24,9%	88,6	98,42	79-84	Sólido
11d	538,86	38,8%	127,1	98,43	77-86	Laranja
11e	489,99	37,4%	79,6	95,95	79-83	
11f	502,05	38,4%	99,1	97,48	87-95	

* Determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com gradiente de eluição entre 10 e 70% de acetonitrilo (ACN) em água, ao longo de 25 minutos; fluxo de 1mL.min⁻¹ e detecção a 260 nm.

A título de exemplo, apresenta-se a caracterização estrutural da 9-{*N*-[*N*-(*p*-isopropil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11f**), que se obteve com um rendimento global de 38,4%. O espectro de ESI-IT MS (Figura 17) deste composto apresentou um pico-base a m/z 502,47, compatível com o ião quasi-molecular (MH⁺) de **11f** (cuja massa exata é 501,22 u.m.a.), e um pico de menor intensidade a m/z 1002,33, compatível com o ião molecular de um aduto dimérico (M₂⁺).

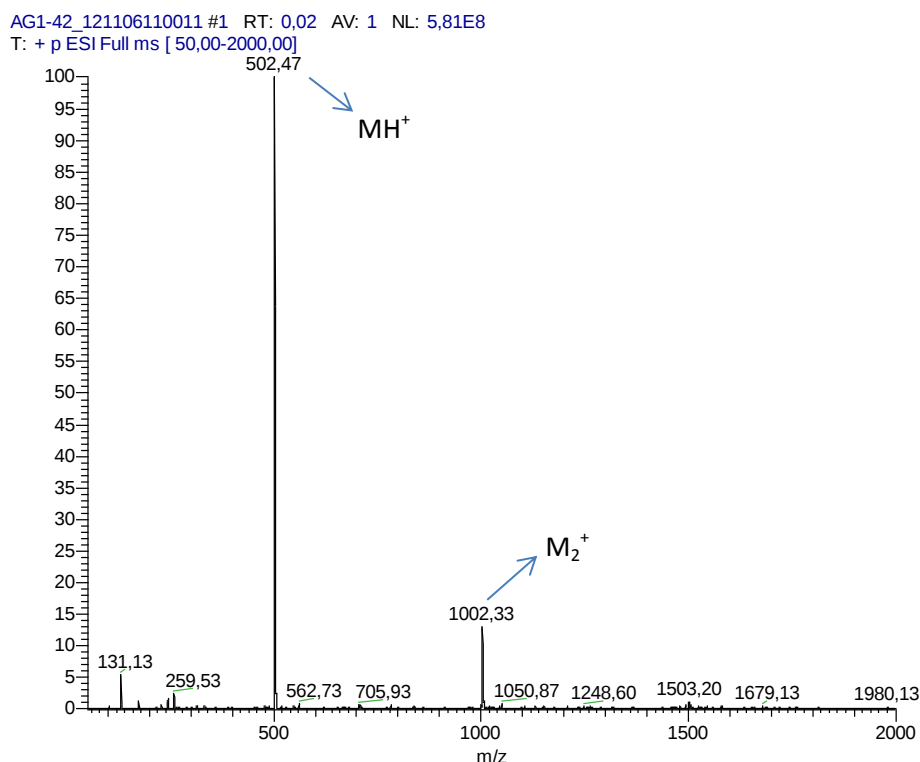


Fig. 17: Espectro de massa (ESI-IT MS, modo positivo) da 9-{*N*-[*N*-(*p*-isopropil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11f**).

No espectro de RMN-¹H (figura 18) do composto **11f**, é possível confirmar a presença: (i) dos prótons do anel acridínico, Ha,b,f,g,i, dos prótons vinílicos Hs,t e dos prótons benzénicos Hv,w, entre 6,459 e 7,986 ppm; (ii) dos prótons metilénicos do espaçador butilo entre a amina e a amida (Ho-Hr); (iii) dos prótons metílicos do substituinte da acridina, Hn, a 3,849 ppm; e (iv) dos prótons Hz e Hx, a 1,221 ppm e 2,854 respetivamente. Também foi possível identificar um singlete largo a 6,694 ppm, que poderia corresponder a um próton amínico ou amídico. As atribuições, multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de RMN-¹H, quer deste composto, quer dos restantes da família, encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

No espectro de carbono RMN-¹³C (Figura 19) verifica-se: (i) o pico correspondente ao carbono da ligação amida (C=O) a 174,397 ppm; (ii) os treze picos devidos aos carbonos do anel acridínico (Ca-Cm), os quatro picos devidos ao anel benzénico (Cu-Cy) e os dois picos correspondentes aos carbonos vinílicos (Cs, Ct), entre 100,692 e 166,683 ppm; (iii) os cinco picos correspondentes aos carbonos metilénicos (Co-Cr, Cx) entre 49,452 e 27,108 ppm (iv) e os dois picos dos carbonos metílicos Cz e Cn a 23,763 e 55,772 ppm respetivamente.

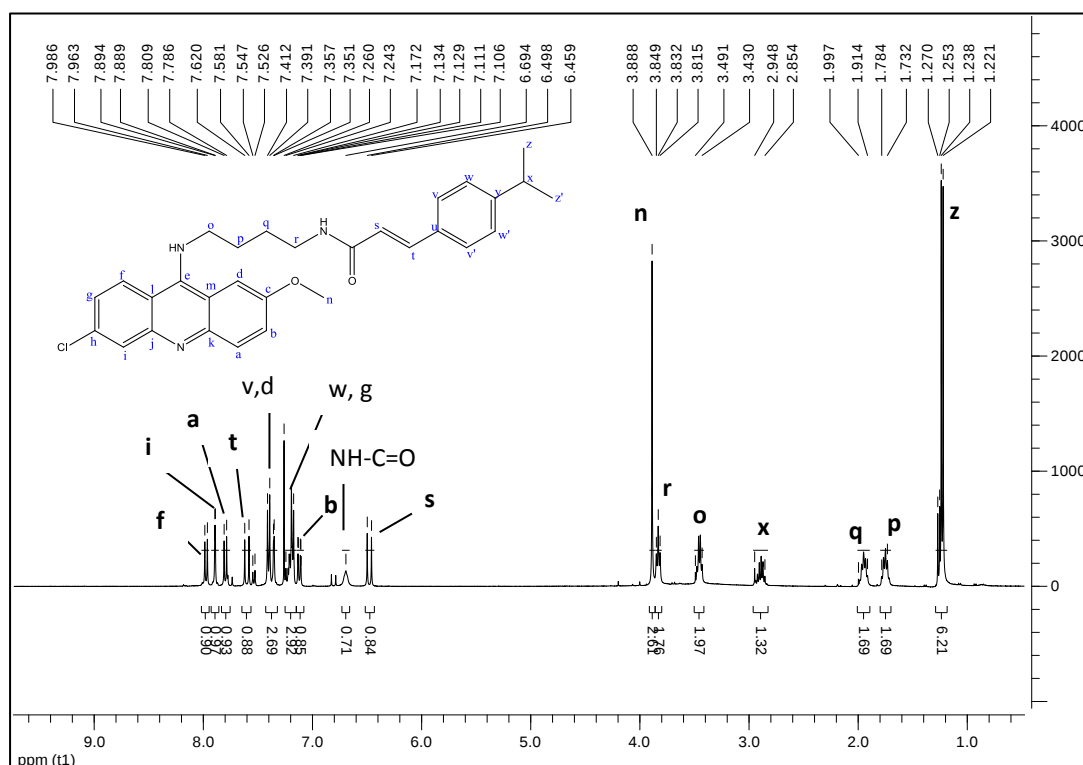


Fig. 18: Espetro RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) da 9-{N-[N-(p-isopropil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11f**).

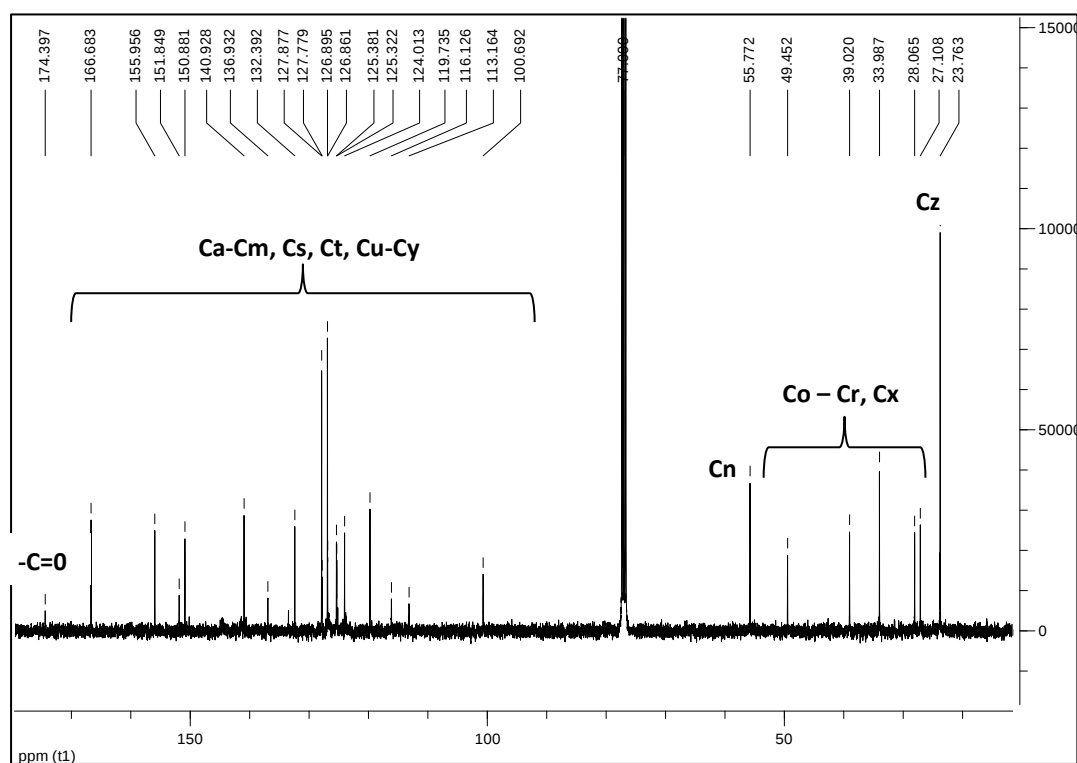


Fig. 19: Espetro RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) da 9-{N-[N-(p-isopropil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11f**).

