UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese de 2,5-Diarilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes
Usadas como Biomarcadores em Malária

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Dr. Hélio Alexandre Stefani

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese de 2,5-Diarilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes
Usadas como Biomarcadores em Malária

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Dr. Hélio Alexandre Stefani

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sousa, Ariane Cavalcante dos Santos
S 725s Síntese de 2 , 5 - diarilfuranos: potenciais sondas fluorescentes usadas como
biomarcadores em malária / Ariane Cavalcante dos Santos Sousa. -- São
Paulo, 2016 .
167 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Stefani, Hélio Alexandre

1 . Insumos farmacêuticos 2 . Corantes fluorescentes 3 . Malária
I . T. II. Stefani, Hélio Alexandre, orientador.

615.19 CDD

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Síntese de 2,5-Diarilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes Usadas
como Biomarcadores em Malária

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Tit. Dr. Hélio Alexandre Stefani
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais Sônia Chaves e Rui Cavalcante, Pela renúncia:
preocupações e noites sem dormir, paciência, empenho;
educação, sabedoria e, sobretudo pelo amor ágape.
Foi o que me fez chegar aqui.
Meus eternos agradecimentos e admiração.
Dedico a vocês esta dissertação.

Ao meu esposo Claudio Amorim pela paciência, compreensão,
suporte, apoio em todos os momentos e amor.

Você é o motivo pelo qual sigo em frente e
continuo lutando.

Esta etapa vencida, está conquista também é sua.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS que me capacitou para chegar até aqui, me dando saúde, sabedoria, perseverança e confiança.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa sob o número de processo 2014/14583-0 para que conseguíssemos executar este trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de fazer parte deste programa de pós-graduação.

Ao professor Hélio A. Stefani pela oportunidade.

A meus irmãos Thiago Otávio Cavalcante, Ariadne Cavalcante e Ariella Chaves que sempre me ajudam com palavras de apoio, amor e carinho.

A minha família, cunhados Ronaldo Raval, Laine Granito; sobrinhos Leonardo Cavalcante, Luis Felipe e o mais recente Otávio Cavalcante, que completam minha vida e reforçam o real valor de tudo: “A família”.

Aos meus amigos, que são raros, mas são os melhores.

A professora Dra. Sandra H. P. Farsky que contribuiu grandemente para este trabalho, cedendo seu laboratório para que muitos experimentos fossem realizados.

Aos alunos do laboratório da professora Dra. Sandra: Carina, Marina, Paula, Leonard, Gustavo, Cintia, e, em especial a Carine e ao Éric que me ensinaram, dispuseram de tempo para me auxiliar. Passaram conhecimento, experiência e me ajudaram muito. Sou muito grata a todos.

A mestrande e colega de laboratório Evelin Fornari pelas trocas de apoio e ideias.

Ao técnico de microscopia confocal do ICB-USP Mario Costa Cruz que me instruiu, deu dicas e auxiliou.

Ao professor Dr. Érick Leite Bastos e suas alunas que cederam o laboratório para as análises de fluorescência.

Ao professor Dr. Daniel Pimenta e seus alunos Hugo Vigerelli e Douglas Mariano que cederam tempo e o laboratório, passando muito conhecimento que contribuíram para meu amadurecimento como pesquisadora e como profissional.

Ao professor Dr. Carsten Wrenger e seus alunos, principalmente a Kamila Meissner que me ajudaram, doando seu tempo e conhecimento.

Enfim, a todos que de algum modo contribuíram para minha caminhada até aqui.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”
Marthin Luther King.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Malária: infecções por protozoários do gênero <i>Plasmodium spp.</i>	23
1.2. Manifestações clínicas	26
1.3. Diagnóstico laboratorial	28
1.4. Tratamentos	30
1.5. Resistência	34
1.6. Síntese: reação de Suzuki-Miyaura	36
1.7. Fluorescência	40
1.8. Biomarcadores	45
2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Materiais	49
3.1.1. Reagentes e solventes	49
3.1.2. Equipamentos	50
3.2. Métodos	52
3.2.1 Síntese geral dos compostos fluorescentes	52
3.2.2. Síntese do 2-(butilteluro)furano (1).	53
3.2.3. Síntese do 2-(4-metoxifenil)furano (2)	54
3.2.4. Síntese do 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3).	55
3.2.5. Síntese do 2-(3-aminofenil)-5-(4-metoxifenil)furano (3-AFA) (4).	56
3.2.6. Proteção do grupo amina do aminoácido <i>L</i> -alanina (5).	57
3.2.7. Síntese do 1-(3-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)fenilamino)-1-oxopropano-2-il-carbamato de <i>tert</i> -butila ou 3-AFA <i>N</i> -Boc-Ala (6).	57
3.2.8. Síntese do (S)-2-amino-N-(3-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)fenil)propanamida (3-AFA ala) (7).	58
3.2.9. Síntese do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8)	59

3.2.10. Síntese do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)benzonitrila (10).	61
3.2.11. Reação do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8a).....	62
3.2.12. Síntese do 2-(4-metoxifenil)-5-(<i>p</i> -toluil)furano (11).....	62
3.2.13. Reação do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8b).....	63
3.2.14. Síntese do composto acoplado a Primaquina: 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)-N-(4-((6-metoxiquinolina-8-il)amino)pentil)benzamidas (4-AFAPQ) (9).....	64
3.2.15. Síntese do composto acoplado a Primaquina: 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)-N-(4-((6-metoxiquinolina-8-il)amino)pentil)benzamidas (4-AFAPQ) (9).....	65
3.3. Obtenção de animais e parasitas para testes biológicos.....	66
3.4. Testes com diferentes tipos celulares	67
3.4.1. Obtenção de macrófagos primários para avaliação da capacidade de penetração da sonda 3-AFA.....	67
3.4.2. Obtenção de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação da capacidade de absorção da sonda 3-AFA.....	68
3.4.3. Obtenção dos eritrócitos: animal e humano	68
3.4.4. Citometria de fluxo: quantificação de células saudáveis/infectadas e expressão de GFP e a sonda 3-AFA e 3-AFA ala.....	70
3.4.5. Microscopia confocal: obtenção de imagens de amostras vivas incubadas com a sonda 3-AFA e 3-AFA ala	71
3.4.6. Microscopia de fluorescência com 3-AFA e 4-AFAPQ: obtenção de imagens de amostras vivas infectadas com <i>P. falciparum</i> 3D7	73
3.4.7. Diagnóstico rápido da malária utilizando os compostos 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ por análise visual com emissão de fluorescência	74
3.4.8. Avaliação da eficácia da atividade parasiticida das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ comparadas a Primaquina através de testes de EC ₅₀ em amostras vivas de <i>P. falciparum</i> 3D7	75
3.4.9. Avaliação da capacidade de penetração das moléculas 3-AFA e 4-AFAPQ em células HepG2	77

3.4.10. Avaliação de citotoxicidade através do EC ₅₀ das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ e Primaquina em HepG2	78
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
4.1. Resultados	81
4.1.1. Síntese orgânica dos compostos fluorescentes 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ	81
4.1.2. Avaliação da capacidade de penetração em macrófagos da linhagem RAW 264.7 do composto 3-AFA	83
4.1.3. Avaliação da capacidade de penetração em macrófagos de células primárias do composto 3-AFA	85
4.1.5. Análises dos resultados por citometria de fluxo da sonda 3-AFA ala em eritrócitos infectados ou não pelo Plasmódio da malária	93
4.1.6. Avaliação da capacidade de penetração em eritrócitos do composto 3-AFA através da obtenção das imagens por microscopia de fluorescência	96
4.1.7. Avaliação da capacidade de penetração do composto 3-AFA ala em eritrócitos infectados por <i>P. berghei</i> GFP através da obtenção das imagens de amostras vivas por microscopia de fluorescência.	98
4.1.8. Avaliação da capacidade de penetração dos compostos 3-AFA e 4-AFAPQ em amostras vivas de eritrócitos infectados pelo <i>P. falciparum</i> 3D7, análise em microscopia de fluorescência	99
4.1.9. Diagnóstico por análise visual com emissão de fluorescência.	101
4.1.10. Avaliação da eficácia da atividade parasiticida através de EC ₅₀ das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ em relação a Primaquina em amostras vivas de <i>P. falciparum</i> 3D7	103
4.1.11. Microscopia de fluorescência dos compostos 3-AFA, 4-AFAPQ e PQ em HepG2	105
4.1.12. Avaliação da citotoxicidade dos compostos fluorescentes sintetizados 3-AFA, 4-AFAPQ e do fármaco PQ através de EC ₅₀ em HepG2.	106
4.2. Discussão	108
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	118

6. REFERÊNCIAS	121
7. DADOS ESPECTROSCÓPICOS	132
7.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	132
7.2. Espectro de Infravermelho (IV)	143
7.3. Dados espectrométricos: Espectro de Massa de alta Resolução	147
ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	154
ANEXO 2 - CURRÍCULO LATTES	155
ANEXO 3 - FICHA DO ALUNO	159
ANEXO 4 - THREE-COMPONENT REACTION FOR THE SYNTHESIS OF DIVERSE β-UNSATURATED α-AMINO ESTERS.....	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave causada pela infecção por <i>P. falciparum</i>	28
Tabela 2: Microscópios utilizados para aquisição de imagens celular	52
Tabela 3: Alteração na estequiometria da reação.....	60
Tabela 4: Alteração na estequiometria, método e solvente da reação.....	64
Tabela 5: Resumo dos resultados de citometria de fluxo com a sonda 3-AFA e 3-AFA ala incubadas em células eritrocíticas	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico da Malária	25
Figura 2: Fases eritrocíticas e alterações fisiológicas, morfológicas da membrana celular	26
Figura 3: Ciclo de vida do parasita da malária e local de ação dos antimaláricos ...	32
Figura 4: Estrutura da Primaquina.....	33
Figura 5: Estruturas químicas dos metabólitos da PQ.....	34
Figura 6: Mapa mundial da resistência a antimaláricos	35
Figura 7: Ciclo catalítico da reação de Suzuki-Miyaura	37
Figura 8: Antivirais	39
Figura 9: Emissão da luz UV ao 2,5-difenilfurano.....	39
Figura 10: Diagrama de Jablonski.....	40
Figura 11: Espectros de excitação e emissão de um composto conhecido (quinino)	41
Figura 12: Estruturas de substâncias fluorescentes	42
Figura 13: Espectro eletromagnético: Visível	43
Figura 14: Esquema dos tubos para análise de citometria de fluxo.....	71
Figura 15: Esquema para microscopia de fluorescência de cultura de <i>P. falciparum</i> 3D7	74
Figura 16: Montagem de placas de cultura de células com 96 poços para medida de EC ₅₀ de 3-AFA e 4-AFAPQ em <i>P. falciparum</i> 3D7	76
Figura 17: Placa de cultura de células com 24 poços de HepG2 com HOECHST 33342 (2 µL), 3-AFA e 4-AFAPQ (10 µM)	78
Figura 18: Rota sintética que não levou ao produto desejado	81
Figura 19: Síntese de intermediários para chegar ao composto 4-AFAPQ.....	82
Figura 20: Síntese do composto 3-AFA ala.....	82
Figura 21: Incubação das células RAW 264.7 em HBSS com a sonda 3-AFA (15 µM)	83
Figura 22: Incubação das células RAW 264.7 em HBSS com a sonda 3-AFA (25 µM)	84

Figura 23: Incubação em RPMI 10 de macrófagos de células primárias com a sonda 3-AFA (15 μ M)	85
Figura 24: Incubação de RPMI 10 de macrófagos de células primárias com a sonda 3-AFA (25 μ M)	86
Figura 25: Populações totais de uma amostra	87
Figura 26: Seleção de <i>gate</i> de uma amostra não infectada.....	88
Figura 27: <i>Gate</i> de uma amostra infectada com <i>P. berghei</i> ANKA GFP	89
Figura 28: <i>Gate</i> de uma amostra infectada com <i>P. berghei</i> ANKA GFP incubada com o veículo DMSO	89
Figura 29: <i>Gate</i> de uma amostra infectada com <i>P. berghei</i> ANKA GFP incubada com a sonda 3-AFA	90
Figura 30: Seleção de <i>gate</i> de uma amostra não infectada incubada com a sonda 3-AFA.....	91
Figura 31: Histograma da Seletividade da sonda 3-AFA em eritrócitos	92
Figura 32: Diferentes concentrações (25 e 100 μ M) da sonda 3-AFA em eritrócitos de camundongo	93
Figura 33: <i>Dot-plot</i> de uma amostra infectada com <i>P. berghei</i> ANKA GFP incubada com a sonda 3-AFA ala e seu veículo	94
Figura 34: Histograma representativo da seletividade da sonda 3-AFA ala.....	95
Figura 35: Eritrócitos Sadios	97
Figura 36: Eritrócitos infectados por <i>P.berghei</i> ANKA GFP	97
Figura 37: Eritrócito infectado com <i>P. berghei</i> ANKA GFP incubado com a sonda 3-AFA.....	98
Figura 38: Eritrócito infectado com <i>P.berghei</i> ANKA GFP incubado com a sonda fluorescente 3-AFA ala.....	99
Figura 39: Eritrócito infectado com <i>P. falciparum</i> 3D7 transfectado com GFP marcado com 3-AFA	100
Figura 40: Eritrócito infectado com <i>P. falciparum</i> 3D7 transfectado com GFP marcado com 4-AFAPQ	101
Figura 41: Amostras com eritrócitos infectados e marcados pelas moléculas sintetizadas 3-AFA e 4-AFAPQ.....	102
Figura 42: EC ₅₀ <i>P. falciparum</i> 3D7 da sonda 3-AFA, 4-AFAPQ e Primaquina	103
Figura 43: HepG2 incubados com HOECHST, 3-AFA e 4-AFAPQ.....	105

Figura 44: EC ₅₀ HepG2 da Primaquina, 4-AFAPQ e 3-AFA	106
Figura 45: Câmara escura para análise de fluorescência.....	113
Figura 46: Gráfico de tempo e concentração dos compostos 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de camada delgada
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CQ	Cloroquina
EI	Eritrócitos infectados
EM	Espectrometria de massas
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Dispersão frontal- tamanho)
GFP	<i>Green Fluorescent Probe</i> (Proteína verde fluorescente)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (Solução salina balanceada de Hank's)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HPLC-RP	<i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
PNCM	Programa nacional de controle da malária
PQ	Primaquina
RMN	Ressonância magnética nuclear
R10	Soro fetal bovino 10%
SFB	Soro fetal bovino
SSC	<i>Side Scatter</i> (Dispersão lateral- granularidade)
SUS	Sistema único de saúde
UV	Ultravioleta
VD	Vacúolo digestivo

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS QUÍMICAS

Ácido 3-(aminofenil)borônico. HCl

Boc - di-*tert*-butil-dicarbonato

CPQ – Carboxiprimaquina

DMF – Dimetilformamida

DHAQ - 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina

DIC - N,N'-diisopropilcarbodiimida

DIPEA - *N,N*-diisopropiletilamina

Dppf - 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno

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

HOBt – Hidroxibenzotriazol

MAQ - 6-metoxi-8-aminoquinolina

NMM - *n*-metilmorfolina

Pd(OAc)₂ – Acetato de Paládio (II)

TEA – Trietilamina

1,10-fenantrolina

5-HPQ - 5-hidroxiprimaquina

5-H-6-DPQ - 5-hidroxidesmetilprimaquina

RESUMO

SOUSA, ARIANE, C. S. “Síntese de 2,5-Diarilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes Usadas como Biomarcadores em Malária”. 2016. 132f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Área de Insumos Farmacêuticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A malária é uma das principais causas de morte em muitos países de clima tropical, matando mais de 438 mil pessoas anualmente em todo o mundo. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar compostos fluorescentes 2,5-diarilfuranos através da reação de acoplamento cruzado tipo Suzuki-Miyaura e acoplar ao fármaco Primaquina para utilizá-los laboratorialmente como biomarcadores específicos, carreadores de substâncias, parasiticidas, além do desenvolvimento de novo método diagnóstico. Através deste tipo de reação, foram sintetizados 3 compostos fluorescentes: a sonda 3-AFA, 3-AFA ala e a 4-AFAPQ.