Com o intuito de se tentar distinguir se o singlete largo, observado a 6,894 ppm no espectro de RMN- ^1H do produto **11f**, pertencia ao próton amínico ou amídico, procedeu-se a uma análise de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância, HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Apresenta-se, na figura 20, uma ampliação da zona do espectro de HMBC onde se observa o singlete largo em correlação com o carbono amídico, demonstrando que o referido singlete se deve ao próton da amida. Portanto, constatou-se que o sinal ausente no espectro de RMN- ^1H de **11f**, e também nos espectros de RMN- ^1H dos restantes compostos **11**, é o do próton amínico.

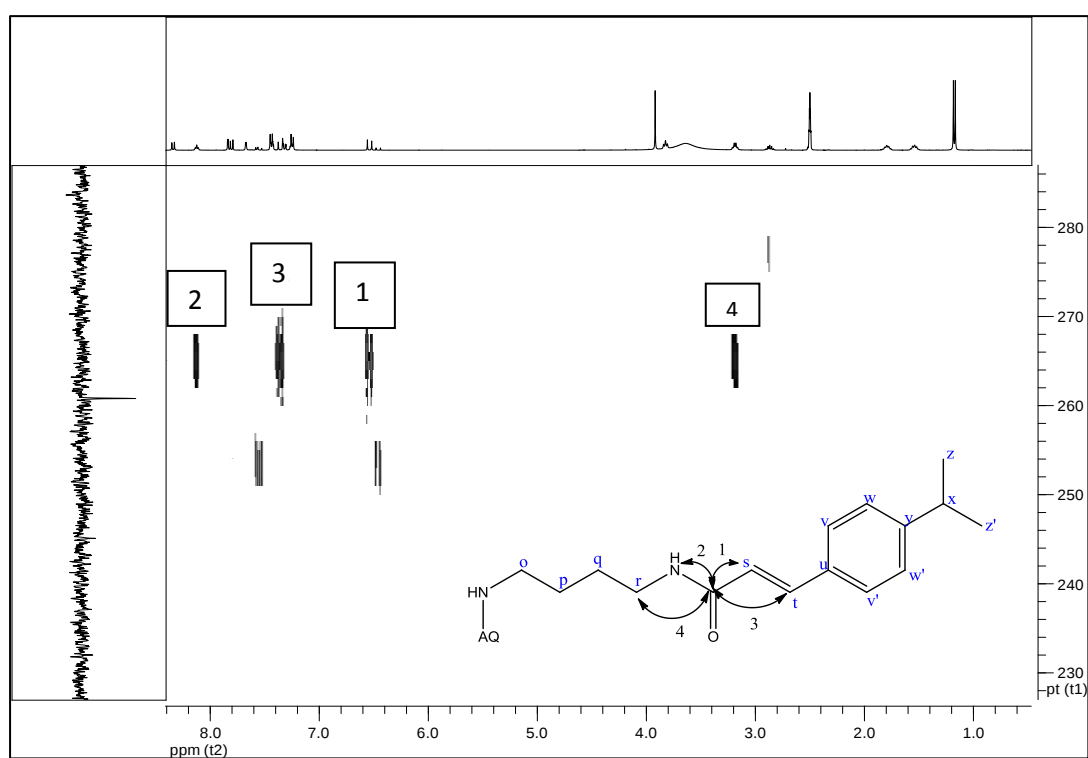
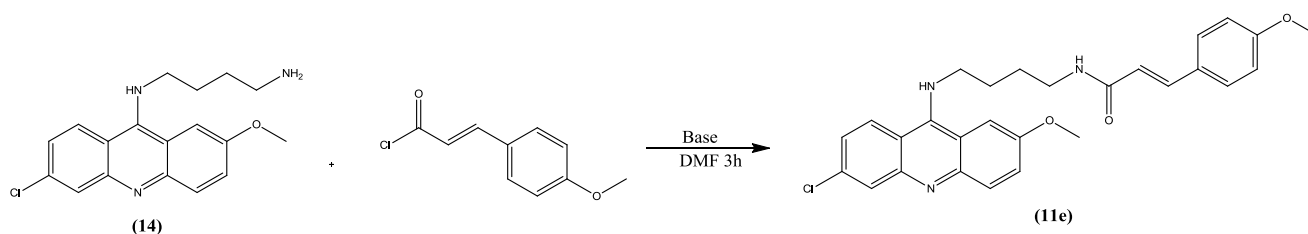


Fig. 20: Espectro de HMBC do composto 9-{N-[N-(*p*-isopropil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11f**).

3.2.3. Tentativa de otimização da síntese dos análogos de quinacrina, por uso de halogenetos de ácido

Foi realizada uma derradeira tentativa de aumentar o rendimento global de síntese dos análogos de QCR **11a-f**, usando-se a síntese do composto **11e** como modelo. Assim, estudou-se se o rendimento global da preparação de **11e** seria aumentado por utilização do cloreto de *p*-metoxicinamoílo no passo de condensação, em vez de recorrer à ativação *in situ* do ácido *p*-metoxicinâmico com TBTU, na presença de DIEA. À semelhança do anteriormente descrito para os análogos de CQ, **10h,i**, foram testadas diferentes condições de reação, essencialmente por variação da base (Esquema 13). De acordo com os dados constantes da Tabela 4, foi possível verificar que: (i) a implementação do método já aplicado aos análogos da CQ (**10h,i**) utilizando carbonato de cézio e solvente DMF não proporcionou o aumento do rendimento de síntese deste derivado; (ii) a alteração da base carbonato de cézio para hidrogenofosfato de sódio não apresentou melhor resultado. Assim, nenhuma das sínteses de **11e** envolvendo a condensação de **14** com cloreto de *p*-metoxicinamoílo conduziu a um rendimento maior que o anteriormente obtido por ativação *in situ* do ácido *p*-metoxicinâmico.



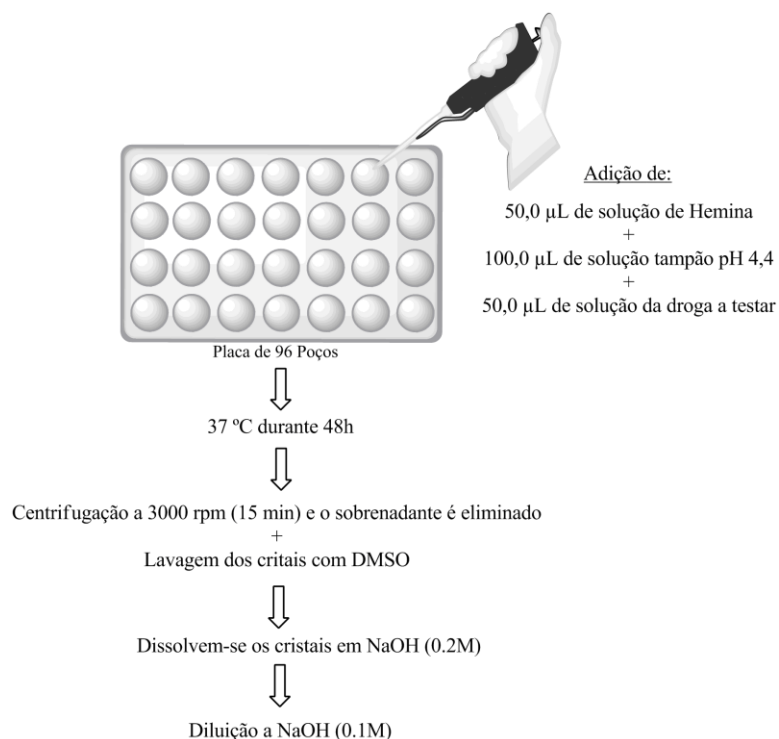
Esquema 13: Síntese do composto **11e** por condensação de **14** com cloreto de *p*-metoxicinamoílo, em DMF, usando diferentes bases.

Tabela 4: Dados gerais sobre as diferentes abordagens à síntese do composto **11e**.

Produto-alvo	Solvente	Base	Rendimento	Aspetto
11e	DMF	Na ₂ HPO ₄ (2,5 eq)	14,8%	Sólido
		Cs ₂ CO ₃ (2,5 eq)	19,6%	laranja

3.3. Testes de inibição de formação de hemozoína *in vitro*

Os compostos sintetizados no âmbito deste trabalho foram avaliados *in vitro* quanto à sua capacidade de inibir a formação da hemozoína, dada a sua analogia estrutural com fármacos antimaláricos conhecidos por (CQ), ou suspeitos de (QCR), possuir tal capacidade. O teste foi realizado de acordo com uma metodologia anteriormente reportada na literatura,^{60, 61} conforme descrito em detalhe na Parte Experimental (secção 5.4; representada no esquema 14) e na qual a percentagem inibitória normalmente exibida pela CQ, fármaco de referência, ronda os 96%. Neste tipo de ensaio, consideram-se ativos compostos com taxas de inibição iguais ou superiores a 50%, sendo obviamente mais ativos aqueles que mais se aproximem de uma taxa de inibição de 100%. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 5; como se pode verificar, nenhum dos compostos tem poder inibitório comparável ao do fármaco de referência (CQ), havendo apenas quatro análogos da CQ e dois análogos da QCR capazes de inibir parcialmente a formação de hemozoína, com taxas que rondam os 50%. No que diz respeito aos análogos da CQ, apenas se mostraram modestamente ativos os que possuíam um grupo alcanoílo, parecendo haver uma correlação entre a taxa inibitória exibida e a ramificação desse grupo. Não foi possível extrair qualquer correlação entre estrutura e atividade para os dois únicos análogos da QCR que exibiram alguma atividade.



Esquema 14: Metodologia de testes de inibição de formação de hemozoína.

Tabela 5: Resultados do teste de inibição de formação de hemozoína.

Composto	Taxa de inibição (%)
10a	57%
10b	44%
10c	47%
10d	53%
10e	-
10f	-
10g	-
10h	-
10i	-
11a	50%
11b	-
11c	-
11d	-
11e	45%
11f	-
CQ	97%

É de salientar que o teste *in vitro* realizado envolve várias operações técnicas cuja execução tem que ser extremamente cuidada e o mais similar possível entre ensaios, sendo a qualidade dos resultados e respetiva reprodutibilidade altamente dependentes da experiência do operador. Estas limitações foram já detetadas por outros grupos de investigação,^{62, 63} e levam a que devamos olhar para os resultados obtidos com alguma precaução. No entanto, os cuidados tomados, bem como a inclusão, em todas as placas de ensaio, de controlos negativos (DMSO, água e solução tampão) e o controlo positivo (fármaco de referência, CQ) permitiram determinar as taxas inibitórias registadas com razoável segurança.

A dificuldade em estabelecer um método analítico rápido e fiável para a avaliação *in vitro* de potenciais inibidores da formação de hemozoína tem levado vários autores a explorar novas metodologias.⁶² Por exemplo, Coy e seus colaboradores demonstraram que o processo de cristalização da hematina é favorecido pela presença de substâncias lipofílicas no VD do parasita, e esse facto levou à proposta de metodologias otimizadas com base no uso de detergentes como o Tween 80.⁶⁴ Recentemente, foi proposto o uso de um detergente não iónico, o NP-40, que revelou ter um papel importante no processo de biocristalização da hemozoína *in vitro*.⁶⁵ Neste método, as condições *in vitro* parecem melhor mimetizar as condições de formação de hemozoína *in vivo*, dentro do VD, e poderá vir a ser alvo de interesse para a re-avaliação dos compostos sintetizados no âmbito deste trabalho, e de outros que se venham a produzir no grupo de investigação.

Independentemente do método *in vitro* utilizado ter ou não grande rigor, é indiscutível o facto destes compostos não inibirem, ou inibirem apenas modestamente, a formação de hemozoína. Portanto, a comprovar-se que exibam atividades antimaláricas significativas, será necessário averiguar mecanismos de ação alternativos.

Capítulo 4

Conclusão e Perspetivas de Futuro

4. Conclusão e Perspetivas de Futuro

Pode-se dizer que os objetivos do trabalho proposto, no âmbito desta Dissertação, foram plenamente atingidos. Todos os compostos-alvo foram obtidos com sucesso, sendo isolados com elevados graus de pureza e caracterizados através de técnicas correntes de análise orgânica estrutural (ESI-IT MS e RMN). Os rendimentos foram, de uma forma geral, modestos a razoáveis, logrando-se melhorar pontualmente algum deles, após algum esforço de otimização das condições reacionais.

Todos os novos compostos foram avaliados *in vitro* como potenciais inibidores de formação de hemozoína, revelando-se, no entanto, pouco promissores sob esse ponto de vista. Apenas quatro análogos alcanólio da CQ apresentaram alguma atividade, que parece de alguma forma relacionada com a presença de ramificação no grupo alcanólio. No caso dos análogos da QCR, apenas dois revelaram alguma capacidade inibitória, ainda que modesta, não sendo possível extrair nenhuma correlação estrutura-atividade.

A futura evolução deste projeto poderá, eventualmente, passar pela re-avaliação dos compostos através de outras metodologias de análise da capacidade de inibição de formação de hemozoína *in vitro*, dado que o método utilizado tem vindo a revelar-se pouco reprodutível e altamente dependente da experiência do operador. Para além disso, dependendo da atividade antimalárica revelada por estes compostos – atualmente em avaliação em grupos de investigação parceiros – poder-se-á justificar:

- (a) a investigação de mecanismos alternativos de ação antimalárica, caso esta seja promissora; neste caso, também se justificará o avanço para a avaliação pré-clínica (propriedades farmacocinéticas) dos compostos mais ativos;
- (b) a conceção de outras modificações estruturais centradas nos núcleos heterocíclicos da CQ e da QCR, com vista à produção de novos análogos eventualmente mais potentes que os atuais, caso as atividades antimaláricas destes se revelem modestas; ou com vista à melhoria do perfil farmacocinético dos compostos atuais, caso sejam muito ativos mas apresentem uma farmacocinética inadequada (ver alínea anterior).

Capítulo 5

Procedimiento Experimental

5. Procedimento experimental

5.1. Reagentes e equipamentos utilizados

Os reagentes e solventes utilizados no âmbito deste trabalho foram adquiridos na Sigma-Aldrich (4,7-dicloroquinolina, 6,9-dicloro-2-metoxiacridina, 9-cloroacridina e ácidos carboxílicos não aromáticos), na Acros Organics (ácidos cinâmicos), na VWR International (solventes da marca Merck, de qualidade *p.a.*, *HPLC gradient grade*, ou *LC-MS grade*, conforme a aplicação) ou na CortecNet (solventes deuterados).

No decorrer do trabalho, utilizou-se a CCF para avaliar a evolução da reação ou mesmo a homogeneidade cromatográfica do produto final. Para o efeito, utilizaram-se placas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da Merck (VWR International), sendo os cromatogramas revelados por irradiação com luz ultra-violeta (254 nm) utilizando uma lâmpada Viber Lourmat (CN-6). Adicionalmente, as placas foram sujeitas a um método de revelação química, baseado na pulverização com uma solução de dicarboxidina, após exposição a atmosfera de cloro, o que permitiu identificar compostos contendo grupos amino ou amida.

Na purificação de cada produto-alvo, após uma primeira etapa de extração líquido-líquido sobre a mistura reacional, realizou-se uma cromatografia líquida em coluna de gel de sílica 60 A (partículas de 35-70 µm), da SDS. As colunas foram preparadas usando-se suspensões do gel de sílica no eluente a utilizar. Os diferentes eluentes utilizados, quer na purificação, quer em CCF, apresentam-se devidamente identificados em cada caso.

As análises de ESI-IT MS foram realizadas sobre soluções dos produtos puros em metanol (*LC-MS grade*), num equipamento Finnigan Surveyor LCQ DECA XP MAX, no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

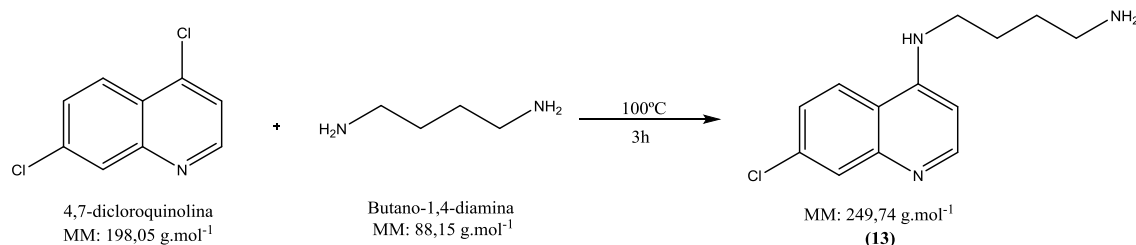
Os espectros de RMN foram adquiridos de soluções de composto puro em diferentes solventes deuterados, contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, num espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz existente no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

A pureza dos compostos foi avaliada por HPLC, num equipamento Merck-Hitachi LaChrom Elite dotado de bomba quaternária, injetor automático termostaticado por efeito Peltier e detetor de díodos. Usou-se uma coluna de fase reversa (octadecilsilano) Purospher star RP-C18 de 125 × 4.0 mm e 5 µm (diâmetro de partícula). Foi realizada uma eluição gradiente de 10 a 70% de ACN em água milipore contendo 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). A eluição decorreu a um fluxo de 1 mL/min e a deteção foi realizada a 260 nm. As amostras foram preparadas em acetonitrilo, sendo necessário adicionar algumas gotas de dimetilsulfóxido (DMSO) em alguns casos, para completa solubilização do composto.

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados num equipamento de marca Stuart Scientific SMP1.

5.2. Síntese dos análogos da cloroquina

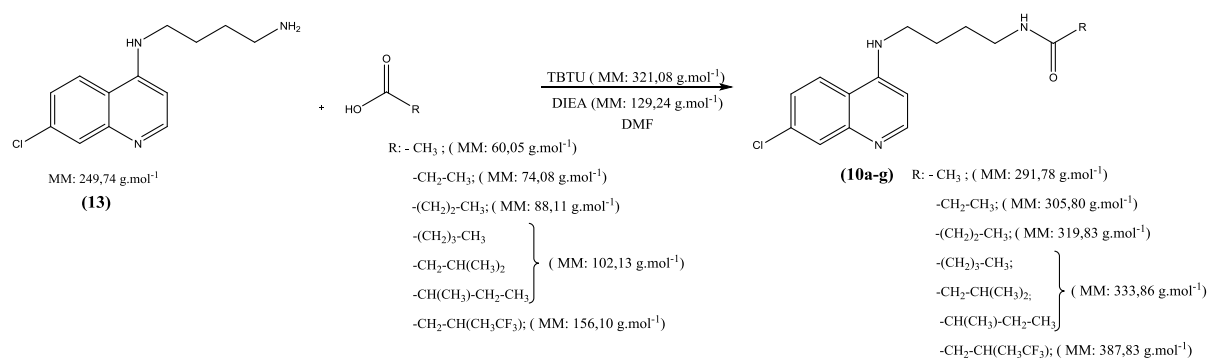
5.2.1. Síntese da 4-(*N*-aminobutil)amino-7-cloroquinolina (**13**)



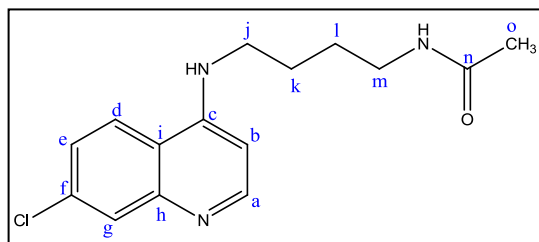
Num balão de fundo redondo colocaram-se a reagir 10,0 equivalentes molares (eq) de butano-1,4-diamina (2,225 g; 25,24 mmol) com 1,0 eq de 4,7-dicloroquinolina (0,500 g; 2,52 mmol) deixando-se sob refluxo durante 3 h. Em seguida, após se arrefecer a mistura reacional à temperatura ambiente, diluiu-se com 25 mL de DCM e lavou-se com uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 5% (três vezes). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, e após filtração por gravidade, foi levada à secura em evaporador rotativo a pressão reduzida. O resíduo sólido obtido apresentou-se cromatograficamente homogêneo (numa mancha na linha de base que se revela na dicarboxidina) e com dados espectrais (ESI-IT MS e RMN) concordantes com o anteriormente descrito por Pérez *et al.*⁴²

5.2.2. Síntese dos compostos **10a-i**

Síntese dos compostos **10a-g**



A síntese dos compostos **10a-g** iniciou-se pela ativação do ácido carboxílico relevante, colocando 1,1 eq deste a reagir com 2,0 eq de DIEA (136,5 µL; 0,80 mmol) e 1,1 eq de TBTU (0,128 g; 0,44 mmol), em 1,0 mL de DMF, durante 10 minutos. De seguida, adicionou-se à mistura anterior 1,0 eq de 4-(*N*-aminobutyl)amino-7-cloroquinolina (0,100 g; 0,40 mmol) dissolvida em 1,0 mL de DMF, e deixou-se a reação a decorrer durante um dia, à temperatura ambiente. Finda a reação, a mistura foi dissolvida em 25 mL de DCM e submetida a três lavagens com 25 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, e após filtração por gravidade, foi levada à secar em evaporador rotativo a pressão reduzida. O resíduo sólido não se apresentou cromatograficamente homogêneo (eluente DCM:MeOH (8:2 v/v)), pelo que se procedeu à sua purificação por cromatografia líquida em coluna de gel de sílica, usando DCM:MeOH (8:2 v/v) como eluente. Cada produto **10a-g** foi isolado como um sólido branco, e subseqüentemente caracterizado por ESI-IT MS, NMR-¹H, NMR-¹³C, e HPLC, sendo também medido o respetivo ponto de fusão. Os dados espectrais e analíticos obtidos para cada composto apresentam-se em seguida.