Inicialmente foram utilizadas células primárias, células da linhagem RAW 264.7 e células eritrocíticas, estas provenientes de camundongos Balb/c inoculados pela via intraperitoneal com 10^6 EI/mL de *P. berghei* ANKA GFP. Os compostos fluorescentes sintetizados 3-AFA e 3-AFA ala foram incubados com as células acima citadas e verificou-se a capacidade de as sondas penetrarem e marcarem células saudáveis e/ou infectadas. A aquisição dos resultados foi realizada por meio de citometria de fluxo e microscopia confocal. A partir daí, utilizou-se também sangue humano proveniente de doação que foi infectado com *P. falciparum* 3D7. A análise dos resultados realizada com microscopia de fluorescência e testes de EC_{50} com estes eritrócitos, além de células HepG2. As sondas 3-AFA e 4-AFAPQ foram incubadas com estas células para avaliar a ação parasiticida, bem como a citotoxicidade destes compostos.

Nossos resultados mostraram que as sondas 3-AFA e 3-AFA ala não foram capazes de penetrar os macrófagos. Entretanto, foram capazes de atravessar a membrana dos eritrócitos infectados marcando o parasita. Quando os compostos 3-AFA e a 4-AFAPQ foram inseridos em eritrócitos humanos infectados pelo *P. falciparum* 3D7, foi possível observar que ambos marcaram o parasita em suas 3 fases. Mas resultados de EC_{50} mostraram que os compostos não possuem efeito parasiticida. E podemos concluir que estes compostos não são citotóxicos às células possuindo então, um potencial em serem estudados mais a fundo, com algumas modificações em suas estruturas para melhorar assim, sua eficiência quanto a seletividade. Diante destes compostos potencialmente fluorescentes, foi possível também desenvolver um novo método de diagnóstico rápido simples e barato que pode possibilitar o alcance em locais aonde os métodos convencionais de microscopia não chegam.

Palavras-chave: Malária, Primaquina, Sondas fluorescentes, Suzuki-Miyaura, 2,5-Diarilfuranos, Seletividade, Diagnóstico.

ABSTRACT

SOUSA, ARIANE, C. S. “**Synthesis of 2,5-Diarylfuranes: Potential Fluorescent Probes Used as Biomarkers in Malaria**”. 2016. 132f. Dissertation – Postgraduate Program in Pharmaceuticals and Medicines, Pharmaceutical Drugs area, Faculty of Pharmaceutical Sciences– University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Malaria is a major cause of death in many tropical countries, killing over 438 thousand people annually worldwide. Thus, the objective of this study was to synthesize fluorescent compounds 2,5-diarylfuranes through cross-coupling reaction like Suzuki-Miyaura and engage the drug Primaquine to use them as laboratory specific biomarkers, carriers of substances, parasiticide, and the development new diagnostic method. Through this type of reaction, three fluorescent compounds were synthesized: probe 3-AFA, 3-AFA ala and 4-AFAPQ.

Initially were used primary cells, strain RAW 264.7 cells line and erythrocytic cells, those derived from Balb/c mice inoculated intraperitoneally with 10^6 IE/mL of *P. berghei* ANKA GFP. The synthesized fluorescent compounds 3-AFA and 3-AFA ala were incubated with the above said cells and found the ability of penetrating probes and mark healthy cells and/or infected. The acquisition of the results was performed by flow cytometry and confocal microscopy. From there, it was also used human blood from that donation was infected with *P. falciparum* 3D7. The analysis performed with fluorescence microscopy and EC_{50} these tests with erythrocytes, and HepG2 cells. The probes 3-AFA and 4-AFAPQ were incubated with these cells to evaluate the parasitocidal activity and cytotoxicity of these compounds.

Our results showed that the probes 3-AFA and 3-AFA ala were not able to penetrate macrophages. However, they were able to pass the membrane of the parasite infected erythrocytes marking. When the fluorescent probes 3-AFA and 4-AFAPQ (coupled Primaquine) were inserted into human erythrocytes infected with *P. falciparum* 3D7, it was observed that both marked the parasite in her 3 phases. But EC_{50} results showed that the compounds do not have parasitocidal effect. And we can conclude that these compounds are not cytotoxic to the cells having then a potential be studied further, with some modifications in their structures to improve thus efficiency and selectivity. Given these potentially fluorescent compounds, it was possible to develop a new method of simple and inexpensive rapid diagnosis that can enable the range in places where conventional methods of microscopy not arrive.

Keywords: Malaria, Primaquine, Fluorescent probes, Suzuki-Miyaura, 2,5-Diarylfuranes, Selectivity, Diagnostic.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária: infecções por protozoários do gênero *Plasmodium spp.*

A malária é uma doença infecciosa febril, causada por parasitas que são transmitidos através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* e representa uma das principais causas de morte em muitos países de clima tropical. No Brasil, mais especificamente nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, a malária apresenta uma incidência anual de aproximadamente 142 mil casos,¹ enquanto que no mundo, sua incidência gira em torno de 214 milhões de casos, resultando na morte de 438 mil pessoas.² Cinco espécies de *Plasmodium* estão descritas como agentes causadores da malária em humanos, a saber: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.¹

No entanto, no Brasil, somente três espécies causam a doença em humanos: o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, e dentre elas, o *P. vivax* é o mais encontrado sendo o responsável por 85% dos casos de malária na região Amazônica.³

As espécies de *Plasmodium* possuem evolução complexa, com um ciclo assexuado desenvolvido no vertebrado, e outro sexuado desenvolvido no mosquito. O homem é o principal reservatório com importância epidemiológica para a malária. Neste sentido, todos os sintomas e manifestações clínicas associadas às infecções por malária são causadas pela fase assexuada do ciclo de vida do *Plasmodium*.⁴

O ciclo assexuado ou esquizogônico se inicia quando a forma infectante (esporozoíto) penetra no organismo através da saliva que o mosquito introduz ao picar o hospedeiro. Alguns esporozoítos são destruídos pelos macrófagos, mas os que chegam ao fígado penetram nos hepatócitos, onde se multiplicam assexuadamente, resultando após um período de 6 a 16 dias, dependendo da espécie, na formação dos esquizontes. Cada esquizonte maduro rompe-se, liberando milhares de merozoítos nos capilares intra-hepáticos. Muitos desses merozoítos são rapidamente destruídos, mas um número significativo se liga a receptores específicos na superfície dos eritrócitos.⁵

Vale ressaltar que nas infecções causadas pelo *P. falciparum*, os esquizontes teciduais se rompem e não ficam alojados nos hepatócitos, diferentemente do *P. vivax* e do *P. ovale*, onde algumas formas chamadas de hipnozoítos, podem permanecer no fígado por meses ou anos, caracterizando as recidivas tardias da malária.⁶

Nos eritrócitos, os merozoítos transformam-se em trofozoítos jovens, em forma de anel, que crescem tornando-se irregulares e, após a divisão do seu núcleo, convertem-se em esquizontes. Os eritrócitos repletos de esquizontes, se rompem, originando um número variável de merozoítos. Após sucessivas esquizogonias, um número pequeno de merozoítos evolui para gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) que permanecem envolvidos pela membrana dos eritrócitos até serem ingeridos pelos mosquitos no repasto sanguíneo, se isto não ocorrer, degeneram e morrem. Quando a fêmea do *Anopheles* se alimenta do sangue de um humano infectado, os gametócitos são ingeridos dando início ao ciclo sexuado do parasita, que ocorre no estômago do inseto. O microgametócito sofre exoflagelação, originando os microgametas, que são móveis e irão fecundar os macrogametas já desenvolvidos, produzindo os zigotos que, após algumas horas tornam-se oocinetos. Após atravessarem a parede do estômago, os oocinetos transformam-se em oocistos, que após maturação rompem-se, liberando os esporozoítos, podendo permanecer viáveis por cerca de dois meses nas células das glândulas salivares dos mosquitos, até serem inoculados no homem.⁶ A **figura 1** mostra de maneira resumida o ciclo de vida do *Plasmodium* no inseto e no homem.

Figura 1: Ciclo biológico da Malária

Legenda: Esquema geral do ciclo evolutivo da malária. Homem: Inoculação do parasita em estágio de esporozoíto através da saliva do mosquito fêmea (*Anopheles*). Esses esporozoítos vão para células hepáticas, ocorrendo a esquizogonia (transformações assexuadas, formando esquizontes e depois merozoítos). Esses merozoítos invadem as hemácias (anel, trofozoítos, esquizontes até romperem a célula). Esse rompimento libera merozoítos que se diferenciam em gametócitos (femininos e masculinos). Mosquito: Gametócitos se fecundam, formação do zigoto, oocistos, oocinetos, esporozoítos.⁷

Quando o eritrócito é infectado pelo plasmódio, ocorrem alterações acentuadas na membrana desta célula (antigenicamente, funcionalmente, e morfologicamente), onde passa a ter um formato irregular, cuja superfície é coberta com pequenas saliências densas de elétrons, podendo ser observado no esquema da **figura 2**. Nestas saliências existem proteínas derivadas dos parasitas. Contudo, o acréscimo de novas proteínas na membrana celular pode causar uma alteração acentuada na composição e organização da camada lipídica desta membrana.⁸ Ensaios em células contaminadas com o *P. berghei* foram feitos por fluorescência e espectroscopia por ressonância de elétron-spin, e indicaram que a membrana

celular aumenta a fluidez.⁹ Sendo assim, a absorção de metabólitos e drogas são aumentadas nestas células e, existe um influxo de íons de cálcio e de sódio, ocorrendo mudanças em componentes intracelulares do citoplasma dos eritrócitos.⁹

Figura 2: Fases eritrocíticas e alterações fisiológicas, morfológicas da membrana celular

Legenda: Fase assexuada intra-eritrocítica do ciclo de vida do *P. falciparum*. (a) Esta fase inicia-se com a invasão de merozoítos em um eritrócito. (b) O parasita engloba uma porção de citosol do eritrócito, de modo que aparece como um fino anel. (c) A fase do anel evolui, tornando-se um trofozoíto; a partir daí o eritrócito perde a sua aparência lisa característica bicôncava discóide, e pequenas saliências densas de elétrons aparecem em sua superfície. (d) Na fase de esquizontes, o parasita se subdivide produzindo merozoítos “filhos”, (e) o eritrócito infectado com os merozoítos se rompe e inicia-se um novo ciclo.⁸

1.2. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas ocorrem em geral entre 7 a 30 dias após a inoculação do parasita dependendo da espécie do plasmódio.¹⁰ Na infecção por *P. vivax* o início dos sintomas ocorre entre 12 a 17 dias.¹¹ Os sintomas são provenientes da liberação de inúmeros compostos resultantes da degradação do

grupo heme na fase eritrocítica do ciclo do plasmódio, como a hemozoína e a glicose fosfato isomerase, que estimulam macrófagos e outras células a produzirem citocinas que são responsáveis pela febre e calafrio.¹¹

Inicialmente, o paciente pode ser assintomático, ou apresentar sintomas inespecíficos, como: cefaléia, fadiga, náuseas, vômitos e mialgia.¹² Após estes sintomas, podem iniciar os sintomas mais intensos característicos da malária: calafrios, tremores generalizados e febre que pode ser superior a 40 °C acompanhados ou não dos sintomas acima descritos, seguido de sudorese profusa e fraqueza intensa. Após esses sintomas, a febre torna-se intermitente, dependendo da duração do ciclo eritrocitário da espécie do plasmódio (48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* e 72 horas para *P. malariae*).

O quadro clínico pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie do plasmódio, da carga parasitária, do tempo decorrido entre a infecção, diagnóstico e tratamento, bem como, do estado imune do hospedeiro, sendo categorizada em não complicada ou complicada (grave) de acordo com as manifestações clínicas.¹²

A malária não complicada possui sinais e sintomas típicos. Já as causas graves, geralmente em *P. falciparum*, mas também em *P. vivax*, pode causar manifestações clínicas descritas na **tabela 1**.¹²

Tabela 1: Manifestações clínicas e laboratoriais da malária grave causada pela infecção por *P. falciparum*

Sintomas	Prostração
	Dispnéia
	Convulsões
	Hemorragias
	Icterícia
	Hiperpirexia (>41 °C)
Alterações laboratoriais	Hiperparasitismo (mais de 5% dos eritrócitos infectados). ¹³
	Hipoglicemia
	Insuficiência renal

Fonte: Guia prático de tratamento da malária no Brasil, 2010.

1.3. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico para confirmar a contaminação por malária é realizado pelo exame de microscopia do sangue, podendo ser em esfregaço delgado (distendido) ou espesso (gota espessa). Porém, necessita de material e reagentes específicos, assim como técnicos treinados para a realização dos mesmos.^{14a}

A gota espessa é corada por técnica de Walker (azul de metileno) e o esfregaço delgado corado por Giemsa.^{14a}

Para diagnosticar a malária o método mais utilizado é o da microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital.^{14b} Este exame permite

diferenciação das espécies de plasmódio e do estágio de evolução do parasita circulante. Um aspecto importante é que a lâmina corada pode ser armazenada por tempo indeterminado. A técnica é finalizada em torno de 60 minutos, desde a coleta do sangue ao fornecimento do resultado. Sua eficácia no diagnóstico depende da qualidade dos reagentes, de pessoal bem treinado, experiente na leitura das lâminas e de permanente supervisão.^{14b}

No preparo do esfregaço delgado a diferença é o espalhamento do sangue que é feito utilizando outra lâmina. Assim como no teste anteriormente descrito existem vantagens e desvantagens na escolha desta técnica. Algumas das vantagens para esta técnica são: a fixação das hemácias resulta em melhor resultado do estudo da morfologia do parasita e alterações nas células parasitadas, podendo ser usado para conferir resultados da gota espessa em casos de dúvidas. As amostras são mais resistentes, mais duráveis e a coloração é conservada por muito mais tempo; permite a determinação percentual de parasitemia pela contagem de eritrócitos parasitados em campos pré-estabelecidos. Assim como outras técnicas possuem desvantagens, uma delas é que como há um espalhamento na lâmina, há dificuldade no encontro das hemácias parasitadas. Por isso não se indica para diagnóstico inicial, ou em pacientes com baixo nível de parasitemia.^{14a}

Atualmente alguns métodos alternativos ao exame de gota espessa vêm sendo disponibilizados, entretanto uma de suas desvantagens é o seu alto custo e a validação dos métodos ainda não totalmente realizada, porém são rápidos e de fácil execução. Como exemplo, os testes imunocromatográficos.^{14a}

Um dos métodos muito utilizados, que se baseiam na detecção de antígenos dos parasitas por anticorpos monoclonais (testes rápidos imunocromatográficos). Estão disponíveis em “kits” e permitem diagnósticos rápidos, por volta de 15 a 20 minutos. A sensibilidade para *P. falciparum*, por exemplo, é maior que 90%.¹⁵

Este método é de fácil execução e interpretação dos resultados, dispensa o uso de microscópio e de treinamento prolongado de pessoal, porém não diferenciam a espécie de plasmódio; não medem o nível de parasitemia; entre outros. No Brasil, as indicações para o uso dos testes rápidos são definidas pelo PNCM (Programa nacional de controle da malária), que prioriza localidades onde o acesso ao diagnóstico microscópico é dificultado ou há incapacidade do serviço de saúde.¹⁶

Alguns testes diagnósticos são disponíveis comercialmente, o ParaCheck-Pf® e o Malar-Check® são testes exclusivos para diagnosticar *P. falciparum* e são baseados na detecção da proteína Pf-HRP2 através da amostra de sangue do paciente, utilizando fita de nitrocelulose por reação enzimática para revelar o resultado. Já o ICT-PfPv® e OptiMal® são testes que revelam não só infecção por *P. falciparum*, mas de outras espécies também. São realizados em fita de nitrocelulose, assim como os descritos acima, e a detecção é realizada por imunocromatografia de enzimas desidrogenases láctica (pDHL), esta específica para outras espécies de *Plasmodium* e a Pf-DHL que é específica para *P. falciparum*. Isso possibilita uma diferenciação da espécie causadora da infecção.¹⁷

Outro tipo de diagnóstico existente é utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção do DNA do parasita, onde o diagnóstico da malária se baseia na detecção de ácidos nucleicos. Porém o diagnóstico através da PCR ainda é muito restrito, sendo usado somente em grandes laboratórios devido ao custo elevado e alta complexidade da técnica.¹⁷

1.4. Tratamentos

A maneira mais eficaz de se combater a malária é evitando a picada do mosquito utilizando roupas que cubram a maior área do corpo, usando repelentes, telas nas janelas, etc.¹⁸

Atualmente o tratamento da malária visa atingir alvos específicos do ciclo evolutivo para evitar a resistência das drogas.

Dois principais alvos são descritos: O primeiro alvo se refere a interromper a esquizogonia sanguínea que é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da doença. O segundo alvo é interromper a transmissão ao parasita utilizando drogas que impeçam o desenvolvimento de gametócitos.^{16, 19}

A primeira descrição da malária foi feita por volta do século V a. C., mas somente em 1638 (século XVII) houve o primeiro registro histórico de compostos com atividades antimaláricas, conhecida como cinchona. Em 1820 a quinina foi descoberta e apresentava propriedades antimaláricas. Durante os últimos anos, um pequeno número de novas drogas foi disponibilizado como fármacos para o tratamento e controle da malária de forma eficaz. Entre 1975 e 1999 quase 1400

novas drogas foram registradas em todo o mundo, que incluía 4-quinolina metanol, Mefloquina, Halofantrina, 8-aminoquinolina (Primaquina) e compostos à base de Artemisina.²⁰

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da PNCM, orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em todo o território nacional, em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS).¹⁶ O tratamento mais comumente utilizado é a associação entre Cloroquina e Primaquina por ser o mais eficaz em casos de infecção por *P. vivax*, este com maior incidência nesta região.^{21, 22}

Os medicamentos mais utilizados atualmente são: Cloroquina, Primaquina, Artemisinina (artesanato), Lumefantrina, Mefloquina, Quinina e Doxiciclina. Todos estes medicamentos em sua maior parte são administrados em associação.²¹

Existem 4 tipos de tratamento distintos, sendo que em cada um deles uma diferente classe de fármacos é administrada e atuam em diferentes estados de evolução do parasita (**figura 3**).¹⁸

Os fármacos utilizados no tratamento agudo atuam na fase eritrocítica do parasita (A): Quinolina metanol (Quinina/ Mefloquina); diversas 4-aminoquinolinas (Cloroquina), Halofantrina, Fenantreno, Sulfonas, entre outros. Os fármacos para cura radical, que atuam na eliminação dos parasitas do fígado (B): Apenas as 8-aminoquinolinas (Primaquina/ Tafenoquina) apresentam essa ação. Estes fármacos também destroem os gametócitos e reduzem assim, a disseminação da infecção. Também existem tratamentos para a quimioprofilaxia, embora a verdadeira profilaxia, ou prevenção da infecção pela destruição dos esporozoítos no hospedeiro, não é possível hoje em dia com os fármacos disponíveis, isso só seria possível com o uso de vacinas, que não foram desenvolvidas ainda. Para prevenir o desenvolvimento dos sintomas clínicos, são utilizados quimioproláticos que matam o parasita quando este sai do fígado. Os fármacos utilizados são principalmente (C): Cloroquina (CQ) (para áreas sem resistência a *P. falciparum*), Mefloquina (para áreas com resistência à Cloroquina por parte da *P. falciparum*), Proguanil, Pirimetamina, Dapsone e Doxiciclina (para profilaxia terminal de infecções por *P. vivax* e *P. ovale*). Geralmente, utilizados em combinação, este tipo de agentes quimioproláticos é administrado a indivíduos que viajam para regiões endêmicas de malária. Já os antimaláricos utilizados para impedirem a transmissão são fármacos

1. Introdução

que atua nos gametócitos (D): Primaquina, Proguanil e Pirimetamina; previnem e impedem a transmissão da doença pelo mosquito; porém estes fármacos raramente são utilizados apenas para esta ação.^{18, 23}

Figura 3: Ciclo de vida do parasita da malária e local de ação dos antimaláricos

Legenda: Ciclo no fígado e eritrocítico sanguíneo: **1a** Esporozoíto dentro da célula hepática, onde o parasita é representado pelo círculo e o núcleo do hepatócito oval azul. **2a e 3a** mostra o desenvolvimento do parasita dentro do hepatócito. **4** ruptura da célula hepática e liberação dos merozoítos (alguns podem invadir novas células hepáticas originando os hipnozoítos). **1b** forma em repouso no hepatócito (hipnozoíto). **2b e 3b** mostra a evolução do hipnozoíto nas células hepáticas. **5** entrada dos merozoítos liberados (**4**) no eritrócito. **6** evolução para trofozoíto no eritrócito. **7 e 8** desenvolvimento do esquizonte na célula sanguínea. **9** ruptura do eritrócito e liberação de merozoítos. Estes em sua maior parte invadirão outros eritrócitos. **10-12** entrada dos merozoítos nos eritrócitos e se diferenciando em gametócitos masculino e feminino. Locais de ação dos fármacos: **A** (fármacos utilizados no tratamento agudo - esquizonte sanguíneos); **B** (fármacos que afetam os hipnozoítos e resultam em cura radical de *P. vivax* e *P. ovale*); **C** (fármacos que bloqueiam a ligação entre o hepatócito e o eritrócito - usados para quimioprevenção). **D** (fármacos que impedem a transmissão).²³

A classe dos compostos 8-aminoquinolinas a qual inclui a Primaquina (PQ) (**figura 4**) terá um destaque devido a características na estrutura da molécula, que possibilita um fácil acoplamento a compostos ativos que serão sintetizados e descritos mais a frente.

Figura 4: Estrutura da Primaquina

- Fórmula molecular: $C_{15}H_{21}N_3O$
- Massa molecular: 259,35 g/mol.

A Primaquina possui três usos distintos mais utilizados atualmente: pode ser prescrita para a prevenção da malária para pessoas que fazem viagens curtas em regiões nas quais encontram o tipo de malária (*P. vivax*). Pode ser prescrita após o retorno de viagem longa em combinação com outro medicamento para prevenção. Por fim, pode ser prescrita em combinação com outro medicamento para o tratamento efetivo.²⁴

Este fármaco é bem absorvido por via oral, atingindo picos de níveis plasmáticos em 1-2 horas e a meia-vida plasmática é de 3-8 horas. A PQ é amplamente distribuída nos tecidos, mas apenas uma pequena quantidade esta fica ligada neles. É rapidamente metabolizada e excretada na urina. O fármaco é ativo contra as fases hepáticas de todos os parasitas da malária humana, sendo o único ativo disponível contra os estágios hipnozoíticos dormente de *P. vivax* e *P. ovale*. A Primaquina também atua contra estágios eritrocitários e os gametócitos de todas as espécies da malária humana. O mecanismo de ação deste antimalárico ainda é desconhecido¹⁸ provavelmente sua ação se deve a espécies reativas intermediárias como espécies reativas de oxigênio ou até mesmo radicais livres formados na metabolização da PQ que atuam no parasita.²⁵

Este metabolismo é bastante complexo e sua biotransformação envolve um processo de óxido-redução da molécula da PQ para metabólitos que possuem atividade oxidativa no parasita. Nenhum dos metabólitos já descritos possui relação direta a ação da PQ, mas como algumas espécies são hidroxiladas, radicalares e altamente reativas, sugere-se que elas rompem a membrana mitocondrial do parasita e isso impossibilita a respiração celular.²⁵

Os metabólitos já descritos são carboxiprimaquina (CPQ); 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ); 5-hidroxidesmetilprimaquina (5-H-6-DPQ); 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina (DHAQ) e 6-metoxi-8-aminoquinolina (MAQ) (**figura 5**).²⁶

Figura 5: Estruturas químicas dos metabólitos da PQ

Legenda: Estruturas dos metabólitos da PQ encontrados e identificados *in vivo*. Espécies que possivelmente atuarão no parasita de maneira que rompa a membrana mitocondrial do parasita e isso impede a respiração celular, matando o parasita.²⁵

1.5. Resistência

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência aos fármacos antimaláricos é a capacidade do parasita sobreviver e/ou multiplicar-se, apesar da administração e absorção de um fármaco antimalárico na dose normalmente recomendada.²⁷

1. Introdução

Uma ameaça eminente no controle da malária é o aparecimento de parasitas resistentes aos fármacos antimaláricos. A resistência tem sido descrita em todas as classes de antimaláricos e vem crescendo rapidamente nos últimos anos (**figura 6**).²⁸

Existem relatos de resistência à CQ em infecções por *P. vivax* no Brasil, em que existe parasitemia mesmo com quantidades da droga acima do valor mínimo eficaz.²⁹ Além disso, a resistência em sete de 135 pacientes residentes da mesma região amazônica do Brasil que receberam tratamento com CQ + PQ, mostrou que a resistência não ocorre somente com CQ, mas com a associação entre ela e a PQ.³⁰

Figura 6: Mapa mundial da resistência a antimaláricos

Legenda: Mapa mundial com representação em cores da resistência a medicamentos mais comumente usados no tratamento da malária.³¹

Atualmente vários métodos de monitorização da resistência aos fármacos antimaláricos que incluem testes *in vivo* e *in vitro* tem sido desenvolvidos, o mais recente deles foi o desenvolvimento de marcadores moleculares. O primeiro

protocolo para monitorar a eficácia dos fármacos antimaláricos *in vivo* foi formulado em 1964 pela OMS.³²

Atualmente, esforços para identificar e contornar a resistência a fármacos vem sendo o objetivo de alguns trabalhos, e a utilização da fluorescência vem sendo muito empregada para este fim; e não só em estudos da resistência, mas também para descobertas futuras de novas drogas.³³

Desta forma, estudos que visem esclarecer a patogênese das diferentes formas de malária; síntese de novos medicamentos antimaláricos, de sondas para monitorar mecanismos de resistência, de substâncias que possam facilitar o diagnóstico precoce, ou até mesmo que potencialize o efeito destes medicamentos utilizados nesta doença, a qual aflige populações mais carentes de países em desenvolvimento, possuem grande relevância científica e social e podem contribuir para a diminuição da alta taxa de mortalidade evidenciada nos indivíduos que foram acometidos pela malária, e diminuir a resistência de fármacos cada vez mais frequente.

Sendo assim, propomos a síntese através da reação do tipo Suzuki-Miyaura de alguns compostos fluorescentes que possuem um grande potencial em serem utilizados em teste diagnóstico e que podem potencializar o efeito no tratamento com drogas como a Primaquina.

1.6. Síntese: reação de Suzuki-Miyaura

Algumas reações de acoplamento cruzado são muito utilizadas para se chegar a compostos com algum potencial biológico.

Podemos citar as reações de acoplamento cruzado de alquenos³⁴ (reação de Heck), compostos organoboro³⁵ (reação de Suzuki-Miyaura), aminas³⁶ (aminação catalisada por paládio) ou compostos organoestanho³⁷ (acoplamento de Stille) para formar ligações carbono-carbono estão entre os mais utilizados em síntese orgânica.³⁸ Mecanicamente, estas reações começam com a adição oxidativa de um haleto de arila, alquênica, alquinila ou triflato de paládio (0) para formar um haleto de organopaládio (II) ou triflato.³⁹ A eliminação redutiva regenera o catalisador de paládio (0), o qual pode então reiniciar outro ciclo catalítico. A reação de acoplamento catalisada por paládio entre haletos orgânicos ou triflatos com

organoboranas, sob condições básicas, é conhecida por Suzuki-Miyaura e é um método versátil para a formação de ligações carbono-carbono que tolera a presença de diversas funcionalidades.

A reação de Suzuki-Miyaura é particularmente importante, pois compostos de boro possuem vantagens em relação aos outros organometálicos, incluindo acessibilidade e facilidade de extração do produto, toxicidade mínima e outros fatores ambientais. Por analogia com outros processos,⁴⁰ acredita-se que o acoplamento de organoboranas ocorra através de um ciclo catalítico envolvendo três passos básicos: (1) adição oxidativa do carbono eletrofílico ao paládio zerovalente (PdL_2) coordenativamente insaturado, onde L é normalmente um ligante fosfina, tal como $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$, (2) transmetalção de um carbono nucleofílico do boro para o $\text{R}'\text{PdXL}_2$ e (3) rápida eliminação redutiva do produto de acoplamento cruzado com a regeneração do catalisador PdL_2 (**figura 7**).

Figura 7: Ciclo catalítico da reação de Suzuki-Miyaura

Legenda: Após a mistura de PdL_2 e reagentes (RX , RR') ocorre a formação de um complexo $\text{Pd}(\text{II})$, que após sofrer oxirredução forma o complexo $\text{Pd}(0)$, seguido da adição oxidativa dando origem ao telureto de paládio intermediário. Posto a reagir com outros reagentes dará origem ao produto arilfurano.⁴¹

Sais de potássio de organotrifluoroboratos⁴² são a melhor opção para reações de Suzuki-Miyaura por apresentarem vantagens sobre os reagentes tradicionais de

boro (ácidos e ésteres borônico) recentemente utilizados, tais como: não são higroscópicos, tempo de estocagem a temperatura ambiente longo, são mais nucleofílicos, são menos tóxicos que reagentes organoestannanos⁴³, diferentemente dos organozinco e organomagnésio, eles possuem acentuada estabilidade oxidativa e térmica⁴⁴ e, subprodutos inorgânicos das reações de organotrifluoroboratos são ambientalmente amigáveis e facilmente removidos por simples “workup”.

Espécies insaturadas de telúrio são intermediárias extremamente úteis em síntese orgânica⁴⁵ e podem ser aplicadas, via reação de acoplamento tipo Suzuki-Miyaura, na formação de diferentes compostos e tipos de ligações carbono-carbono empregando sais de potássio de organotrifluoroboratos.⁴⁶

Compostos heterobiarílicos têm importantes propriedades biológicas e a unidade biarílica está presente em vários tipos de compostos de interesse incluindo produtos naturais, polímeros, materiais avançados, cristais líquidos, quimiosensores moleculares luminescentes e, moléculas de interesse medicinal.^{47, 48} A arquitetura α -conjugada dos compostos heteroaromáticos tem grande importância na aplicação desta classe de compostos. Os compostos heterocíclicos aromáticos, principalmente os que contêm oxigênio, enxofre ou nitrogênio, também estão presentes em muitos produtos biologicamente ativos.⁴⁹

Como exemplo, antivirais usados em casos de herpes 5-furo-(6-hexilfenil)-dUrd (Cf 1742) **1**, 5-furo-(6-pentilfenil)-dUrd (Cf 1743) **2**,⁵⁰ alguns usados contra a hepatite C como E-tricoclina **3** e o ácido Z-imperatorina **4**⁵¹ (**figura 8**) tem em suas estruturas anéis tetraidrofurânicos (estruturas 1 e 2) e furânicos (estruturas 3 e 4)

Figura 8: Antivirais

Legenda: Exemplos de compostos heterocíclicos que possuem atividades biológicas.^{50, 51}

Durante o desenvolvimento das reações de acoplamento tipo Suzuki-Miyaura⁴⁶ observamos que um subproduto resultante do homo-acoplamento, 2,5-difenilfurano, emitia uma luz azul intensa quando iluminado com uma lâmpada de UV, usada para verificação de placas de cromatografia de camada delgada (CCD), (figura 9).