4-[*N*-(*N*-etanoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10a)

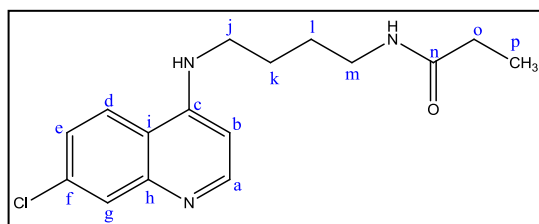
Sólido branco (22,4 mg; 18,9%); R_f (DCM: MeOH 8:2 (v/v)) 0,35; p.f. [168 °C -176 °C]

δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1,50 (m, 2H, Hk); 1,65 (m, 2H, Hl); 1,79 (s, 3H, Ho); 3,08 (m, 2H, Hj); 3,29 (m, 2H, Hm); 6,51 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,50 (dd, $J=2,4$ Hz; $J=9,0$ Hz; 1H, He); 7,54 (sl, 1H, -NH-Q); 7,80 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hg); 7,84 (sl, 1H, -NH-C=O); 8,32 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hd); 8,40 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 22,5; 25,1; 26,7; 38,1; 42,1 (Cj - Cm, Co); 96,5; 117,1; 124,2; 124,2; 126,5; 133,7; 147,8; 150,5; 150,8 (Ca - Ci); 168,9 (Cn).

$C_{15}H_{18}ClN_3O$: 291,11 u.m.a; m/z (MH^+) 292,40

HPLC-DAD; t_R = 8,600 min (%área= 92,74%)

4-[*N*-(*N*-propanoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10b)

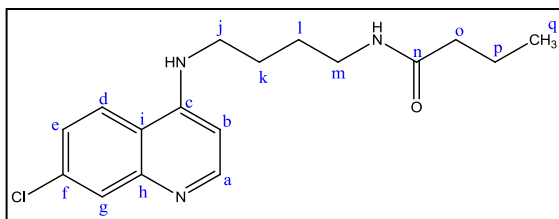
Sólido branco (52,3 mg; 42,2%); R_f (DCM: MeOH 8:2 (v/v)) 0,41; p.f. [175°C -184°C]

δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0,97 (t, $J=7,2$ Hz; 3H, Hp); 1,50 (m, 2H, Hk); 1,64 (m, 2H, Hl); 2,04 (q, $J=7,6$ Hz; 2H, Ho); 3,08 (m, 2H, Hj); 3,29 (m, 2H, Hm); 6,50 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,46 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,0$ Hz; 1H, He); 7,55 (sl, 1H, -NH-Q); 7,75 (sl, 1H, -NH-C=O); 7,78 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hg); 8,29 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hd); 8,39 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 9,9; 25,1; 26,8; 26,5; 36,0; 42,1 (Cj -Cm, Co, Cp); 98,6; 117,1; 124,2; 124,2; 126,4; 133,8; 147,8; 150,6; 150,8 (Ca -Ci); 172,8 (Cn).

$C_{16}H_{20}ClN_3O$: 305,13 u.m.a; m/z (MH^+) 306,13; m/z (M_2^+) 610,80

HPLC-DAD; t_R = 9,180 min (% área= 94,92%)

4-[*N*-(*N*-butanoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10c)

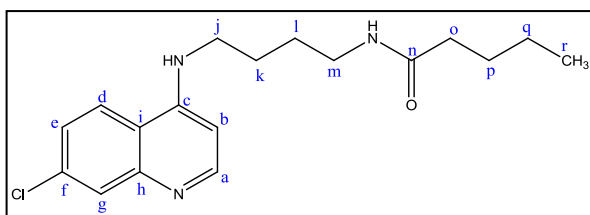
Sólido branco (73,6 mg; 54,1%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,5; p.f [174°C -181°C]

δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 0,82 (t, $J=7,2$ Hz; 3H, Hq); 1,49 (m, 4H, Hk, Hl); 1,64 (m, 2H, Hp); 2,02 (t, $J=7,6$ Hz; 2H, Ho); 3,09 (m, 2H, Hj); 3,29 (m, 2H, Hm); 6,50 (d, $J=5,6$ Hz, 1H, Hb); 7,46 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,0$ Hz; 1H, He); 7,53 (sl, 1H, -NH-Q); 7,77 (sl, 1H, -NH-C=O); 7,79 (d, $J=2,0$ Hz; 1H, Hg); 8,31 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hd); 8,39 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 13,5; 18,6; 25,1; 26,8; 37,3; 37,9; 42,1 (Cj-Cm, Co-Cq); 98,5; 117,2; 124,1; 124,2; 126,5; 133,7; 148,0; 150,5; 150,9 (Ca-Ci); 171,7 (Cn).

$C_{17}H_{22}ClN_3O$: 319,15 u.m.a; m/z (MH^+) 320,47; m/z (M_2^+) 638,60

HPLC-DAD; $t_R=10,273$ min (% área= 94,51%)

4-[*N*-(*N*-pentanoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10d)

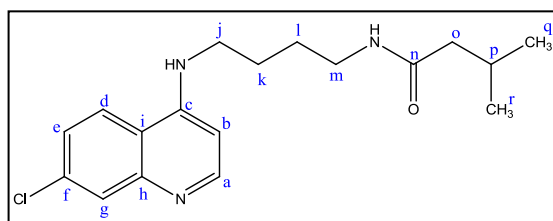
Sólido branco (87,7 mg; 57,1%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,57; p.f [158 °C - 165 °C]

δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0,90 (t, $J=7,2$ Hz; 3H, Hr); 1,34 (m, 2H, Hq); 1,64 (m, 4H, Hk, Hl); 1,79 (m, 2H, Hp); 2,19 (t, $J=7,6$ Hz; 2H, Ho); 3,35 (m, 4H, Hj, Hm); 5,91 (sl, 1H, -NH-Q); 6,01 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,36 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,33 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, He); 7,92 (m, 2H, Hd, Hg); 8,45 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 13,8; 22,4; 25,2; 27,9; 28,1; 36,5; 38,8; 43,2 (Cj-Cm, Co-Cr); 98,8; 117,2; 122,0; 125,4; 127,8; 135,2; 148,3; 150,4; 151,1 (Ca-Ci); 173,8 (Cn).

$C_{18}H_{24}ClN_3O$: 333,16 u.m.a; m/z (MH^+): 334,47; m/z (M_2^+) 666,67

HPLC-DAD; $t_R=11,580$ min (%área= 96,81%)

4-[N-(N-isobutylcarbonil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10e)

Sólido branco (112,4 mg; 83,3%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,49; p.f [146 °C -154 °C]

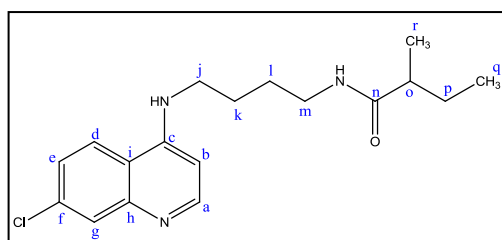
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0,95 (d, $J=6,4$ Hz; 6H, Hq, Hr); 1,68 (m, 2H, Hk); 1,80 (m, 2H, Hl);

2,06 (m, 2H, Ho); 2,13 (m, 1H, Hp); 3,36 (m, 4H, Hj, Hm); 5,87 (sl, 1H, -NH-Q); 6,17 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,36 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,32 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,0$ Hz; 1H, He); 7,93 (m, 2H, Hg, Hd); 8,43 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 22,5; 25,2; 26,2; 28,2; 38,5; 38,8; 43,2; 46,1 (Cj-Cm, Co-Cr); 98,7; 117,1; 122,1; 125,5; 127,4; 135,4; 147,8; 150,6; 150,7 (Ca - Ci); 173,2 (Cn).

$C_{18}H_{24}ClN_3O$: 333,16 u.m.a; m/z (MH^+) 334,47; m/z (M_2^+) 666,73

HPLC-DAD; t_R = 11,293 min (% área= 94,23%)

4-[N-(N-sec-butilcarbonil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10f)

Sólido branco (96,0 mg; 68,5%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,59; p.f [160°C -167°C]

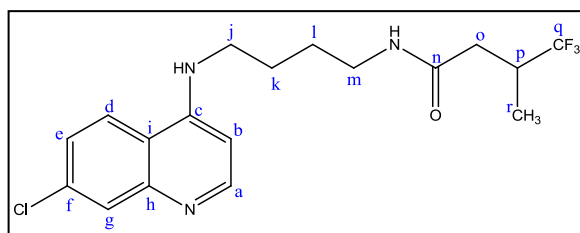
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 0,90 (t, $J=7,2$ Hz; 3H, Hq); 1,14 (d, $J=6,8$ Hz; 3H, Hr); 1,60 (m, 6H, Hk, Hl, Hp); 2,13 (m, 1H, Ho); 3,36 (m, 4H, Hj, Hm); 5,87

(sl, 1H, -NH-Q); 6,15 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,37 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,33 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,0$ Hz; 1H, He); 7,95 (m, 2H, Hd, Hg); 8,45 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 12,0; 17,6; 25,1; 27,3; 28,2; 38,7; 43,1; 43,2 (Cj -Cm, Co - Cr); 98,7; 117,2; 122,1; 125,4; 127,6; 135,3; 148,1; 150,5; 150,8 (Ca -Ci); 177,2 (Cn).