Figura 9: Emissão da luz UV ao 2,5-difenilfurano

Legenda: Características luminescentes do composto acima em solução, observadas ao emitir luz UV utilizada para análise de CCD.⁴⁹

Devido a esta observação, propomos algumas reações que nos permitiram a síntese de compostos 2,5-diarilfuranos fluorescentes acoplados ou não a fármacos,

que possam ser utilizados biologicamente marcando especificamente células ou parasitas.

1.7. Fluorescência

A fluorescência vem sendo muito utilizada para identificar, marcar ou sinalizar sistemas biológicos e ocorre tipicamente a partir de compostos aromáticos. Se dá pela absorção de radiação de uma molécula, onde após isto, passa para seu estado singlete de excitação. O elétron excitado está emparelhado a um nível maior de energia ao segundo elétron no estado fundamental. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental de energia do elétron, ocorre rapidamente pela emissão de um fóton proveniente da transição dos estados singletos. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente 10^8 s^{-1} , de modo que um tempo de vida de fluorescência típico é perto de 10 nanossegundos ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$). O tempo de vida (τ) de um fluoróforo é o tempo médio entre a sua excitação e a volta ao estado fundamental.⁵² Para melhor compreensão da absorção e emissão de luz, o diagrama de Jablonski (figura 10) mostra todo esse processo.

Figura 10: Diagrama de Jablonski

Legenda: O estado singlete fundamental, primeiro estado excitado do singlete e segundo estado excitado do singlete são respectivamente S_0 , S_1 e S_2 . E os estados de transições estão representados pelas setas verticais.⁵³

Este diagrama ilustra a ocorrência da incidência de radiação em determinado comprimento de onda (λ) em dada molécula, os elétrons que estão em seu estado fundamental passam para um estado singlete excitado. Quando ocorre neste estágio uma relaxação vibracional, os elétrons voltam ao seu estado fundamental ocorrendo então, a emissão de luz, ou seja, quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de mais alta energia.

Os dados espectrais de fluorescência apresentam-se como espectro de emissão, onde mostra a relação de intensidade de fluorescência e comprimento de onda que é emitido, onde, geralmente, a energia de emissão é menor que a de excitação. Então a fluorescência ocorre em energias mais baixas ou maiores comprimento de onda como visto na **figura 11**.^{55, 56}

Figura 11: Espectros de excitação e emissão de um composto conhecido (quinino)

Legenda: O quinino tem duas bandas de excitação em 250 nm e 350 nm, mas independente do comprimento usado para excitar a molécula o espectro de emissão de fluorescência tem um máximo em 450 nm.⁵⁶

Algumas substâncias fluorescentes típicas (fluoróforos) são mostradas na **figura 12**. Um fluoróforo amplamente encontrado é a quinina, presente na água tônica que quando excitada pela luz ultravioleta do sol e ao retornar ao estado

fundamental, emite luz azul com um comprimento de onda perto de 450 nm. A primeira observação de fluorescência a partir de uma solução de quinina em luz solar foi relatada por Sir John Frederick William Herschel.⁵³

Figura 12: Estruturas de substâncias fluorescentes

Legenda: Compostos fluorescentes em solução, observadas ao emitir luz UV.⁵³

A fluorescência é expressa no espectro eletromagnético e ocorre pela energia eletromagnética, que é emitida através de qualquer corpo que esteja com a temperatura acima de zero, podendo ser considerado como uma fonte de energia eletromagnética. O Sol e a Terra são as duas principais fontes naturais de energia eletromagnética utilizadas no sensoriamento remoto da superfície terrestre.⁵⁴

A energia eletromagnética é expressa de maneira contínua em função de seu comprimento de onda ou de sua frequência, denominada de "espectro eletromagnético". Apresenta subdivisões de acordo com as características de cada região. O espectro eletromagnético se estende desde comprimentos de onda muito curtos associados aos raios cósmicos, até as ondas de rádio de baixa frequência e grandes comprimentos de onda (**figura 13**).⁵⁴

Figura 13: Espectro eletromagnético: Visível

Legenda: A região do espectro visível é característica por conter um conjunto de radiações eletromagnéticas que podem ser detectadas pelo sistema visual humano.⁵⁴

Dentro do espectro eletromagnético é possível ver e analisar o espectro visível, sendo possível observar nele, que o verde é detectado por um comprimento de onda diferente do azul, isso possibilita a visualização de moléculas fluorescentes azuis sintetizadas (faixa de 400 nm) independente do fluoróforo padrão utilizado para análises, como por exemplo, GFP (localizado ao redor de 500 nm – verde).

Bioimagens de sondas fluorescentes baseadas em pequenas moléculas orgânicas vêm sendo cada vez mais indispensáveis na biologia moderna, uma vez

que fornecem informação dinâmica de localização; quantidade das moléculas, parasitas ou até mesmo células de interesse, sem a necessidade de engenharia genética da amostra, podendo até mesmo tratar e identificar doenças.⁵⁷

O acúmulo de sondas fluorescentes intracelular vem sendo descrita há muito tempo, como JOHNSON em 1979 que descreveu a Rodamina 123 como uma sonda específica para marcar as transformações causadas por vírus na mitocôndria.^{58,59}

Como já dito anteriormente, a fluorescência vem sendo muito utilizada quando se fala em malária principalmente pela sua facilidade em poder detectar facilmente comportamento de parasitas, mecanismos de fármacos e métodos diagnósticos; tudo para possibilitar a erradicação de todas as formas do *Plasmodium* que afeta muitos países, assim como o Brasil que ainda sofre com essa doença.

A Cloroquina verde fluorescente (CQ_{verde}) (comercialmente disponível) é um análogo da CQ que interage com o parasita de uma forma semelhante a este fármaco. As suas propriedades de fluorescência permitem que seja monitorada por equipamento de fluorescência comum. A utilização de CQ_{verde} permite a medição da susceptibilidade da CQ dentro de algumas horas. Sendo assim, é comprovada a possibilidade de acoplar substâncias fluorescentes a fármacos, e isso, pode contribuir para o conhecimento do mecanismo de resistência de drogas os quais, ainda são desconhecidos.⁶⁰

Há também uma preocupação em desenvolver não somente novas técnicas de análise de resultados e atuação dos medicamentos com fluorescência, mas de novos compostos ou drogas para aumentar a eficácia do diagnóstico da malária. Uma das técnicas já desenvolvidas com esta finalidade é baseada em citometria de fluxo fluorescente que faz somente a contagem de células com trofozoítos, podendo ser uma alternativa mais rápida do que métodos manuais tradicionais de contagem de células (Hematocítômetro).⁶¹

Com essa preocupação no desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises de amostras e desenvolvimento de novos compostos utilizando a fluorescência para combater as diferentes formas da malária e sua resistência, a síntese uma nova classe de compostos fluorescentes com ação biológica, possui grande interesse pela sociedade. E este trabalho traz a síntese de alguns compostos fluorescentes com estas finalidades biomarcadoras.

1.8. Biomarcadores

Esses novos compostos fluorescentes podem ser usados como biomarcadores, que são ferramentas valiosas para o desenvolvimento e eficácia de drogas, onde proporcionam maior precisão ou informações mais completas em relação a elas podendo até mesmo acompanhar a progressão de doenças.

Desenvolvimentos em genômica, genética, imagem latente, têm destacado a importância de biomarcadores como indicadores clínicos úteis. Há algumas definições para biomarcadores, tendo como característica de medida e avaliada como um indicador dos processos biológicos patogênicos, processos de intervenção ou respostas terapêuticas farmacológicas. Embora existam diferentes categorias de biomarcadores, três categorias são mais relevantes: descoberta de alvo, visualização de mecanismo, e análise de resultado.

Da mesma forma, os biomarcadores aumentariam substancialmente a resolução da progressão de doenças crônicas como o desenho de estudos clínicos e caracterização de investigação em artrite reumatóide, diabetes de tipo II, as doenças de Parkinson e de Alzheimer, estas chamadas doenças do século.⁶²

Atualmente a utilização de biomarcadores vem sendo de grande importância para o progresso da medicina e a síntese de compostos com este potencial pode trazer avanços não só em desenvolvimento de fármacos, mas também em tratamento de doenças, estudo de mecanismos de fármacos, estudo de patógenos, bactérias, etc. Enfim, os benefícios que podem ser produzidos para a sociedade na utilização desta recente abordagem pouco explorada é muito relevante.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo geral a síntese de compostos 2,5-diarilfuranos fluorescentes através da reação de acoplamento cruzado tipo Suzuki-Miyaura e sua utilização como sondas biomarcadoras de células eritrocíticas contaminadas por protozoários do gênero *Plasmodium* para fins de diagnóstico, pesquisa e uso no tratamento.

2.2. Objetivos específicos

- i) Estudar a seletividade das moléculas sintetizadas 3-AFA e 3-AFA ala em relação a tipo (macrófagos, eritrócitos, hepatócitos) e estado (infectada ou não) celular.
- ii) Avaliar a atividade parasiticida destes compostos fluorescentes (3-AFA e 3-AFA ala).
- iii) Acoplar o fármaco Primaquina na sonda 3-AFA (4-AFAPQ) e analisar sua eficácia em relação ao efeito farmacológico, ou seja, a potencialização do efeito por características seletivas da molécula.
- iv) Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados
- v) Utilização dos compostos fluorescentes sintetizados para diagnosticar a malária através de kits rápidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados obtidos comercialmente foram: furano; *n*-butillítio (*n*-BuLi); *n*-bromobutano; telúrio elementar; óxido de prata (Ag_2O); 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf); acetato de paládio ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$); 4-(metoxifenil)trifluoroborato de potássio; ácido 3-(aminofenil)borônico; bicarbonato de sódio (NaHCO_3); di-*terc*-butil-dicarbonato (Boc); hidroxibenzotriazol (HOBt); N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC); (4-carboxifenil)trifluoroborato de potássio; *N*, *N*-diisopropiletilamina (DIPEA); 1,1' -bis (difenilfosfino) ferroceno paládio (II) dicloreto ($\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$); 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); *n*-metilmorfolina; Primaquina (PQ); trietilamina (TEA); 4-(metilfenil)trifluoroborato de potássio; óxido de zinco (ZnO); (4-cianofenil)trifluoroborato de potássio; sulfato de magnésio (MgSO_4); carbonato de sódio (Na_2CO_3); sulfato de sódio (Na_2SO_4). Além destes reagentes foi utilizado o aminoácido *L*-alanina (ala).

Os solventes utilizados nas reações foram submetidos ao processo de secagem de acordo com Perrin.³⁸ O THF (tetraidrofurano) foi refluxado sobre sódio metálico, utilizando como indicador a benzofenona e destilado para coleta imediatamente antes do uso. O restante dos solventes e dos reagentes foram obtidos através de fontes comerciais sem a necessidade de purificação antes do uso.

As placas de cromatografia delgada, ferramenta para acompanhamento das reações, são de sílica gel UV₂₅₄ (0,20 mm) obtidas comercialmente (Merck). Solução ácida de vanilina, luz ultravioleta e uma cuba contendo iodo triturado foram empregadas na interpretação e revelação dos produtos aplicados e eluídos nas placas de cromatografia delgada.

Para algumas extrações foram utilizadas soluções saturadas de cloreto de amônio (NH_4Cl), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH); ácido clorídrico (HCl) e água (H_2O).

A concentração do reagente de alquil-lítio foi determinada através de titulação do mesmo com isopropanol, utilizando-se 1,10-fenantrolina como indicador.³⁹

A purificação de produtos através de cromatografia em coluna foi realizada utilizando colunas de vidro, sílica gel 60 (230-400 mesh - Merck) e um solvente ou mistura de solventes com gradiente adequado para cada produto.

Quanto aos testes biológicos, foram utilizados tampão *Stanning Buffer*, preparado com PBS 1x e azida sódica, e este tampão com o pH controlado (7,2), meio suplementado RPMI 1640. Lâminas de microscopia cortadas e lapidadas (76 x 26 mm) e lamínulas (24 x 24 mm) para preparação de esfregaços e análises microscópicas.

3.1.2. Equipamentos

A técnica da cromatografia em fase gasosa foi empregada tanto para o acompanhamento das reações como na verificação da pureza de alguns compostos, para isso, um cromatógrafo gasoso, marca *Agilent Technologies*, modelo GC-HP 6850, equipado com uma coluna HP-5, foi utilizado para esse fim, com fase móvel de N₂ e detecção por ionização de chama.

Os espectros de massa por impacto de elétrons foram obtidos com a utilização de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, Shimadzu CG/QP – 5050a (70 eV) equipado com uma coluna capilar DB-5 e Hélio como gás de arraste.

Os produtos sintetizados foram caracterizados através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), ponto de fusão (P.F) e massa de alta resolução.

Os dados de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em um equipamento Bruker DPX-300. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS, utilizados como padrão interno para os espectros de RMN ¹H), e CDCl₃ para espectros de RMN ¹³C. Entre parêntese estão dispostas informações referentes a multiplicidade dos picos (s = singleto, sl = singleto largo, d = duplete, t = tripleto, quart = quarteto, quint = quinteto, sex = sexteto, m = multiplete, dd = duplo duplete, dt = duplo tripleto, td = triplo duplete). A

dedução do número de hidrogênios foi realizada através da integração relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz).

Os valores de ponto de fusão foram determinados em aparelho Büchi B-545, não aferido.

Para remoção dos solventes das soluções orgânicas, foram utilizados: rota-evaporadores Büchi R 210 e R 205; linha de vácuo equipada com uma bomba de alto-vácuo da marca Boc Edwards, modelo RV8 Rotary Vane de dois estágios.

Para purificação de alguns compostos foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em um sistema HPLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan). As amostras foram injetadas em coluna C18 (ACE[®] 250 x 4,6mm), com solventes (A) ácido acético / H₂O (1:1000) e (B) ácido acético / acetonitrila / H₂O (1:900:100) em fluxo constante de 1,2 mL/min. O gradiente utilizado foi de 10 a 80% de solvente B em 35 minutos para a solução em diclorometano e de 50 a 100% de solvente B em 38 minutos para a solução em H₂O. As frações resultantes do processo foram coletadas em tubos separadamente e depois foram concentradas em sistema de concentração a vácuo.

As frações também foram analisadas por espectrometria de massas no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, em um espectrômetro ESI-IT-Tof (Simadzu Co., Japão). As amostras foram diluídas em 50% acetonitrila em água, contendo 0,5% de ácido fórmico e, após a diluição foram injetadas diretamente no espectrômetro por injeção manual; em um injetor Rheodyne (modo positivo e negativo) com fluxo de 50 µL/min na mesma solução usada na diluição das amostras. A voltagem da interface utilizada foi de 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,76 kV, com temperatura de 200 °C. A fragmentação foi feita por gás de colisão argônio, com 50% de energia e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. Os dados obtidos foram analisados pelo software LCMSsolution (Shimadzu Co., Japão).

Os espectros de absorção foram adquiridos em espectrofotômetro Varian Cay 50 e os espectros de emissão, em fluorímetro Varian Cary Eclipse.

Para a análise dos tratamentos incubados com as sondas fluorescentes sintetizadas foi utilizado citômetro de fluxo FACSCanto II da BD, *software* FACSDiva, versão 6.1.3 e o filtro utilizado para visualização da sonda fluorescente sintetizada foi o *Pacific Blue*. E para a obtenção das imagens das células incubadas com as

sondas foram utilizados microscópio AxioCam Imager M2, sendo que para a aquisição das imagens foi utilizado o programa da Zeiss (Axion Vision).; Microscópio confocal Zeiss, versão LSM780 com multifótons modelo Chamaleon e o programa de aquisição foi o Zen, microscópio este do INFARⁱ e a análise primária de placas com poços para cultura celular e realização de experimentos para EC₅₀, HepG2, entre outros, foi realizada em microscópio Axio Vert. A1 da Zeiss (**tabela 2**).

Tabela 2: Microscópios utilizados para aquisição de imagens celular

#	Microscópio	Programa	Local
1	AxioCam Imager M2	Zeiss (Axion Vision)	ICB II (laboratório Prof. Claudio Marinho)
2	Confocal Zeiss, versão LSM780 com multifótons: Chamaleon	Zen	INFAR
3	Axio Vert. A1	Zeiss (Axion Vision)	ICB II (laboratório Prof. Claudio Marinho)

Para a aquisição dos resultados de EC₅₀, foi utilizado o Molecular Devices - SpectraMax® i3, *software* Soft Max Pro 6.4. Já para a obtenção dos gráficos de EC₅₀ foi utilizado o programa GraphPad Prisma, versão 5.

Para análise de amostras para diagnóstico rápido da malária foi utilizado câmara escura para analisar ultravioleta com lâmpada de 4 Watts com emissão de fluorescência com comprimentos de onda em 254 nm e 365 nm.

3.2. Métodos

3.2.1 Síntese geral dos compostos fluorescentes

Baseado na reação de Suzuki-Miyaura, segue esquema de reações. Este esquema representa a síntese geral necessária para obtenção dos compostos fluorescentes 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ.

ⁱLaboratório Multiusuário 6 do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (**INFAR**) da Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (**Unifesp**), Rua Três de Maio, 100 - Térreo, São Paulo, SP.

3.2.2. Síntese do 2-(butilteluro)furan (1).

Em um balão de duas bocas (100 mL), previamente flambado e sob fluxo de nitrogênio adicionou-se *n*-BuLi (20 mmol; 9,2 mL; 1,0 eq.) gota a gota em THF seco (60 mL) a uma temperatura de -78 °C e agitado por 1 hora. Após, adição de telúrio elementar (20 mmol; 2,54 g; 1,0 eq.) a -40 °C, para gerar o telurolato de lítio correspondente, foi deixado *overnight*, e por fim foi adicionado o brometo de *n*-butila (25 mmol; 2,8 mL; 1,25 eq.) gota a gota a -10 °C sendo agitado por mais 2 horas a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com uma solução de NH₄Cl e extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO₄. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída com hexano.⁶³

O produto foi obtido na forma de um líquido amarelo com rendimento de 80% (3,7 g).

Dados espectroscópicos: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,63 – 7,56 (m, 1H); 6,81 – 6,73 (m, 1H); 6,40 – 6,31 (m, 1H); 2,91 – 2,69 (m, 2H); 1,77 (dt, *J* = 15,2; 7,4 Hz, 2H); 1,49 – 1,31 (m, 2H); 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 148,35 (s); 125,60 (s); 118,41 (s); 111,67 (s); 33,90 (s); 24,72 (s); 13,31 (s); 9,82 (s).

MS m/z (%): 254 (52), 252 (47), 250 (29), 196 (33), 166 (18), 68 (59), 57 (64), 41 (100).

3.2.3. Síntese do 2-(4-metoxifenil)furano (2).

Em um balão de duas bocas (100 mL) sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados metanol seco (30 mL), 2-(butilteluro)furano (1) (4 mmol; 1,008 g; 1,0 eq.), óxido de prata (8 mmol; 1,856 g; 2,0 eq.); dppf (4 mmol; 0,443 g; 20 mol%) e acetato de paládio (II) (4 mmol; 0,089 g; 10 mol%). Em seguida, adicionou-se o sal de *p*-metoxifeniltrifluoroborato de potássio (4.4 mmol; 0,941 g; 1,1 eq.) e a reação agitada a temperatura ambiente até o consumo total do material de partida, acompanhada por CCD. Após duas horas, a reação foi filtrada em Celite[®]; extraída com acetato de etila e uma solução saturada de NH_4Cl (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída em hexano.⁶³

O produto foi obtido como um sólido amarelado com rendimento de 65% (0,500 g). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,52 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 7,34 (d, J = 0,9 Hz, 1H); 6,84 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 6,43 (d, J = 3,3 Hz, 1H); 6,36 (dd, J = 3,1; 1,8 Hz, 1H); 3,75 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,07 (s); 154,08 (s); 141,38 (s); 125,26 (2) (s); 124,09 (s); 114,15 (2) (s); 111,51 (s); 103,37 (s); 55,31 (s). MS m/z (%): 174 (78), 159 (67), 131 (16), 77 (14), 43 (100).

3.2.4. Síntese do 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3).

Em um balão de duas bocas sob atmosfera de nitrogênio foi adicionado THF seco (20 mL); 2-(4-metoxifenil)furano (2) (4 mmol; 0,696 g; 1,0 eq.) a temperatura a -78 °C foi adicionado lentamente *n*-BuLi (4,4 mmol; 2,26 mL; 1,1 eq.) e agitado por 3 horas. Em seguida, foi adicionado telúrio elementar (4,4 mmol; 0,558 g; 1,1 eq.) a uma temperatura de -40 °C e agitado adicionalmente por mais 3 horas. Após este tempo, foi adicionado o brometo de *n*-butila (4,4 mmol; 0,602 g; 0,47 mL; 1,1 eq.) a -10 °C e agitado em temperatura ambiente por 6 horas. A reação foi finalizada com uma solução saturada de NH₄Cl e extraída com acetato de etila (3 x 15 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com MgSO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída em hexano.⁶⁴

O produto foi obtido como um líquido avermelhado com rendimento de 83% (1,3 g).

Dados espectrais: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,55 – 7,48 (m, 2H); 6,83 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 6,71 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H); 6,36 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H); 3,73 (s, 3H); 2,72 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 1,77 – 1,61 (m, 2H); 1,31 (dt, *J* = 14,5; 7,4 Hz, 2H); 0,81 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160,00 (s); 159,33 (s); 127,88 (2) (s); 125,34 (d, *J* = 12,7 Hz); 123,54 (s); 117,18 (s); 114,14 (2) (s); 105,54 (s); 55,32 (s); 33,90 (s); 24,75 (s); 13,37 (s); 10,28 (s). MS *m/z* (%): 360 (33), 358 (26), 356 (20), 303 (36), 301 (34), 299 (21), 275 (14), 273 (9), 271 (8), 187 (6), 175 (10), 174 (78), 159 (11), 146 (13), 145 (100), 130 (10), 115 (6), 102 (22), 92 (4), 77 (7), 76 (7), 63 (5), 55 (4), 41 (9).

3.2.5. Síntese do 2-(3-aminofenil)-5-(4-metoxifenil)furano (3-AFA) (4).

Amostra da sonda 3-AFA
em UV 365 nm

Em um balão de duas bocas (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados o 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3) (2 mmol; 0,720 g; 1,0 eq.); óxido de prata (4 mmol; 0,928 g; 2,0 eq.); dppf (2 mmol; 0,221 g; 20 mol%) e $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, (2 mmol; 0,044 g; 10 mol%) em metanol seco (15 mL). Em seguida adicionado o cloridrato do ácido 3-(aminofenil)borônico (2 mmol; 0,348 g; 1,0 eq.) e agitado a temperatura ambiente *overnight*. A mistura foi filtrada em Celite[®] e o filtrado extraído com acetato de etila e uma solução de NH_4Cl (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída em hexano/acetato de etila 44/6.⁶⁴

Foi obtido um sólido amarelo com rendimento de 55% (0,128 g).

Dados: PF=150,5-151,8 °C dec.; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (dd, J = 6,8; 2,0 Hz, 1H); 7,28 (s, 1H); 7,20 (dd, J = 13,5; 5,9 Hz, 1H); 7,15 – 7,08 (m, 1H); 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 6,69 (d, J = 3,4 Hz, 2H); 6,62 (dd, J = 8,5; 2,7 Hz, 2H); 5,32 (s, 1H); 5,32 (s, 1H); 3,87 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,08 (s); 153,29 (s); 152,88 (s); 146,66 (s); 131,89 (2) (s); 129,63 (s); 125,18 (2) (s); 124,01 (s); 114,21 (2) (t, J = 7,8 Hz); 110,09 (s); 107,19 (s); 105,60 (2) (s); 55,34 (s). MS m/z (%) 266

(18), 265 (100), 251 (13), 250 (69), 237 (4), 222 (7), 204 (1), 194 (3), 176 (2), 165 (3), 145 (2), 133 (24), 125 (3), 111 (16), 97 (6), 84 (3), 65 (4), 44 (14).

3.2.6. Proteção do grupo amina do aminoácido *L*-alanina (5).

Para o acoplamento do aminoácido *L*-alanina com a sonda 3-AFA (4), se fez necessário a proteção do grupo amina da molécula do aminoácido para que houvesse um direcionamento no acoplamento da sonda na porção ácido carboxílico e o grupo amina ficasse livre na molécula.

Em um balão de duas bocas (50 mL) foram adicionados *L*-alanina (5 mmol; 0,445 g; 1,0 eq.), bicarbonato de sódio (5 mmol; 0,630 g; 1,5 eq.), Boc (5 mmol; 1,63 g; 1,5 eq.) em metanol (6 mL) e água (6 mL). A reação foi agitada por 36 horas. Após este tempo e não havendo mais material de partida a reação foi finalizada com uma solução de HCl e o pH ajustado para 2. A extração foi realizada com acetato de etila e NH_4Cl (3 x 10 mL).⁶⁵

Foi obtido um sólido branco com 90% de rendimento (0,816 g).

Dados: PF= 79-83 °C dec.; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10,79 (s, 1H); 6,66 (s, 1H); 4,51 – 3,94 (m, 1H); 1,76 – 1,04 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 177,70 (s); 155,51 (s); 80,20 (s); 49,11 (s); 28,65 (3) (t, $J = 58,6$ Hz); 18,33 (t).

3.2.7. Síntese do 1-(3-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)fenilamino)-1-oxopropano-2-il-carbamato de *terc*-butila ou 3-AFA *N*-Boc-Ala (6).

Em um balão de 2 bocas de 50 mL sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado o composto *N*-Boc-alanina (5) (0,25 mmol; 47 mg; 2,0 eq.), o HOBT (0,25 mmol; 33 mg; 2,0 eq.) e o DIC (0,25 mmol; 31 mg; 0,04 mL; 2,0 eq.) em THF seco (5 mL). O sistema reacional foi resfriado em banho de gelo e agitado por 1 hora. Após este tempo, foi adicionado o 2-(3-aminofenil)-5-(4-metoxifenil)furano (4) (0,125 mmol; 33 mg; 1,0 eq.) e a reação agitada por 20 horas a temperatura ambiente. A reação foi extraída com solução aquosa de HCl 1M (12 mL); solução aquosa 5% de NaHCO₃ (12 mL) e água (12 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída em mistura de acetato de etila e hexano⁶⁶ (11/50).

O produto foi obtido na forma de um sólido amarelo em 65% (0,031 g).

Dados espectrais: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,55 (s, 1H); 7,86 (s, 1H); 7,65 (d, *J* = 8,7 Hz, 3H); 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); 7,33 – 7,23 (m, 2H); 6,93 (d, *J* = 8,7 Hz, 3H); 6,68 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H); 6,56 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H); 4,37 (s, 1H); 3,84 (s, 4H); 1,66 (s, 1H); 1,47 (d, *J* = 8,7 Hz, 15H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171,16 (s); 159,12 (s); 153,54 (2) (s); 152,22 (s); 138,30 (s); 131,61 (s); 129,23 (s); 125,24 (2) (s); 123,86 (s); 119,46 (s); 118,49 (s); 114,80 (s); 114,17 (2) (s); 107,74 (s); 105,68 (s); 80,76 (s); 55,33 (2) (s); 28,34 (3) (s); 17,67 (s).

3.2.8. Síntese do (S)-2-amino-N-(3-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)fenil)propanamida (3-AFA ala) (7).

Amostra de 3-AFA ala
em UV 365 nm

Nesta reação é possível observar a desproteção da porção amina deste composto para realização dos testes biológicos e avaliação da capacidade de a molécula penetrar nas células de modo a carrear outros compostos de maneira seletiva, mantendo suas características fluorescentes. Para isso, foi realizado o seguinte procedimento:

Em um balão de duas bocas de 25 mL sob atmosfera de nitrogênio e refluxo foi adicionado (S)-*tert*-butil(1-((3-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)fenil)amino)-1-oxopropano-2-il)carbamato (6) (0,04 mmol; 20 mg; 1,0 eq.) em THF (3 mL); *t*-BuOK (0,04 mmol; 13,5 mg; 3,0 eq.) e H₂O (0,04 mmol; 1 µL). A reação foi agitada em refluxo por 12 horas. Após este tempo a reação voltou a temperatura ambiente e foi finalizada com ácido cítrico 10% (1 g/ 5 mL H₂O). A reação foi agitada por mais 1 hora. Em seguida, ajustou-se o pH da solução em 10-12 com NaOH 6M. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada a vácuo.⁶⁷ A purificação foi realizada em HPLC preparativo onde, A (H₂O 100%) e B (Acetonitrila 42,5%/ Metanol 42,5% e 15% H₂O); a coluna utilizada foi Zoreax SB C18, 5 micras; 9.4 x 250 mm.

O produto foi obtido em um sólido branco com rendimento de 90% (18 g).

Dados espectrais: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,51 (s, 1H); 7,87 (s, 1H); 7,66 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,42 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,31 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 7,26 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H); 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 6,70 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H); 6,57 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H); 5,08 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H); 4,24 (d, *J* = 66,9 Hz, 1H); 3,84 (s, 3H); 1,77 – 1,20 (m, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170,92 (s); 159,15 (s); 153,61 (s); 152,21 (s); 138,28 (s); 131,67 (s); 129,29 (s); 125,26 (s); 123,85 (s); 119,51 (s); 118,49 (s); 114,78 (s); 114,18 (2) (s); 107,76 (s); 105,68 (2) (s); 55,33 (s); 51,06 (s); 28,33 (s).

3.2.9. Síntese do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8).

Em um balão de 2 bocas (50 mL) sob refluxo e atmosfera de nitrogênio foram adicionados o 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3) (0,5 mmol; 0,180 g; 1,0 eq.); (4-carboxifenil)trifluoroborato de potássio (0,5 mmol; 0,159 g; 1,4 eq.); DIPEA (0,5 mmol; 0,193 g; 261 µL; 3,0 eq.); Pd(dppf)Cl₂ (0,5 mmol; 0,028 g; 7 mol%) em metanol seco (10 mL). A reação foi agitada sob refluxo por 18 horas. Evaporei o solvente antes da extração. A extração foi realizada com água (20 mL) e acetato de

3. Materiais e Métodos

etila (3 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com MgSO_4 e concentrada a vácuo.⁶⁸ A purificação foi realizada em coluna com sílica gel flash e eluída com uma mistura de acetato de etila (50 mL) e três gotas de acetona.

O produto foi obtido como um sólido marrom com rendimento de 62% (80 mg).

Dados: PF=210-225 °C dec.; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,52 (d, J = 4,9 Hz, 2H); 7,34 (s, 2H); 6,85 (s, 4H); 6,40 (d, J = 19,8 Hz, 2H); 3,75 (s, 3H).

Composto 8 (com ácido carboxílico)
sob luz UV 365 nm

Algumas alterações na estequiometria da reação foram realizadas para encontrar a melhor rota sintética e se chegar ao produto desejado com rendimentos satisfatórios como mostra a **tabela 3**.