$C_{18}H_{24}ClN_3O$: 333,16 u.m.a; m/z (MH^+) 334,47; m/z (M_2^+) 666,60

HPLC-DAD; t_R = 11,027 min (%área= 93,21%)

4-[N-(N-3-trifluorobutanoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10g)

Sólido branco (21,7 mg; 55,5%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,47; p.f [156°C-160°C]

δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,15 (d, $J=6,8$ Hz; 3H, Hr); 1,68 (m, 2H, Hk); 1,80 (m, 2H,

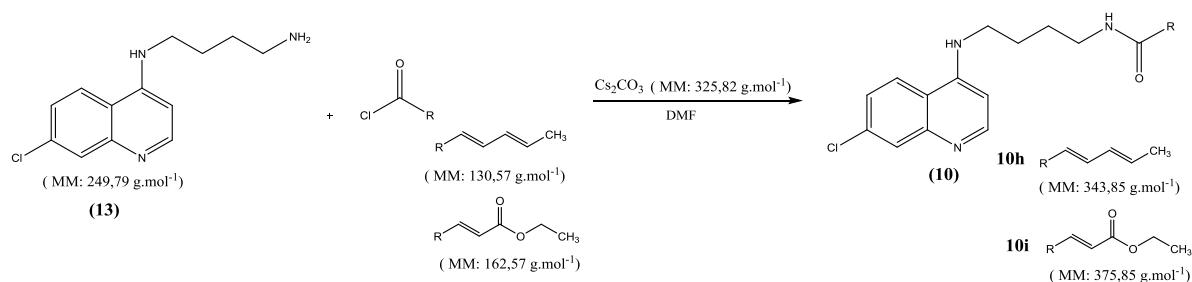
HI); 2,14 (m, 1H, Ho); 2,55 (m, 1H, Ho); 2,88 (m, 1H, Hp); 3,36 (m, 4H, Hj, Hm); 6,21 (sl, 2H, -NH-Q; -NH-C=O); 6,36 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Hb); 7,32 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=8,8$ Hz; 1H, He); 7,91 (d, $J=2,0$ Hz; 1H, Hg); 7,96 (d, $J=8,8$ Hz; 1H, Hd); 8,44 (d, $J=5,6$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 13,1; 25,2; 27,8; 35,4; 36,7; 39,1; 43,2 (Cj-Cm, Co, Cp, Cr); 98,7; 116,9; 122,2; 125,6; 126,6; 129,3; 135,7; 147,1; 149,9; 151,0 (Ca – Ci, Cq); 170,2 (Cn).

$C_{18}H_{21}ClF_3N_3O$: 387,13 u.m.a; m/z (MH^+) 388,47

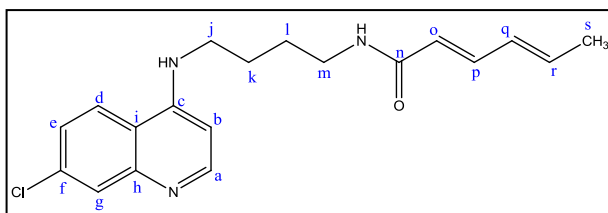
HPLC-DAD; t_R = 12,573 min (% área= 97,21%)

Síntese dos compostos 10h,i



Como já descrito no Capítulo 3 (Resultados e Discussão), as condições de síntese destes dois compostos foram alvo de otimização, especialmente no que se refere ao par solvente/base. No presente capítulo, optou-se por descrever apenas as condições reacionais que conduziram ao melhor rendimento.

Num balão de fundo redondo foram colocados 1,0 eq de 4-(*N*-aminobutyl)amino-7-cloroquinolina (0,100 g; 0,40 mmol), 2,5 eq carbonato de cézio (0,326 g; 1,00 mmol) e 1,1 eq de cloreto de ácido relevante, em 2,0 mL de DMF. Após 3 horas de reação, verificou-se a formação de um precipitado que, por CCF, se verificou não corresponder ao produto principal, pelo que se eliminou por filtração sob pressão reduzida. O filtrado foi diluído em 25 mL de DCM e lavado três vezes com 25 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, e após filtração por gravidade, foi levada à secura em evaporador rotativo a pressão reduzida. O resíduo sólido obtido não se encontrava cromatograficamente homogêneo, pelo que se procedeu ao isolamento do produto principal por cromatografia líquida em coluna de gel de sílica, usando DCM:MeOH 8:2 (v/v) como eluente. Cada um dos produtos, **10h,i**, foi assim isolado como um sólido branco, que se caracterizou por ESI-IT MS, NMR-¹H, NMR-¹³C, HPLC e medição do respetivo ponto de fusão. Os dados espectrais e analíticos obtidos são apresentados de seguida.

4-[N-(N-hexa-2,4-dienoil)aminobutil]amino-7-cloroquinolina (10h)

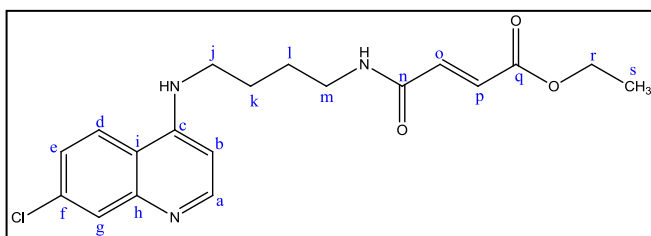
Sólido branco (79,0 mg; 57,2%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,62; p.f [165°C - 171°C]

δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1,54 (m, 2H, Hk); 1,66 (m, 2H, Hl); 1,78 (d, $J=6,4$ Hz; 3H, Hs); 3,24 (m, 4H, Hj, Hm); 5,88 (d, $J=14,8$ Hz; 1H, Ho); 6,11 (m, 2H, Hq, Hr); 6,48 (d, $J=5,2$ Hz; 1H, Hb); 6,98 (m, 1H, Hp); 7,41 (sl, 1H, -NH-Q); 7,44 (dd, $J=2,4$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, He); 7,78 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hg); 7,93 (sl, 1H, -NH-C=O); 8,28 (d, $J=8,8$ Hz; 1H, Hd); 8,38 (d, $J=5,2$ Hz; 1H, Ha).

δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 18,1; 25,1; 26,8; 38,1; 42,0 (Cj -Cm, Cs); 98,6; 117,2; 122,9; 124,0; 124,1; 126,9; 129,8; 133,5; 136,3; 138,9; 148,4; 150,2; 151,3 (Ca -Ci, Co-Cr); 166,2 (Cn).

$C_{19}H_{22}ClN_3O$: 343,15 u.m.a; m/z (MH^+) 344,40; m/z (M_2^+) 686,60

HPLC-DAD; t_R = 12,233 min (%área = 100,0%)

4-{N-[N-(3-etoxicarbonil)propenoil]aminobutil}amino-7-cloroquinolina (10i)

Sólido branco (17,2 mg; 11,0%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,53; p.f [189°C -193°C]

δ_H (400 MHz; DMSO- d_6) 1,23 (t, $J=7,2$ Hz; 3H, Hs); 1,57 (m, 2H, Hk); 1,70 (m, 2H, Hl); 3,22 (m, 4H, Hj, Hm); 4,17 (q, $J=7,2$ Hz; 2H, Hr); 6,54 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Hp); 6,81 (d, $J=6,8$ Hz; 1H, Hb); 7,98 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ho); 7,70 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, He); 7,96 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hg); 8,49 (d, $J=6,8$ Hz; 1H, Ha); 8,55 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hd); 8,62 (sl, 1H, -NH-Q); 9,07 (sl, 1H, -NH-C=O).

δ_C (100 MHz; DMSO- d_6) 14,0; 25,0; 26,2; 38,4; 42,6; 60,6 (Cj -Cm, Cr, Cs); 98,6; 115,7; 120,6; 125,3; 126,2; 128,2; 137,0; 137,5; 140,5; 144,5; 154,3 (Ca -Ci, Co, Cp); 162,8, 165,0 (Cn, Cq).

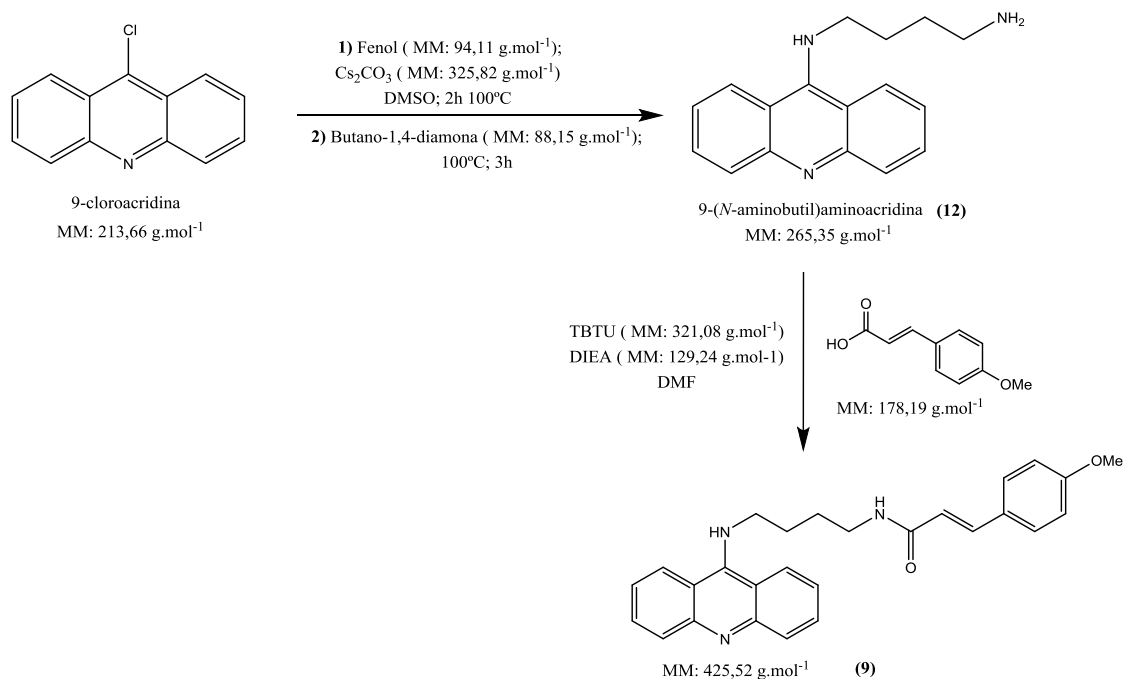
$C_{19}H_{22}ClN_3O_3$: 375,13 u.m.a; m/z (MH^+) 376,40

HPLC-DAD; t_R = 11,107 min (%área = 95,89%)

5.3. Síntese dos análogos de quinacrina

Havendo necessidade de tentar otimizar o rendimento da síntese dos derivados de acridina anteriormente descritos por Pérez *et al.*⁵⁰ como já descrito no Capítulo 3 (Resultados e Discussão), optou-se por aplicar o método de pré-ativação da cloroacridina com fenol, reportado por Anderson *et al.*⁵⁸ Ainda que os rendimentos obtidos por aplicação deste método não tenham sido substancialmente superiores aos anteriormente referido, a reação de S_NAr apresentou-se consideravelmente mais “limpa” (CCF), pelo que se optou por aqui descrever este método alternativo de preparação da 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoí]aminobutil}aminoacridina, **9**, e que foi posteriormente adotado na síntese dos restantes análogos de quinacrina (secção 5.3.2).

5.3.1. Síntese da 9-{N-[N-(*p*-metoxi)cinamoí]aminobutil}aminoacridina (**9**)

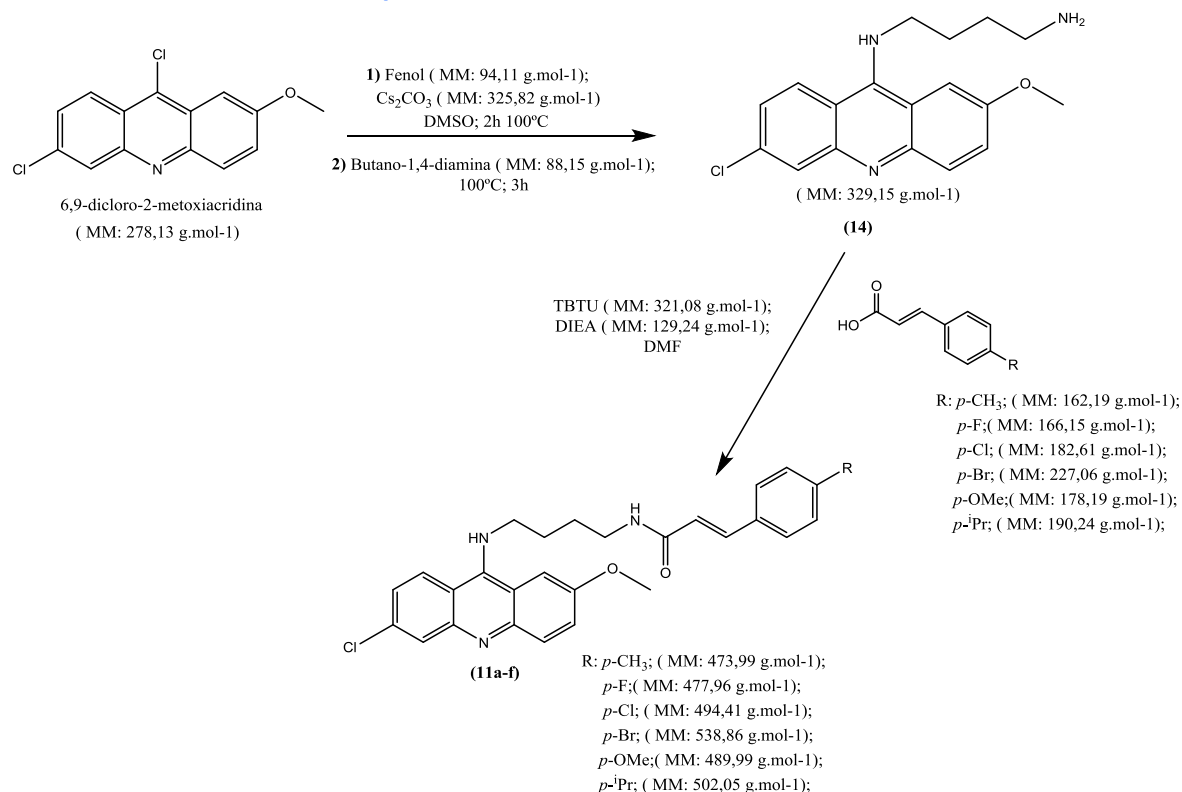


A síntese da 9-{*N*-[*N*-(*p*-metoxi)cinamoíl]aminobutil}aminoacridina (**9**) iniciou-se com a ativação de 1,0 eq de 9-cloroacridina (0,100 g; 0,47 mmol) na presença de 5,0 eq de fenol (0,220 g; 2,34 mmol) e de 1,0 eq de carbonato de cézio (0,152 g; 0,47 mmol), em 2,0 mL de DMSO seco, na presença de filtros moleculares de 3 Å e tubo de secagem com cloreto de cálcio no condensador, durante 2h a 100°C. Findo este período, adicionaram-se à mistura reacional 10,0 eq de butano-1,4-diamina (0,412 g; 4,68 mmol) e deixou-se reagir à mesma temperatura durante 3 h.

Quando terminou a reação, deixou-se a mistura arrefecer à temperatura ambiente e procedeu-se à sua diluição com 25 mL de DCM. Lavou-se a mistura três vezes com solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%, secando-se depois a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. Após filtração por gravidade, evaporou-se o filtrado à secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se 9-(*N*-aminobutil)aminoacridina (**12**) com homogeneidade cromatográfica suficiente para se avançar para o passo sintético seguinte (condensação com o ácido *p*-metoxicinâmico).

Solubilizou-se 1,1 eq de ácido *p*-metoxicinâmico (0,069 g; 0,39 mmol) em 1,0 mL de DMF, e adicionou-se 1,1 eq de TBTU (0,125 g; 0,39 mmol) ou PyAOP (0,203 g; 0,39 mmol), e 2,0 eq de DIEA (123,4 µL; 0,71 mmol), deixando-se a reagir sob agitação em banho de gelo, durante 10 min. Após este período de ativação, adicionou-se 1,0 eq. de 9-(*N*-aminobutil)aminoacridina (0,094 g; 0,35 mmol) dissolvida em 1,0 mL de DMF, e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante um dia. Finda a reação, diluiu-se a mistura reacional com 25 mL de DCM e lavou-se três vezes com solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%, secando-se depois a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. Após filtração por gravidade, o filtrado foi levado à secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida. O resíduo obtido apresentou-se cromatograficamente heterogêneo, pelo que se procedeu à sua purificação por cromatografia líquida em coluna de gel de sílica, usando o eluente DCM:MeOH 8:2 (v/v). O produto final foi, assim, isolado como um sólido laranja, apresentando dados espectrais de acordo com o esperado.

5.3.2. Síntese dos compostos 11a-f

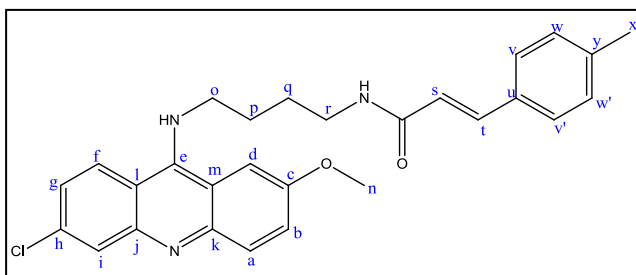


De modo análogo ao descrito na seção anterior, a síntese da 9-(*N*-aminobutil)amino-6-cloro-2-metoxiacridina iniciou-se com a ativação de 1,0 eq de 6,9-dicloro-2-metoxiacridina (0,200 g; 0,72 mmol) com 5,0 eq de fenol (0,338 g; 5,59 mmol) e 1,0 eq de carbonato de cério (0,234 g; 0,72 mmol), em 2,0 mL de DMSO seco, na presença de filtros moleculares de 3 Å e tubo de secagem com cloreto de cálcio no condensador, durante 2 h a 100°C. Findo este período, adicionaram-se à mistura reacional 10,0 eq de butano-1,4-diamina (0,634 g; 7,20 mmol) e deixou-se a reagir à mesma temperatura durante 3 h. Finda a reação, deixou-se a mistura arrefecer à temperatura ambiente e diluiu-se com 25 mL de DCM. A mistura foi então lavada três vezes com solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%, secando-se depois a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. Após filtração por gravidade, levou-se o filtrado à secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se o produto desejado (14) com homogeneidade cromatográfica adequada para o seu uso imediato na síntese dos compostos 11a-f, confirmando-se apenas a identidade do composto 14 por ESI-IT MS.

C₁₈H₂₀ClN₃O: 329,13 u.m.a; ^{m/z} (MH⁺) 330,33;

A síntese dos compostos **11a-f** foi levada a cabo por condensação da 9-(*N*-aminobutil)amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**14**) com diferentes ácidos cinâmicos. Assim, começou-se pela ativação de 1,1 eq do ácido cinâmico relevante (0,37 mmol) na presença de 1,1 eq de TBTU (0,118 g; 0,37 mmol) e 2,0 eq de DIEA (116,2 μ L; 0,66 mmol) em 1,0 mL de DMF, durante 10 min sob agitação e em banho de gelo. Após este período, adicionou-se 1,0 eq de 9-(*N*-aminobutil)amino-6-cloro-2-metoxiacridina (0,110 g; 0,33 mmol) dissolvida em 1,0 mL de DMF, e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante um dia. Finda esta reação, diluiu-se a mistura reacional em 25 mL de DCM e lavou-se três vezes com solução aquosa de Na₂CO₃ a 5%. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e, após remoção da fase sólida por filtração por gravidade, levou-se o filtrado à secagem em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Verificando-se que o resíduo assim obtido não estava cromatograficamente homogêneo, procedeu-se à sua purificação por cromatografia líquida em coluna de gel de sílica, usando o eluente DCM:MeOH 8:2 (v/v). Os produtos-alvo foram assim obtidos como sólidos cor-de-laranja, que foram caracterizados por ESI-IT MS, RMN-¹H, RMN-¹³C, HPLC e medição dos respectivos pontos de fusão. Os dados espectrais e analíticos obtidos encontram-se abaixo descritos.

9-{*N*-[*N*-(*p*-metil)cinamoil]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (**11a**)



Sólido laranja (45,4 mg; 16,7%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,64; p.f [79°C-87°C]

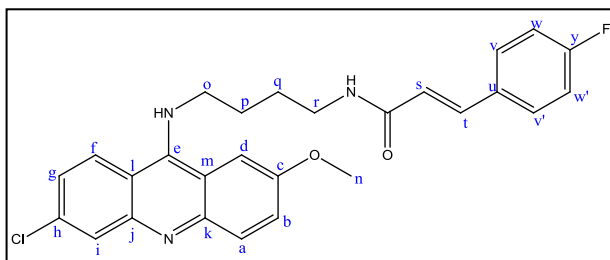
δ_H (400 MHz; CDCl₃) 1,73 (m, 2H, Hp); 1,89 (m, 2H, Hq); 2,35 (s, 3H, Hx); 3,44 (m, 2H, Ho); 3,79 (m, 2H, Hr);

3,92 (s, 3H, Hn); 6,37 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,41 (d, J=15,6 Hz; 1H, Hs); 7,14 (m, 3H, Hw, Hb); 7,30 (m, 2H, Hg, Hd); 7,40 (d, J=8,0 Hz; 2H, Hv); 7,59 (d, J=15,6 Hz; 1H, Ht); 7,80 (d, J=9,2 Hz; 1H, Ha); 7,95 (d, J=2,0 Hz; 1H, Hi); 7,99 (d, J=9,2 Hz; 1H, Hf).

δ_C (100 MHz; CDCl₃) 21,4; 27,2; 28,3; 39,0; 49,7; 55,7 (Co - Cr, Cx, Cn); 100,0; 114,4; 116,9; 119,5; 124,2; 124,9; 125,1; 125,5; 127,7; 127,8; 128,5; 129,5; 132,0; 136,1; 140,0; 141,1; 146,1; 151,0; 156,0 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 166,6 (-C=O).