Tabela 3: Alteração na estequiometria da reação

ArBF ₃ K (Equiv.)	Base (Equiv.)	Catalisador (Equiv.)	Rend. (%) produto final
1,4	1,5	5 mol %	23
1,0	2,0	10 mol %	25
1,7	3,0	7 mol %	45
2,0	3,0	7 mol %	62^a
2,0	3,0	7 mol %	54 ^b

^a Rendimento isolado; ^b Solvente: DMF.

Além destas alterações foram realizadas mais duas tentativas de rota sintética para chegar ao produto 8 de maneira mais rápida, mas o mais importante, de maneira mais eficiente.

Com isso, segue as reações adicionais para a formação de intermediários, seguida pela tentativa da obtenção do composto 8.

3.2.10. Síntese do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)benzonitrila (10).

Em um balão de duas bocas (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados metanol seco (10 mL); 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3) (0,5 mmol; 0,180 g; 1,0 eq.), óxido de prata (0,5 mmol; 0,232 g; 2,0 eq.); dppf (0,5 mmol; 0,055 g; 20 mol%) e acetato de paládio (II) (0,5 mmol; 0,011 g; 10 mol%). Em seguida, adicionou-se o sal de (4-cianofenil)trifluoroborato de potássio (0,5 mmol; 0,114 g; 1,1 eq.) e a reação agitada a temperatura ambiente até o consumo total do material de partida, acompanhada por CCD. Após cinco horas, a reação foi filtrada em Celite[®]; extraída com acetato de etila e uma solução saturada de NH_4Cl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente removido sob pressão reduzida.⁶⁴ A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída com hexano: acetato de etila 90:10%.

Foi obtido o produto com uma coloração amarela com rendimento de 62% (0,084 g).

Dados espectrais: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,70 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,5 – 7,55 (m, 2H); 7,41 (s, 1H); 7,34 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H); 7,19 (s, 1H); 6,89 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,80 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H); 6,57 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H); 6,53 (s, 1H); 3,78 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158,65 (s); 142,49 (2) (s); 131,68 (2) (d, $J = 22,5$ Hz); 130,31 (s); 127,12 (2) (d, $J = 35,2$ Hz); 124,36 (2) (d, $J = 25,9$ Hz); 122,52 (s); 117,34 (s); 113,30 (3) (s); 109,53 (s); 105,12 (2) (s); 54,33 (s).

3.2.11. Reação do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8a).

Em um balão de 2 bocas (50 mL) sob refluxo e atmosfera de nitrogênio foi adicionado o 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)benzonitrila (10) (0,25 mmol; 0,068 g; 1,0 eq.) e solução de NaOH 2M (0,25 mmol; 0,4 mL; 1,0 eq.) e a reação agitada em uma temperatura de 100 °C *overnight*. A reação foi finalizada com NH₄Cl e extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida.⁷¹ Uma amostra foi enviada para o RMN e foi comprovado que não houve a formação do produto desejado.

3.2.12. Síntese do 2-(4-metoxifenil)-5-(*p*-toluil)furano (11).

Em um balão de duas bocas (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados metanol seco (10 mL), 2-(butiltelanil)-5-(4-metoxifenil)furano (3) (1 mmol; 0,360 g; 1,0 eq.), óxido de prata (1 mmol; 0,464 g; 2,0 eq.); dppf (1 mmol; 0,110 g; 20 mol%) e acetato de paládio (II) (1 mmol; 0,022 g; 10 mol%). Em seguida, adicionou-se o sal de *p*-metilfeniltrifluoroborato de potássio (1,1 mmol; 0,217 g; 1,1 eq.) e a reação agitada a temperatura ambiente até o consumo total do material de partida, acompanhada por CCD. Após cinco horas, a reação foi filtrada em Celite[®]; extraída com acetato de etila e uma solução saturada de NH₄Cl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída com hexano.⁶⁴

Foi obtido o produto com uma coloração amarela com rendimento de 62% (0,162 g).

Dados espectrais: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,64 (ddd, $J = 11,1; 7,5; 2,3$ Hz, 2H); 7,25 (s, 1H); 7,20 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 6,98 – 6,88 (m, 2H); 6,64 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H); 6,58 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H); 6,51 – 6,41 (m, 1H); 3,83 (d, $J = 4,3$ Hz, 3H); 2,37 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159,06 (s); 153,07 (d, $J = 8,6$ Hz); 136,95 (s); 129,39 (3) (s); 128,32 (2) (s); 125,21 (2) (d, $J = 9,5$ Hz); 123,58 (s); 114,19 (2) (d, $J = 4,1$ Hz); 111,54 (s); 106,47 (s); 105,62 (s); 55,32 (d, $J = 2,1$ Hz); 21,28 (s).

3.2.13. Reação do 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8b).

Em um balão de 2 bocas (25 mL) sob refluxo e atmosfera de nitrogênio foi adicionado o 2-(4-metoxifenil)-5-(*p*-toluil)furano (**11**) (0,5 mmol; 0,132 g; 1,0 eq.); ZnO (0,5 mmol; 0,010 g; 0,25 eq.) em DMF (4 mL). A reação foi aquecida a uma temperatura de 90 °C e agitada por 1 hora. Como neste tempo não houve a formação do produto, agitou *overnight*. A reação voltou a temperatura ambiente e foi filtrada. O filtrado foi lavado com H_2O e extraído com DCM (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido sob pressão reduzida.⁷⁰ A purificação foi realizada em coluna cromatográfica com sílica gel flash e eluída com acetato de etila: metanol: 90:10%. A reação não ocorreu sob essas condições, sendo possível recuperar o material de partida.

3.2.14. Síntese do composto acoplado a Primaquina: 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)-N-(4-((6-metoxiquinolina-8-il)amino)pentil)benzamidas (4-AFAPQ) (9).

Em um balão de 2 bocas (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8) (0,2 mmol; 58,8 mg; 1,0 eq.), EDC (0,2 mmol; 49,6 mg; 1,3 eq.), a reação foi agitada por 40 minutos em 1,4-dioxano. Após este tempo, foi adicionado HOBt (0,2 mmol; 32,4 mg; 1,2 eq.); Primaquina (0,2 mmol; 91 mg; 1,0 eq.), *n*-metilmorfolina (0,2 mmol; 32,9 mg; 1,5 eq.) e a reação foi agitada em temperatura ambiente *overnight*. Após 24 horas de reação, não houve a formação do produto desejado. Foram realizadas algumas modificações na reação (**tabela 4**) para se chegar ao produto final, mas todas as tentativas não tiveram êxito.⁶⁶

Tabela 4: Alteração na estequiometria, método e solvente da reação

Composto 8 ^a (Equiv.)	Ativante ^b (Equiv.)	Antiracemizante ^c (Equiv.)	Base (Equiv.)	Fármaco (Equiv.)	Solvente	Rend (%)
1,0	1,3	1,2	1,5	1,0	1,4-dioxano	n.r.
1,2	2,0	2,0	2,0	1,5	THF	n.r.
2,0	1,7	1,7	3,0	1,7	THF/ H ₂ O	n.r.
1,5	1,0	1,5	4,0	2,0	THF/ DMF	n.r. ^d
1,0	1,3	1,2	4,0	1,5	DMF	n.r. ^d

^a4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)ácido benzóico (8); ^bEDC, ^cHOBt, ^d ultrassom.

Pelo insucesso nas tentativas acima mostradas, outra rota sintética foi adotada para conseguir realizar o acoplamento e chegar ao produto desejado.

No esquema a seguir, nas condições mostradas, é possível ver que houve o acoplamento do composto (9) com a PQ.

3.2.15. Síntese do composto acoplado a Primaquina: 4-(5-(4-metoxifenil)furano-2-il)-N-(4-((6-metoxiquinolina-8-il)amino)pentil)benzamidas (4-AFAPQ) (9).

Amostra do composto 4-AFAPQ
submetido a luz UV 365 nm

Em um balão de duas bocas (50 mL) sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados Primaquina (2,5 mmol; 1,137 g; 1,0 eq.) em DMF (25 mL) e TEA (2,5 mmol; 1,39 mL; 4,0 eq.) em banho de gelo (0 °C). Adicionei o composto com ácido carboxílico (8) (2,5 mmol; 0,882 g; 1,2 eq.). O pH da solução foi ajustado para 7-8 com *n*-metilmorfolina (20 µL). Adicionei HOBt (2,5 mmol; 0,405 g; 1,2 eq.) e DIC (2,5 mmol; 463 µL; 1,2 eq.) e o pH ajustado novamente para 7-8. A reação foi agitada em temperatura ambiente *overnight* e monitorada por TLC. A mistura foi diluída com 0,2 M de Na₂CO₃ (15 mL) (pH 11), o produto extraído com éter etílico (3 x 10 mL) e lavado com 0,2 M de ácido cítrico (15 mL) (pH 2). O produto orgânico foi seco com Na₂SO₄ e o solvente removido totalmente sob pressão reduzida.⁶⁹ A purificação foi

realizada em HPLC preparativo com gradiente de 50-100 de B, onde, A (H₂O 100%/ ácido acético 0,1%): B (Acetonitrila 90%/ H₂O 10%/ ácido acético 0,1%).

O produto foi obtido como um sólido preto com rendimento de 85% (5 mg).

Dados: PF= 81-87 °C dec.; ¹H NMR (300 MHz, Acetona) δ 8,51 (dd, *J* = 4,1; 1,3 Hz, 1H); 8,08 – 7,88 (m, 2H); 7,89 – 7,67 (m, 2H); 7,35 (dd, *J* = 8,2; 4,2 Hz, 1H); 7,05 – 6,94 (m, 2H); 6,81 (d, *J* = 3,5 Hz, 2H); 6,44 (d, *J* = 2,3 Hz, 2H); 6,44 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); 6,33 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); 6,16 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 4,43 – 4,10 (m, 1H); 3,84 (d, *J* = 4,8 Hz, 6H); 3,47 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 2,87 (s, 1H); 1,88 – 1,66 (m, 4H); 1,29 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, Acetona) δ 166,89 (s); 160,59 (d, *J* = 5,9 Hz); 155,12 (s); 152,69 (s); 146,06 (s); 145,03 (s); 135,53 (2) (s); 134,41 (s); 133,92 (s); 130,96 (s); 128,67 (s); 126,18 (2) (s); 124,34 (2) (s); 123,86 (2) (s); 122,78 (s); 115,21 (2) (s); 110,02 (s); 107,03 (2) (s); 97,38 (s); 92,52 (s); 55,70 (s); 55,48 (s); 48,52 (s); 40,49 (s); 34,93 (s); 27,27 (s); 20,87 (s).

3.3. Obtenção de animais e parasitas para testes biológicos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/496).

Para a realização dos ensaios, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, machos, adultos, entre 9 a 10 semanas de idade, e peso entre 22-24 g, fornecidos pelo biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com luz e temperatura controlada e dieta regular (água e comida a vontade).

Para a obtenção dos parasitas, um criotubo contendo 10⁶ EI/mL (eritrócitos infectado/mL), sendo este da espécie *P. berghei* ANKA expresso pela proteína GFP, foi fornecido pela Profa. Dra. Sabrina Epiphanyo (CEUA-ICB nº 24, folha 16 do livro 3) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para o preparo de mais criotubos e posterior realização dos experimentos.

3.4. Testes com diferentes tipos celulares

Os experimentos realizados a seguir, foram em colaboração com Laboratório de Toxicologia da Profa. Tit. Dra. Sandra H. P. Farsky do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.4.1. Obtenção de macrófagos primários para avaliação da capacidade de penetração da sonda 3-AFA

Este experimento foi realizado para avaliar a capacidade da sonda sintetizada (3-AFA) penetrar em macrófagos primários e expressar sua fluorescência especificamente, através da avaliação por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

Macrófagos primários foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, machos, adultos, após 5 dias da injeção intra-peritoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio a 4%. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (77 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (7 mg/Kg) e exsanguinados por secção da artéria carótida e o lavado da cavidade peritoneal contendo tampão fosfato-salino (PBS) foi coletado. Este material coletado foi centrifugado (600 g, 10 min), ressuspensionado em 1 mL de PBS estéril, e o número total de macrófagos quantificado em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

Após a obtenção destas células, colocou-se lamínulas em poços de placas de cultura celular, adicionados 500 μ L (1×10^6) células e 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (RPMI 10). Após a adição foi para incubadora com temperatura de 37 °C e controle de CO₂, deixando por 1 dia para que estas células aderissem a lamínula.

Após este tempo de incubação, foi adicionada a sonda 3-AFA em uma concentração de 15 μ M em cada poço e incubado na mesma placa nos seguintes tempos: 30 minutos e 1 hora.

Outra placa foi preparada com a alteração da concentração da sonda 3-AFA para 25 μ M com exposição de 30 minutos e 1 hora. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados (5 x 1 mL) com PBS e a lamínula com as células aderidas foi

colocada em uma placa de Petri, adicionando-se RPMI 10 e a realização da análise no microscópio 1 da **tabela 2**.

3.4.2. Obtenção de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação da capacidade de absorção da sonda 3-AFA

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio com RPMI 10.

Na primeira placa de cultura com 1x10⁴ células/poço, foi adicionada uma concentração de 15 µM da sonda fluorescente 3-AFA e na segunda placa adicionou a sonda em uma concentração de 25 µM, ambas em HBSS; com a variação dos tempos de incubação, onde em cada placa, o tempo foi de 30 minutos e 1 hora respectivamente, e com o controle da temperatura (37 °C), CO₂ (5%) e umidade.

Após transcorrer o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado, lavagem das amostras com PBS (5 x 1 mL) e a lâmina foi transferida para uma placa de Petri com o HBSS. Foi realizada a microscopia (microscópio 1) para a visualização dos resultados.

3.4.3. Obtenção dos eritrócitos: animal e humano

A obtenção dos eritrócitos de animais (infectados pelo *P. berghei* GFP) e sangue humano infectado com *P. falciparum* 3D7 se deu através das técnicas abaixo descritas para avaliar a capacidade dos compostos fluorescentes sintetizados (3-AFA e 4-AFAPQ) marcarem estas células seletivamente.

Os eritrócitos provenientes de animais utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de camundongos saudáveis, os quais foram infectados com *P. berghei* ANKA GFP (*Green Fluorescent Protein*), uma proteína produzida pelo cnidário *Aequorea victoria* que emite fluorescência na zona verde do espectro visível, sendo possível monitorar a localização desta proteína no organismo.

A partir do criotubo contendo 1 mL de sangue com 10⁶ EI com *P. berghei* GFP cedido pela Profa. Sabrina, 200 µL deste sangue foi inoculado em um animal que, após o desenvolvimento da parasitemia serviu como fonte para o fornecimento de alíquotas de sangue infectado para o preparo de outros criotubos.

A coleta destas alíquotas de sangue foi realizada 7 dias após a inoculação dos eritrócitos infectados, uma vez que a parasitemia neste período encontrava-se em uma porcentagem de 10% a 15%. Com isso, a contagem do número total de células eritrocíticas e o cálculo do número de eritrócitos infectados, foi realizada em câmara de Neubauer e, após este procedimento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em *Alsever's Buffer* (Dextrose, citrato de sódio, NaCl, H₂O e glicina em pH: 6,1) em uma concentração de 10⁶ EI/mL. Em seguida, as amostras foram armazenadas em criotubos de 1 mL a -80 °C para posterior inoculação em outros animais. Após este procedimento o animal foi eutanasiado.

A partir do procedimento descrito acima, 3 animais foram infectados com 100 µL de sangue contendo 10⁶ EI/mL proveniente de um criotubo. O controle da parasitemia foi realizado através da análise de esfregaços sanguíneos diários, coletados da veia submandibular de cada animal. O esfregaço foi fixado com metanol e corado com Giemsa.⁷²

Quando a parasitemia estava em torno de 10%, o sangue foi coletado da veia submandibular (50 µL) de cada animal para a realização dos testes com a sonda fluorescente em citometria de fluxo e microscopia confocal. Vale ressaltar que o laboratório e materiais utilizados para realizar estes ensaios foram compartilhados gentilmente pela Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. As análises das amostras por citometria de fluxo foram realizadas no Departamento de Imunologia Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV) – USP e a microscopia confocal realizada no INFAR- Unifesp.