C₂₈H₂₈ClN₃O₂: 473,19 u.m.a; ^{m/z} (MH⁺) 474,87; ^{m/z} (M₂⁺) 946,93

HPLC-DAD: t_R= 16,507 min (%área= 94,11%)

9-{N-[N-(p-fluoro)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11b)

Sólido laranja (44,9 mg; 26,7%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,68; p.f [84°C-87°C]

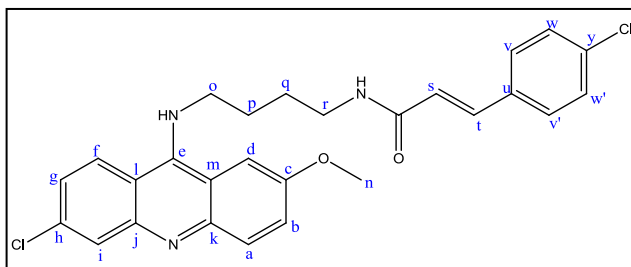
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,76 (m, 2H, Hp); 1,96 (m, 2H, Hq); 3,46 (m, 2H, Ho); 3,84 (m, 2H, Hr); 3,92 (s, 3H, Hn); 6,45 (d,

$J=15,6$ Hz; 1H, Hs); 6,65 (sl, 1H, -NH-C=O); 7,01 (m, 2H, Hw); 7,16 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, Hb); 7,25 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hd); 7,35 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hg); 7,45 (m, 2H, Hv); 7,58 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ht); 7,87 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Ha); 7,95 (d, $J=2,0$ Hz; 1H, Hi); 8,00 (d, $J=9,6$ Hz; 1H, Hf).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 27,1; 28,0; 39,0; 49,7; 55,8 (Co – Cr, Cn); 100,5; 113,6; 115,8; 116,0; 116,5; 120,4; 124,2; 124,4; 125,2; 125,3; 129,5; 129,6; 131,0; 136,7; 139,7; 151,6; 156,1; 162,2; 164,7 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 166,3 (-C=O).

$C_{27}H_{25}ClFN_3O_2$: 477,16 u.m.a; m/z (MH^+) 478,40; m/z (M_2^+) 954,47

HPLC-DAD: t_R = 15,880 min (%área= 97,04%)

9-{N-[N-(p-cloro)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11c)

Sólido laranja (88,6 mg; 24,9%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,61; p.f [79°C-84°C]

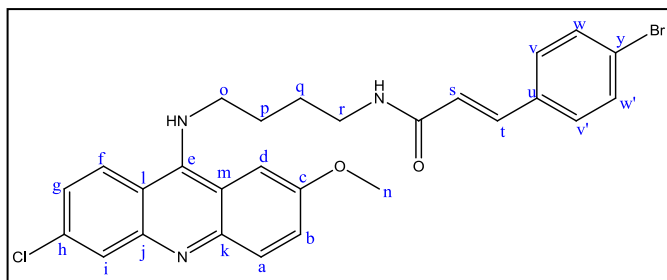
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,72 (m, 2H, Hp); 1,85 (m, 2H, Hq); 3,43 (m, 2H, Ho); 3,75 (m, 2H, Hr); 3,93 (s, 3H, Hn);

6,35 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,40 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Hs); 7,20 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,4$ Hz; 1H, Hb); 7,26 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hd); 7,31 (m, 3H, Hg, Hw); 7,37 (m, 2H, Hv); 7,55 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ht); 7,90 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Ha); 7,95 (m, 2H, Hf, Hi).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 27,2; 28,4; 39,1; 49,9; 55,7 (Co – Cr, Cn); 99,8; 114,8; 117,3; 121,1; 124,3; 124,6; 124,9; 126,3; 126,3; 128,9; 129,0; 129,4; 133,2; 135,5; 135,7; 139,7; 146,8; 150,5; 156,1 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 166,0 (-C=O).

$C_{27}H_{25}Cl_2N_3O_2$: 493,13 u.m.a; m/z (MH^+) 494,53

HPLC-DAD: t_R = 16,720 min (%área= 98,42%)

9-{N-[N-(p-bromo)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11d)

Sólido laranja (127,1 mg; 38,8%);

R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,70; p.f

[77°C-86°C]

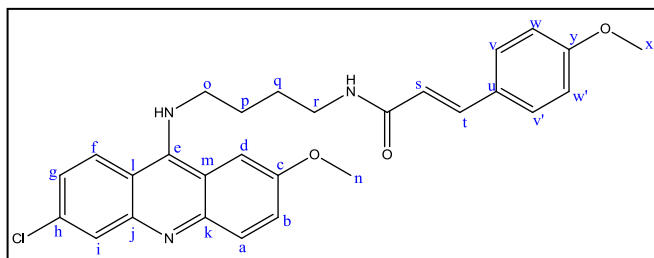
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,72 (m, 2H, Hp); 1,86 (m, 2H, Hq); 3,44 (m, 2H, Ho); 3,76 (m, 2H, Hr); 3,92 (s, 3H, Hn);

6,33 (sl, 1H, -NH-C=O); 6,40 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Hs); 7,19 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,6$ Hz; 1H, Hb); 7,25 (d, $J=2,8$ Hz; 1H, Hd); 7,31 (m, 3H, Hg, Hw); 7,45 (m, 2H, Hv); 7,53 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ht); 7,91 (d, $J=9,6$ Hz; 1H, Ha); 7,98 (m, 2H, Hf, Hi).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 27,2; 28,4; 39,1; 49,9; 55,7 (Co – Cr, Cn); 99,7; 115,0; 117,4; 121,2; 123,8; 124,3; 124,6; 124,8; 126,5; 129,2; 129,7; 132,0; 133,6; 135,5; 139,8; 144,8; 147,0; 150,4; 156,1 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 166,0 (-C=O).

$C_{27}H_{25}BrClN_3O_2$: 537,08 u.m.a; m/z (MH^+) 540,27

HPLC-DAD: t_R = 16,947 min (%área= 98,43%)

9-{N-[N-(p-metoxi)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11e)

Sólido laranja (79.6 mg; 37,4%); R_f

(DCM: MeOH (8:2)) 0,59; p.f

[79°C-83°C]

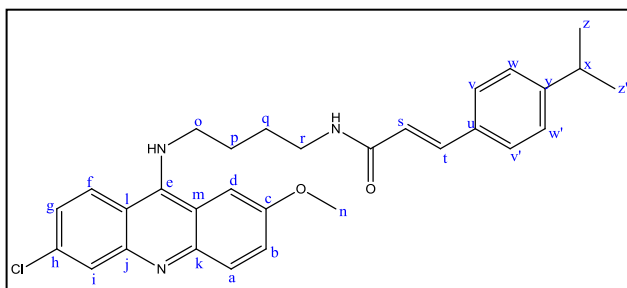
δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,76 (m, 2H, Hp); 1,98 (m, 2H, Hq); 3,46 (m, 2H, Ho); 3,80 (s, 3H, Hx); 3,85 (m, 2H, Hr);

3,91 (s, 3H, Hn); 6,42 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Hs); 6,72 (sl, 1H, -NH-C=O); 7,19 (m, 2H, Hw); 7,13 (dd, $J=2,4$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, Hb); 7,20 (dd, $J=2,4$ Hz; $J=9,4$ Hz; 1H, Hg); 7,40 (m, 3H, Hd, Hv); 7,56 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ht); 7,80 (d, $J=9,2$, 1H, Ha); 7,89 (d, $J=2,0$ Hz; 1H, Hi); 7,99 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hf).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 27,2; 28,4; 39,1; 49,9; 55,3; 55,9 (Co – Cr, Cx, Cn); 100,9; 112,9; 114,2; 115,9; 118,4; 123,3; 124,0; 125,4; 125,5; 126,2; 127,5; 129,2; 129,3; 137,2; 140,5; 144,1; 152,1; 156,0; 160,9 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 166,9 (-C=O).

$C_{28}H_{28}ClN_3O_3$: 489,18 u.m.a; m/z (MH^+) 490,47; m/z (M_2^+) 978,53

HPLC-DAD: t_R = 15,61 min (%área= 95,95%)

9-{N-[N-(*p*-isopropil)cinamoíl]aminobutil}amino-6-cloro-2-metoxiacridina (11f)

Sólido laranja (99,1 mg; 38,4%); R_f (DCM: MeOH (8:2)) 0,67; p.f [87°C-95°C]

δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,25 (d, $J=6,8$ Hz; 6H, Hz); 1,76 (m, 2H, Hp); 1,96 (m, 2H, Hq); 2,90 (m, 1H, Hx); 3,46 (m, 2H, Ho);

3,83 (m, 2H, Hr); 3,89 (s, 3H, Hn); 6,48 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Hs); 6,70 (sl, 1H, -NH-C=O); 7,12 (dd, $J=2,0$ Hz; $J=9,2$ Hz; 1H, Hb); 7,21 (m, 3H, Hw, Hg); 7,35 (d, $J=2,4$ Hz; 1H, Hd); 7,40 (d, $J=8,4$ Hz; 2H, Hv); 7,57 (d, $J=15,6$ Hz; 1H, Ht); 7,80 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Ha); 7,89 (d, $J=2,0$ Hz; 1H, Hi); 7,97 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, Hf).

δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 23,8; 27,1; 28,0; 34,0; 39,0; 49,5; 55,8 (Co - Cr, Cx, Cz, Cn); 100,7; 113,2; 116,1; 119,7; 124,0; 125,3; 125,4; 126,8; 126,9; 127,8; 127,9; 132,4; 133,4; 137,0; 140,9; 150,9; 151,9; 156,0; 166,7 (Ca-Cm, Cs, Ct, Cu-Cy); 174,4 (-C=O).

$C_{30}H_{32}ClN_3O_2$: 501,22 u.m.a; m/z (MH^+) 502,47; m/z (M_2^+) 1002,33

HPLC-DAD: t_R = 18,067min (%área= 97,48%)

5.4. Teste de inibição de formação de hemozoína

A metodologia utilizada para avaliação de inibição de formação da hemozoína está descrita na literatura.^{60, 61}

Numa placa de teste com 96 poços, a cada um deles é adicionado : (i) 50,0 μL de solução de cloreto de Hemina ($5,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ em DMSO); (ii) 100,0 μL de solução tampão de acetato (0,2 M) a pH 4,4 e (iii) 50,0 μL de solução do potencial fármaco a testar. Para cada concentração da droga (1,0 mM; 0,5 mM e 0,1 mM) o teste é realizado em triplicado; adicionalmente em cada placa existe o fármaco de referência (CQ), para controle, às mesmas concentrações das restantes drogas a testar. Depois de preparadas, as placas são colocadas numa estufa durante 48h a uma temperatura constante de 37°C. Findo este período as placas são centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e após ser retirado o sobrenadante são adicionados 200,0 μL de DMSO em cada poço, com objetivo de lavar, voltando a placa a ser centrifugada, repetindo-se este processo quatro vezes. No final da lavagem são adicionados 200,0 μL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2 mM de forma a dissolver o cristal (hemozoína), sendo posteriormente diluído noutra placa com uma solução de 0,1mM de NaOH. Nesta etapa as placas estão preparadas para ser registada a absorvância de cada poço a 405 nm num leitor de placas específico Biotek Powerwave XS utilizando o programa Gen5.