Já para a realização dos testes em humanos, foi utilizado sangue humano tipo O fator-Rh positivo, obtido através de doação, que posteriormente foi infectado com *P. falciparum* 3D7 expresso com GFP. Os testes com a sonda fluorescente 3-AFA, 4-AFAPQ e o fármaco Primaquina foram realizados em microscopia de fluorescente, além dos testes de EC₅₀, e todas estas análises foram realizadas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) – USP sob coordenação do Prof. Dr. Carsten Wrenger do laboratório “Unit for Drug Discovery”.

3.4.4. Citometria de fluxo: quantificação de células sadias/infectadas e expressão de GFP e a sonda 3-AFA e 3-AFA ala.

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para separar, classificar, além de contar, medir tamanho celular, complexidade das células e intensidade de fluorescência.

Portanto, ensaios de citometria de fluxo foram realizados para analisar a expressão da sonda 3-AFA e a capacidade de penetrar ou não seletivamente em relação ao estado celular (infectado ou não).

Os eritrócitos foram obtidos do sangue circulante dos animais sadios e infectados.

Vale ressaltar que tanto nos testes a seguir de citometria quanto nos de microscopia, foram realizados testes variando a concentração das moléculas sintetizadas (10 μ M, 25 μ M, 100 μ M).

Com este sangue, foram preparados tubos contendo 300 μ L de meio RPMI 1640, onde no primeiro tubo já com este meio, adicionou-se 5 μ L de sangue de um animal sadio, sendo este o controle. No segundo tubo adicionou-se 5 μ L de sangue de um animal infectado, no terceiro tubo foram adicionados 5 μ L de sangue do mesmo animal infectado e 30 μ L do veículo que a sonda foi conservada (DMSO em PBS 1x – 30 μ M), nos tubos número quatro adicionou-se 5 μ L de sangue do animal infectado em cada um deles com a sonda fluorescente 3-AFA e 3-AFA ala em uma concentração de 100 μ M e nos 2 tubos cinco foram adicionados 5 μ L de sangue do animal sadio com as sondas 3-AFA e 3-AFA ala em uma concentração de 100 μ M (**figura 14**).

As amostras foram incubadas a 37 °C em banho Maria com uma variação de tempo (5 min., 15 min. e 30 min.), em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos 1.200 rpm a 4 °C. Ao final deste procedimento, houve a retirada do sobrenadante e o acréscimo de 100 μ L do meio RPMI 1640. A análise da leitura proveniente da aquisição no citômetro de fluxo foi realizada pelo *software FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA). Uma seleção inicial foi realizada por tamanho e granulidade (FSC-H e SSC-H), depois uma seleção com FL1-H e FSC-H para identificar os eritrócitos infectados expressados com GFP. A parasitemia é expressa em percentual de células marcadas dentro do *gate* de eritrócitos.

Figura 14: Esquema dos tubos para análise de citometria de fluxo

Legenda: Foram preparados 2 grupos (cada um com 5 tubos), sendo que o primeiro com a sonda 3-AFA e o segundo com sonda 3-AFA ala. Este esquema representativo mostra como cada grupo de amostra foi preparado. Em todos os tubos foram adicionados 5 µL de sangue em 300 µL de meio RPMI 1640. A concentração final de DMSO foi de 30 µM e a concentração das moléculas 3-AFA e 3-AFA ala: **100 µM**. Tubo 1 (amostra controle, contendo somente sangue sadio); tubo 2 (amostra contendo sangue infectado); tubo 3 (amostra com sangue infectado e DMSO); tubo 4 (amostra com sangue infectado e molécula 3-AFA ou 3-AFA ala); tubo 5 (amostra com sangue sandio e moléculas 3-AFA ou 3-AFA ala). Incubação a 37 °C.

3.4.5. Microscopia confocal: obtenção de imagens de amostras vivas incubadas com a sonda 3-AFA e 3-AFA ala

Este experimento foi realizado para obtenção de imagens e avaliar a possibilidade de a sonda 3-AFA marcar de maneira seletiva células saudias ou infectadas. Já a análise de amostras com a sonda 3-AFA ala se fez para avaliar a possibilidade em esta sonda ser capaz de carrear compostos como fármacos para dentro dessas células mantendo suas características intactas.

Os ensaios de microscopia confocal foram realizados com eritrócitos obtidos do sangue circulante dos animais, pela punção da veia submandibular. O mesmo procedimento utilizado para as análises no citômetro, porém os tampões e o sangue foram mantidos em gelo (aproximadamente 4 °C). Em seguida, foram preparados tubos com meio RPMI 1640, de escolha por se mostrar mais eficiente quando comparado com outros.

No primeiro tubo já com meio RPMI 1640 (300 µL) foi adicionado 5 µL de sangue de um animal sadio, sendo este, o animal controle. No segundo tubo adicionou-se 5 µL de sangue de um animal infectado, no terceiro tubo, adicionado 5 µL de sangue do mesmo animal contaminado com o veículo que a sonda foi conservada (DMSO em PBS 1x), no quarto tubo adicionou-se 5 µL de sangue do animal contaminado com a sonda fluorescente 3-AFA ou 3-AFA ala (100 µM) e o quinto tubo foi adicionado sangue 5 µL do animal sadio com a sonda fluorescente 3-AFA ou 3-AFA ala (100 µM). Esquema representativo na **figura 14** (p. 71).

Estes tubos foram incubados a 37 °C em banho Maria e o tempo variando (5 min., 15 min. e 30 min.); após este procedimento os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1.200 rpm/ 4 °C. Após a retirada do sobrenadante foi adicionado mais meio RPMI 1640 e levado para a análise no microscópio confocal 2 (**tabela 2**, p. 52) seguindo o protocolo já descrito na literatura.⁵³ O microscópio confocal com laser multifótons (Zeiss LSM780) fornece imagens de alta resolução por microscopia de fluorescência, tanto para células fixadas e marcadas com sondas fluorescentes, quanto para células vivas contendo indicadores funcionais e/ou moléculas conjugadas com GFP e derivados. Desta maneira, os testes foram realizados neste microscópio devido a sonda 3-AFA estar na faixa de λ_{exc} = 320 nm e λ_{em} = 400 nm e ser visualizada neste laser (multifótons). A análise microscópica foi realizada em objetiva de 100x.

3.4.6. Microscopia de fluorescência com 3-AFA e 4-AFAPQ: obtenção de imagens de amostras vivas infectadas com *P. falciparum* 3D7

Os experimentos a seguir, foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Carsten Wrenger da Unit for Drug Discovery, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) coordenado pela aluna de doutorado Kamila Meissner.

Este experimento foi realizado para obtenção de resultados através da avaliação de imagens com a possibilidade de a sonda 3-AFA marcar de maneira seletiva células sadias ou infectadas. Já a análise de amostras com a sonda 4-AFAPQ se fez para avaliar a possibilidade em este composto ser capaz de penetrar as células e atuar com potencializador de fármacos, já que está acoplada ao fármaco Primaquina e assim atuar como parasiticida, melhorando a eficácia de tratamento atualmente muito utilizado contra a malária.

Para visualizar os compostos fluorescentes 3-AFA e 4-AFAPQ, a microscopia de fluorescência foi utilizada. Os compostos foram analisados com sangue sadio humano cedido pelo Hospital das Clínicas – SP e infectado com o parasita *P. falciparum* 3D7 que expressou a proteína GFP no citosol do parasita. Essas células foram mantidas em cultura contínua, cultivadas em garrafa e incubadas a 37 °C na presença de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM HEPES, 20 mM bicarbonato de sódio e 0,5% AlbuMAX II (Invitrogen, Alemanha) a 4% hematócrito.^{73, 74}

Para o preparo das amostras para análise no microscópio foi utilizado 500 µL de sangue infectado ressuspendido da cultura acima descrita, quando a parasitemia chegou em 5%; foi adicionado 10 µM da sonda 3-AFA ou 4-AFAPQ. Após isso, foi retirado 10 µL desta solução de células vivas e posto em lâmina para microscópio (**figura 15**). A análise microscópica foi realizada em objetiva de 100x.

Figura 15: Esquema para microscopia de fluorescência de cultura de *P. falciparum* 3D7

Legenda: Em uma cultura de *P. falciparum* 3D7 com 500 µL de sangue, foram adicionados os compostos 3-AFA e 4-AFAPQ em uma concentração de 10 µM e analisado em microscópio de fluorescência.

3.4.7. Diagnóstico rápido da malária utilizando os compostos 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ por análise visual com emissão de fluorescência

Os experimentos a seguir, foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky do laboratório de Toxicologia, Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Este experimento foi realizado para avaliar a possibilidade de esses compostos fluorescentes serem utilizados em teste diagnóstico rápido, com o desenvolvimento de técnica rápida e mais acessível.

Para a visualização dos compostos fluorescentes sintetizados 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ sem a utilização de microscopia, foi realizado testes utilizando câmara escura com luz UV. Para este ensaio foi utilizado sangue de camundongo Balb/c sadio e infectado com *P. berghei* ANKA GFP. O sangue sadio e infectado obtido pela punção da veia submandibular dos animais foi colocado em meio RPMI 1640 com as moléculas sintetizadas (3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ) com testes de diferentes concentrações (20 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM). Estes tubos incubados a 37 °C em banho Maria, o tempo variando (5 min., 15 min. e 30 min.), onde na **figura 14** (p. 71) é possível visualizar os grupos preparados e analisados. Após este

procedimento foi adicionado mais meio RPMI 1640 e levado para a análise na caixa escura com lâmpada fluorescente (365 nm).

3.4.8. Avaliação da eficácia da atividade parasiticida das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ comparadas a Primaquina através de testes de EC₅₀ em amostras vivas de *P. falciparum* 3D7

Os experimentos a seguir, foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Carsten Wrenger da Unit for Drug Discovery, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) coordenado pela aluna de doutorado Kamila Meissner.

Este experimento foi realizado para avaliar a eficácia da atividade parasiticida das moléculas sintetizadas 3-AFA e 4-AFAPQ em relação ao fármaco Primaquina através de testes de EC₅₀, uma curva de dose-resposta em que 50% da população exibe uma resposta. A toxicidade de 3-AFA e 4-AFAPQ foi analisada pela média do EC₅₀.

Para isso foram realizados testes utilizando placas de cultura de células com 96 poços, as quais foram montadas em triplicatas com um volume final de 100 µL de meio por poço; 2% hematocrito e 0,5% de parasitemia. As concentrações finais de 3-AFA e 4-AFAPQ foram de 1 mM e as diluições foram feitas até 3,90 µM de concentração final. Como referência a PQ foi utilizada com concentração máxima de 100 µM com diluições até 0,35 µM. O EC₅₀ da PQ já é conhecido (1-2 µM). Como controle foi feito poços contendo *P. falciparum* 3D7 com ou sem DMSO. Nos poços das laterais só foi adicionado meio de cultura. Nas linhas A e H (2, 3 e 4) foi feito o branco dos compostos nas mesmas concentrações iniciais (1 mM) para o teste da influência destes compostos na curva de detecção. Nos poços E a G (1) foi feito o controle do sangue e nos poços H (10 11e 12) o controle de DMSO (**figura 16**).

Figura 16: Montagem de placas de cultura de células com 96 poços para medida de EC_{50} de 3-AFA e 4-AFAPQ em *P. falciparum* 3D7

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3-AFA	A			1 mM	1 mM	1 mM							
	B			1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7
	C			1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7
	D			1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7
4-AFAPQ	E	Sangue		1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7 + DMSO
	F	Sangue		1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7 + DMSO
	G	Sangue		1 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M	65,5 μ M	31,25 μ M	15,62 μ M	7,81 μ M	3,90 μ M	3D7 + DMSO
	H			1 mM	1 mM	1 mM						DMSO	DMSO

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Primaquina	A			100 μ M	100 μ M	100 μ M							
	B			100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	3,1 μ M	1,5 μ M	0,7 μ M	0,35 μ M	3D7
	C			100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	3,1 μ M	1,5 μ M	0,7 μ M	0,35 μ M	3D7
	D			100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	3,1 μ M	1,5 μ M	0,7 μ M	0,35 μ M	3D7
	E	Sangue											3D7 + DMSO
	F	Sangue											3D7 + DMSO
	G	Sangue											3D7 + DMSO
	H											DMSO	DMSO

Legenda: As concentrações dos compostos fluorescentes 3-AFA e 4-AFAPQ foram de 1 mM a 3,90 μ M. Poços com o padrão do sangue, padrão do DMSO e do composto 3-AFA ou 4-AFAPQ. Todos os tubos com volume de 100 μ L. A PQ foi o composto para comparação e as concentrações foram de 100 μ M a 0,35 μ M.

Após o preparo das placas, foram incubadas por 96 horas a 37 °C na presença de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂.

Vale ressaltar que este teste foi realizado de forma a obter triplicatas.

Após as 96 horas, adicionou-se 100 µL de SYBR Green I em *buffer* de lise (0,2 µL/mL) (corante que marca DNA), as células foram incubadas por 1 hora, após este tempo foi realizada a análise de EC₅₀ com a leitura dos poços preparados no SpectraMax® i3 ajustado para uma fluorescência medida em $\lambda_{exc.485}$ e $\lambda_{emis.530}$ em uma temperatura de 21,5 °C e a aquisição dos dados para produção dos gráficos pelo programa *Graph Pad Prism 5*.

3.4.9. Avaliação da capacidade de penetração das moléculas 3-AFA e 4-AFAPQ em células HepG2

Este experimento foi realizado para avaliar se os compostos fluorescentes 3-AFA e 4-AFAPQ possuem seletividade em se tratando do local celular (citossol ou núcleo celular) de hepatócitos humano HepG2.

Para o preparo das amostras com HepG2 foi utilizado uma placa de cultura celular contendo 24 poços. Cada poço continha uma lamínula com 4×10^4 células aderidas ali, onde foram cultivadas em DEMEM e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 48 horas.

Após este tempo, foi adicionada uma concentração de 10 µM da sonda 3-AFA e 4-AFAPQ e 2 µL de um composto comparativo (HOECHST 33342 – corante de núcleo celular). Para cada composto foram preparados 3 poços e a placa de cultura incubada por 0 minutos, 30 minutos e 1 hora respectivamente (**figura 17**). Ao final de cada tempo de incubação um poço foi lavado (3 x PBS) e a lamínula transferida para uma lâmina contendo 10 µL de uma solução (10% de PBS 1x e 90% de Glicerol) para fixá-las e a partir daí a análise no microscópio.

Figura 17: Placa de cultura de células com 24 poços de HepG2 com HOECHST 33342 (2 μ L), 3-AFA e 4-AFAPQ (10 μ M)

Legenda: Placa de cultura celular com 24 poços contendo 4×10^4 células por poço. As células foram incubadas com azul de núcleo (HOECHST) – poços 5 (A, B, C); sonda 3-AFA azul – poços 1 (A, B, C) e 4-AFAPQ azul – poços 3 (A, B, C).

3.4.10. Avaliação de citotoxicidade através do EC_{50} das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ e Primaquina em HepG2

Este experimento foi realizado para avaliar a citotoxicidade das moléculas sintetizadas em relação ao fármaco primaquina através de testes de EC_{50} , uma curva de dose-resposta em que 50% da população exibe uma resposta com os compostos sintetizados 3-AFA e 4-AFAPQ.