Referências Bibliográficas

1. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564403/en/index.html> (WHO, acessado a 22-12-2012).
2. <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html> (CDC, acessado a 22-12-12).
3. Gallup, J. L.; Sachs, J. D., *Am J Trop Med Hyg* **2001**, 64, 85-96.
4. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/malaria_report_20111213/en/index.html (WHO, acessado a 26-12-12).
5. Chaturvedi, D.; Goswami, A.; Pratim Saikia, P.; Barua, N. C.; Rao, P. G., *Chem Soc Rev* **2010**, 39, 435-454.
6. O'Brien, C.; Henrich, P. P.; Passi, N.; Fidock, D. A., *Curr Opin Infect Dis* **2011**, 24, 570-577.
7. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en> (WHO, acessado a 26-12-12).
8. Chwartz, L.; Brown, G. V.; Genton, B.; Moorthy, V. S., *Malaria J* **2012**, 11.
9. Wilairatana, P.; Krudsood, S.; Tangpukdee, N., *Se Asian J Trop Med* **2010**, 41, 19-21.
10. Marchand, R. P.; Culleton, R.; Maeno, Y.; Quang, N. T.; Nakazawa, S., *Emerg Infect Dis* **2011**, 17, 1232-1239.
11. Gomes, P. *Química*, **2011**, 121, 39-47.
12. White, N. J., *J Clin Invest* **2004**, 113, 1084-1092.
13. Vaughan, A. M.; Mikolajczak, S. A.; Wilson, E. M.; Grompe, M.; Kaushansky, A.; Camargo, N.; Bial, J.; Ploss, A.; Kappe, S. H. I., *The Journal of Clinical Investigation* **2012**, 122, 3618-3628.
14. Mota, M. M.; Pradel, G.; Vanderberg, J. P.; Hafalla, J. C. R.; Frevert, U.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V.; Rodríguez, A., *Science* **2001**, 291, 141-144.
15. Cox, F., *Parasites & Vectors* **2010**, 3-5.
16. Rodrigues, T.; Prudencio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F., *J Med Chem* **2012**, 55, 995-1012.
17. Teixeira, C.; R.B. Gomes, J.; Gomes, P., *Current Medicinal Chemistry* **2011**, 18, 1555-1572.
18. Teixeira, C.; Gomes, J. R.; Couesnon, T.; Gomes, P., *Journal of computer-aided molecular design* **2011**, 25, 763-75.
19. Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U., *Life Sciences* **2007**, 80, 813-828.
20. Hempelmann, E., *Parasitol Res* **2007**, 100, 671-676.
21. Egan, T. J., *TARGETS* **2003**, 2, 115-124.

22. Weissbuch, I.; Leiserowitz, L., *Chem Rev* **2008**, *108*, 4899-4914.
23. Klonis, N.; Dilanian, R.; Hanssen, E.; Darmanin, C.; Streltsov, V.; Deed, S.; Quiney, H.; Tilley, *Biochemistry-US* **2010**, 6804-6811.
24. Kumar, S.; Bandyopadhyay, U., *Toxicology Letters* **2005**, *157*, 175-188.
25. Achan, J.; Talisuna, A. O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J. K.; Baliraine, F. N.; Rosenthal, P. J.; D'Alessandro, U., *Malaria J* **2011**, *1-12*.
26. Papakrivov, J.; Sa, J. M.; Wellems, T. E., *PloS one* **2012**, *7*, e39569.
27. Yayon, A.; Cabantchik, Z. I.; Ginsburg, H., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82*, 2784-2788.
28. Vippagunta, S. R.; Dorn, A.; Matile, H.; Bhattacharjee, A. K.; Karle, J. M.; Ellis, W. Y.; Ridley, R. G.; Vennerstrom, J. L., *J Med Chem* **1999**, *42*, 4630-4639.
29. Penna-Coutinho, J.; Cortopassi, W. A.; Oliveira, A. A.; Franca, T. C.; Krettli, A. U., *PloS one* **2011**, *6*, e21237.
30. Aguiar, A. C.; Santos Rde, M.; Figueiredo, F. J.; Cortopassi, W. A.; Pimentel, A. S.; Franca, T. C.; Meneghetti, M. R.; Krettli, A. U., *PloS one* **2012**, *7*, e37259.
31. Portela, C.; Afonso, C. M. M.; Pinto, M. M. M.; João Ramos, M., *Bioorgan Med Chem* **2004**, *12*, 3313-3321.
32. Ehsanian, R.; Van Waes, C.; Feller, S. M., *Cell Communication and Signaling* **2011**, *9*, 1-18.
33. Guetzoyan, L.; Yu, X. M.; Ramiandrasoa, F.; Pethe, S.; Rogier, C.; Pradines, B.; Cresteil, T.; Perree-Fauvet, M.; Mahy, J. P., *Bioorgan Med Chem* **2009**, *17*, 8032-9.
34. Demeunynck, M.; Charmantray, F.; Martelli, A., *Current pharmaceutical design* **2001**, *7*, 1703-24.
35. Martínez, R.; Chacón-García, L., *Current medicinal chemistry* **2005**, *12*, 127-151.
36. O'Neill, P.; Barton, V.; Ward, S.; Chadwick, J.; Staines, H. M.; Krishna, S., Eds. Springer Basel **2012**, 19-44.
37. O'Brien, C.; Henrich, P. P.; Passi, N.; Fidock, D. A., *Curr Opin Infect Dis* **2011**, *24*, 570-577.
38. Oliaro, P.; Nevill, C.; LeBras, J.; Ringwald, P.; Mussano, P.; Garner, P.; Brasseur, P., *The Lancet* **1996**, *348*, 1196-1201.
39. Casagrande, M.; Barteselli, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Sparatore, A., *Bioorgan Med Chem* **2012**, *20*, 5965-5979.
40. Hocart, S. J.; Liu, H.; Deng, H.; De, D.; Krogstad, F. M.; Krogstad, D. J., *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 2233-44.
41. Pérez, B. C.; Teixeira, C.; Figueiras, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Gomes, P., *Eur J Med Chem* **2012**, *54*, 887-899.

42. Pérez, B.; Teixeira, C.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R.; Gomes, P., *ChemMedChem* **2012**, 7, 1537-40.
43. Pérez, B. C.; Teixeira, C.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R.; Prudencio, M.; Gomes, P., *J Med Chem* **2013**, 56, 556-67.
44. Wainwright, M., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2001**, 47, 1-13.
45. Wang, S.-S.; Lee, Y.-J.; Hsu, S.-C.; Hsieh, C.; Chang, L.-S.; Chou, S.-Y., *Med Chem Res* **2010**, 19, 565-575.
46. Kumar, R.; Kaur, M.; Kumari, M., *Acta Pol Pharm* **2012**, 69, 3-9.
47. Prajapati, S. P.; Kaushik, N. K.; Zaveri, M.; Mohanakrishanan, D.; Kawathekar, N.; Sahal, D., *Arabian Journal of Chemistry* **2013**, em prelo.
48. Guetzoyan, L.; Yu, X. M.; Ramiandrasoa, F.; Pethe, S.; Rogier, C.; Pradines, B.; Cresteil, T.; Perree-Fauvet, M.; Mahy, J. P., *Bioorgan Med Chem* **2009**, 17, 8032-8039.
49. Yu, X. M.; Ramiandrasoa, F.; Guetzoyan, L.; Pradines, B.; Quintino, E.; Gadelle, D.; Forterre, P.; Cresteil, T.; Mahy, J. P.; Pethe, S., *ChemMedChem* **2012**, 7, 587-605.
50. Pérez, B.; Teixeira, C.; Gomes, A. S.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gomes, P., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23, 610-613.
51. Mahmoudi, N.; Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; Farhati, K.; Franetich, J.-F.; Sauerwein, R.; Hannoun, L.; Derouin, F.; Danis, M.; Mazier, D., *Antimicrob Agents Ch* **2008**, 52, 1215-1220.
52. <http://www.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/intro1.htm> (acedido a 9 - 03-13).
53. Charville, H.; Jackson, D. A.; Hodges, G.; Whiting, A.; Wilson, M. R., *Eur J Org Chem* **2011**, 5981-5990.
54. Valeur, E.; Bradley, M., *Chem Soc Rev* **2009**, 38, 606-631.
55. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827-10852.
56. Gooßen, L. J.; Ohlmann, D. M.; Lange, P. P., *Synthesis* **2009**, 160-164.
57. Zhang, L.; Wang, X.-j.; Wang, J.; Grinberg, N.; Krishnamurthy, D.; Senanayake, C. H., *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 2964-2966.
58. Anderson, M. O.; Sherrill, J.; Madrid, P. B.; Liou, A. P.; Weisman, J. L.; DeRisi, J. L.; Guy, R. K., *Bioorgan Med Chem* **2006**, 14, 334-343.
59. Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F., *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 201-203.
60. Barazarte, A.; Lobo, G.; Gamboa, N.; Rodrigues, J. R.; Capparelli, M. V.; Alvarez-Larena, A.; Lopez, S. E.; Charris, J. E., *Eur J Med Chem* **2009**, 44, 1303-1310.
61. Baelmans, R.; Deharo, E.; Munoz, V.; Sauvain, M.; Ginsburg, H., *Exp Parasitol* **2000**, 96, 243-248.

62. Thomas, V.; Gois, A.; Ritts, B.; Burke, P.; Hanscheid, T.; McDonnell, G., *PloS one* **2012**, 7, e41006.
63. Moreira, R., *Comunicação Pessoal*, **2012**.
64. Fitch, C. D.; Cai, G.-z.; Chen, Y.-F.; Shoemaker, J. D., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1999**, 1454, 31-37.
65. Sandlin, R. D.; Carter, M. D.; Lee, P. J.; Auschwitz, J. M.; Leed, S. E.; Johnson, J. D.; Wright, D. W., *Antimicrob Agents Ch* **2011**, 55, 3363-3369.

Anexos

Estruturas químicas dos produtos-alvo

Comunicação (em painel) e artigo

resultantes do trabalho desenvolvido nesta dissertação