Placas de cultura de células com 96 poços foram montadas em triplicatas com um volume final de 100 μ L de meio por poço contendo 1×10^4 de células HepG2. As concentrações iniciais de 3-AFA e 4-AFAPQ foram de 5 mM e as diluições foram feitas até 19 μ M de concentração final. Como referência a PQ foi utilizada com concentração máxima igual das sondas fluorescentes. O EC_{50} da PQ já é conhecido (1-2 μ M). Como controle foi feito poços contendo HepG2 com ou sem DMSO. Nos

poços das laterais só foi adicionado meio de cultura. Nas linhas A e H (2, 3 e 4) foi feito o branco dos compostos nas mesmas concentrações iniciais do meio para o teste da influência destes compostos na curva de detecção. Nos poços E a G (1) foi feito o controle das células e nos poços H (10 11e 12) o controle de DMSO (**figura 16**, p 76).

Com as placas já montadas estas células foram incubadas por 48 horas a 37 °C, 5% CO₂.

Após o tempo de incubação destas células, adicionamos nestes poços um corante de mitocôndria, o WST1 da Roche (10 µL) e as placas incubadas por mais 4 horas para que ocorra a fixação do mesmo na mitocôndria celular. Transcorrido este tempo, foi feita a leitura das placas no SpectraMax® i3, onde, neste caso, não se utiliza a fluorescência mas sim absorbância (450 nm) e os dados analisados em *Graph Pad Prism 5*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Resultados

4.1.1. Síntese orgânica dos compostos fluorescentes 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ

Para o preparo dos compostos fluorescentes 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ foram necessárias sínteses de compostos intermediários além de encontrar uma melhor rota sintética para se chegar ao produto desejado com rendimentos satisfatórios.

Algumas tentativas demonstradas anteriormente bem como, no item 3.2.11, 3.2.13 e 3.2.14 (**figura 18**) foram realizadas, mas não obtiveram sucesso, tendo que ser adota uma nova rota sintética para chegar aos produtos desejados, neste caso o composto 4-AFAPQ.

Figura 18: Rota sintética que não levou ao produto desejado

Legenda: Sínteses realizadas que não chegaram ao produto desejado (composto 8 – com ácido carboxílico- intermediário para obtenção da sonda 4-AFAPQ) e (4-AFAPQ - composto 8 acoplado ao fármaco Primaquina).

Vale ressaltar que assim como nos itens 3.2.10 e 3.2.12 os compostos sintetizados foram utilizados como produtos intermediários para se chegar ao produto final, assim como mostra a **figura 19**.

Figura 19: Síntese de intermediários para chegar ao composto 4-AFAPQ

Legenda: Compostos intermediários para sintetizar o composto **8** (contendo ácido carboxílico) para posterior síntese da sonda 4-AFAPQ.

No item 3.2.8 é possível ver a síntese do composto 3-AFA ala, este foi sintetizado para avaliar a possibilidade da sonda 3-AFA carrear outros compostos para dentro de células sem perder suas características fluorescentes e possível atividade biológica. Na **figura 20** é possível ver a síntese resumida desta molécula.

Figura 20: Síntese do composto 3-AFA ala

4.1.2. Avaliação da capacidade de penetração em macrófagos da linhagem RAW 264.7 do composto 3-AFA

Para analisar a entrada da sonda 3-AFA dentro de macrófagos da linhagem RAW 264.7 e visualização por microscopia de fluorescência, foram realizados testes de incubação com a variação da concentração e tempo de exposição.

Na **figura 21** é possível ver o campo com as células e a molécula 3-AFA.

Figura 21: Incubação das células RAW 264.7 em HBSS com a sonda 3-AFA (15 μ M)

Legenda: Composto 3-AFA incubado em macrófagos RAW 264.7. A) concentração da sonda 3-AFA de 15 μ M por 30 minutos e B) concentração da sonda 3-AFA de 15 μ M por 1 hora. Ambos incubados em HBSS sob condições específicas de temperatura e CO₂.

Podemos observar que na **figura 21-A** há a presença da sonda fluorescente, mas não é possível ver acúmulo da mesma dentro de nenhuma célula. O mesmo

acontece na **figura 21-B**, onde há a presença da sonda 3-AFA no meio e ao redor delas, mas dentro dos macrófagos não é possível se observar.

Com a visualização das imagens acima, é possível constatar que não houve a entrada da sonda 3-AFA nas células observadas. Foram realizadas aquisições de várias fotos em campos distintos sendo possível observar a mesma situação.

Outra tentativa foi incubar as células utilizando uma maior concentração da sonda 3-AFA (25 μM) e incubada por 30 minutos e 1 hora respectivamente (**figura 22**).

O meio de cultura foi escolhido de acordo com os melhores resultados das análises de microscopia, sendo assim, o HBSS foi o de escolha por apresentar mais características positivas para este experimento.

Figura 22: Incubação das células RAW 264.7 em HBSS com a sonda 3-AFA (25 μM)

Legenda: Composto 3-AFA incubado em macrófagos RAW 264.7. A) concentração da sonda 3-AFA de 25 μM por 30 minutos e B) concentração da sonda 3-AFA de 25 μM por 1 hora. Ambos incubados em HBSS sob condições específicas de temperatura e CO_2 .

4.1.3. Avaliação da capacidade de penetração em macrófagos de células primárias do composto 3-AFA

As análises foram realizadas para verificar se as sondas 3-AFA foi capaz de penetrar macrófagos e marcá-los através da visualização da microscopia fluorescente.

Vale ressaltar que todas as análises no microscópio foram feitas em objetivas de 20x e 40x respectivamente.

Figura 23: Incubação em RPMI 10 de macrófagos de células primárias com a sonda 3-AFA (15 μ M)

Legenda: Composto 3-AFA incubado em macrófagos de células primárias. A) concentração da sonda 3-AFA de 15 μ M por 30 minutos e B) concentração da sonda 3-AFA 15 μ M por 1 hora.

É possível observar na **figura 23-A** a presença da sonda fluorescente, mas não houve a fagocitose dos macrófagos pelo composto 3-AFA.

Vale ressaltar que, as análises foram realizadas em microscópio da Zeiss (Axio Imager A2) onde várias imagens foram adquiridas através do programa Zen. As imagens foram selecionadas para análise e discussão. Houve a repetição deste experimento com essas condições por 3 vezes para a confirmação dos resultados obtidos.

Figura 24: Incubação de RPMI 10 de macrófagos de células primárias com a sonda 3-AFA (25 μ M)

Legenda: Composto 3-AFA incubado em macrófagos de células primárias. A) concentração da sonda 3-AFA de 25 μ M por 30 minutos e B) concentração da sonda 3-AFA de 25 μ M por 1 hora.

Esta figura mostra mais uma vez que a sonda 3-AFA não foi capaz de penetrar nestas células.

4.1.4. Análises dos resultados por citometria de fluxo da sonda 3-AFA em eritrócitos infectados ou não pelo Plasmódio da malária

Para a obtenção dos resultados destas análises, as amostras foram divididas em 5 grupos conforme esquema na **figura 14** (p. 71).

A sonda 3-AFA foi sintetizada e testada para avaliar se é capaz de penetrar eritrócitos de camundongos.

As análises dos resultados das amostras da sonda 3-AFA foram adquiridas pelo citômetro de fluxo (FACSCanto II) e os dados estatísticos adquiridos através do programa *GraphPad Prism 5*.

Na **figura 25** é possível visualizar as populações em sua totalidade da amostra analisada (amostra com sangue contaminado) esta com vários tipos celulares. A população de escolha fica na região em P2, região esta, que se localizam eritrócitos em sua totalidade.

Figura 25: Populações totais de uma amostra

Legenda: A1) Gate representativo da distribuição dos eventos presentes nas amostras de FSC e SSC analisados por citometria de fluxo. P1= Debrí celular e parasitas soltos; P2= Eritrócitos totais; P3= Leucócitos. A2) especificação da região de P2 onde, é expresso eritrócitos saudáveis e eritrócitos contaminados, ou seja, marcados com GFP (delimitado com uma linha).

Para a análise dos resultados foi adotada uma estratégia de seleção de *gates* com os eventos de interesse. A **figura 26** representa o *gate* que inclui as subpopulações celulares. No gráfico **A** (citograma), através da distribuição de tamanho e granulosidade (FSC-H e SSC-H), são selecionadas as células eritrocitárias totais, no gráfico **B** mostra a concentração de eritrócitos na região onde não há expressão de fluorescência (amostra com sangue sadio).

Figura 26: Seleção de *gate* de uma amostra não infectada

Legenda: A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos que relaciona tamanho (FSC) e granularidade (SSC). B) *Dot-plot* da população escolhida em **A**, onde Q4 seleciona neste caso, células eritrocíticas sadias sem nenhuma marcação de fluorescência.

A partir de amostras infectadas, foi selecionado o *gate* dos eventos que expressam células com fluorescência provenientes dos parasitas com fluorocromo GFP (**figura 27**).

Figura 27: Gate de uma amostra infectada com *P. berghei* ANKA GFP

Legenda: A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA GFP tamanho (FSC) e granularidade (SSC). B) *Dot-plot* da população escolhida em A, onde Q4 seleciona neste caso, células eritrocíticas sadias sem nenhuma marcação de fluorescência, já em Q3 seleciona células eritrocíticas infectadas com *P. berghei* ANKA GFP em percentagem.

E como mostra a **figura 28**, quando se incuba as células infectadas com o veículo DMSO, não ocorrem alterações significativas no resultado.

Figura 28: Gate de uma amostra infectada com *P. berghei* ANKA GFP incubada com o veículo DMSO

Legenda: A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA GFP que relaciona tamanho (FSC) e granularidade (SSC). B) *Dot-plot* da população escolhida em A, onde Q4 seleciona neste caso, células eritrocíticas sadias sem nenhuma marcação de fluorescência, já em Q3 seleciona células eritrocíticas infectadas com *P. berghei* ANKA GFP incubadas com DMSO em percentagem.

A amostra preparada com eritrócitos infectados incubados com a sonda sintetizada 3-AFA foi analisada usando os mesmos critérios de seleção anterior representados pelo citograma com *gate*, que é mostrado abaixo (**figura 29**), onde expressa a seleção de células com a dupla marcação de fluorescência, com proteína GFP (verde) e a sonda 3-AFA (azul).

Figura 29: *Gate* de uma amostra infectada com *P. berghei* ANKA GFP incubada com a sonda 3-AFA

Legenda: A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos infectados e com fluorescência que relaciona tamanho (FSC) e granularidade (SSC). B) *Dot-plot* da população escolhida em A, onde Q4 seleciona neste caso, células eritrócíticas saudáveis sem nenhuma marcação de fluorescência, Q2 células com a dupla marcação de fluorescência (GFP e 3-AFA). Q1 expressa eritrócitos sem GFP, mas com 3-AFA (valores irrelevantes).

E por fim a análise de uma amostra contendo eritrócitos saudáveis e incubados com a sonda 3-AFA. Isso define a seletividade quanto a eritrócitos saudáveis e infectados frente a penetração da sonda 3-AFA. O *gate* selecionado (**figura 30**) mostra a seleção da população de células não expressas por fluorescência.

Figura 30: Seleção de *gate* de uma amostra não infectada incubada com a sonda 3-AFA

Legenda: A) *gate* com a percentagem total de eritrócitos sadios que relaciona tamanho (FSC) e granularidade (SSC). B) *Dot-plot* da população escolhida em A, onde Q4 seleciona neste caso, células eritrocíticas sadias sem nenhuma marcação de fluorescência e Q1 células sadias marcadas com a fluorescência de 3-AFA (valores irrelevantes).

Com as seleções realizadas as análises foram feitas em *software* FACSDiva, versão 6.1.3 para obtenção do histograma mostrado a seguir, expressando os resultados das análises das amostras em concentrações diferentes da sonda fluorescente 3-AFA. (figura 31).

Figura 31: Histograma da Seletividade da sonda 3-AFA em eritrócitos

Legenda: A) Análise dos tratamentos de eritrócitos com parasitemia positiva (aproximadamente 10%) e B) eritrócitos sadios com a sonda 3-AFA, ambos em diferentes concentrações e com seu veículo. Os valores expressam a dupla marcação dos eritrócitos com GFP e a sonda 3-AFA. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m. de 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs DMSO.

No histograma **A** podemos verificar que quanto maior a concentração da sonda 3-AFA mais eritrócitos infectados possuem a dupla marcação, ou seja, mais parasitas são marcados por esta molécula.

Quando analisamos o histograma **B** é possível ver que não há marcação de eritrócitos sadios por 3-AFA mesmo em concentração de 100 µM.

Na **figura 32** é possível visualizar o comportamento das células frente a fluorescência em diferentes concentrações da sonda 3-AFA.

Figura 32: Diferentes concentrações (25 e 100 μM) da sonda 3-AFA em eritrócitos de camundongo

Legenda: Dot-plot esquemático mostrando em A) diferentes concentrações da sonda 3-AFA (25 μM e 100 μM) em comparação com o DMSO como padrão e em B) os resultados das amostras com células saudáveis incubadas com a sonda 3-AFA em uma concentração de 100 μM , esta concentração foi a de escolha devido ao seu melhor resultado expresso em A.

4.1.5. Análises dos resultados por citometria de fluxo da sonda 3-AFA ala em eritrócitos infectados ou não pelo Plasmódio da malária

A sonda 3-AFA ala foi preparada (3-AFA acoplada ao aminoácido *L*-alanina) para verificar a capacidade de este composto carrear outras substâncias para dentro destas células.

Neste caso, os resultados obtidos foram muito parecidos quando comparados com os da sonda 3-AFA. Como mostrado abaixo (**figura 33**) a sonda 3-AFA ala foi capaz de penetrar somente as células infectadas marcando o parasita, provando mais uma vez sua seletividade em relação a células sadias e infectadas.

Figura 33: Dot-plot de uma amostra infectada com *P. berghei* ANKA GFP incubada com a sonda 3-AFA ala e seu veículo

Legenda: Análise dos tratamentos de eritrócitos com parasitemia positiva (aproximadamente 60%) e eritrócitos sadios com a sonda 3-AFA ala e com seu veículo. Os valores expressam a dupla marcação dos eritrócitos com GFP e a sonda 3-AFA ala. Obs: valores de Q1 não são relevantes, Q2 expressa a dupla marcação de fluorescência (GFP e 3-AFA ala). Os resultados representam a média +/- e.p.m. de 4 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs DMSO.

A molécula fluorescente 3-AFA ala mostrou-se seletiva através das análises de citometria. A **figura 34** apresenta os resultados em gráficos, onde **A** expressa dados referente a dupla marcação (GFP e 3-AFA ala) e em **B** os dados que expressam eritrócitos sadios incubados com 3-AFA ala, a qual não penetrou essas células, provando que a afinidade da sonda é somente com o parasita, e, onde não há infecção por eles a sonda não é capaz de entrar.

Figura 34: Histograma representativo da seletividade da sonda 3-AFA ala

Legenda: A) Análise dos tratamentos de eritrócitos com parasitemia positiva (aproximadamente 60%) em uma concentração de sonda 3-AFA ala de 100 µM e seu veículo DMSO e B) eritrócitos sadios com a sonda 3-AFA ala, ambos em uma concentração (100 µM) e com seu veículo. Os valores expressam a dupla marcação dos eritrócitos com GFP e a sonda 3-AFA ala. Os resultados representam a média +/- e.p.m. de 4 animais por grupo. *p<0,05 vs DMSO.

A tabela abaixo (**tabela 5**) mostra um resumo das amostras obtidas para análise de citometria de fluxo e seus respectivos resultados com a sonda 3-AFA e a sonda 3-AFA ala.

Tabela 5: Resumo dos resultados de citometria de fluxo com a sonda 3-AFA e 3-AFA ala incubadas em células eritrocíticas

Grupo	Eritrócito sadio (%) celular	*GFP (%) celular	Sonda 3-AFA (%) celular	Sonda 3-AFA ala (%) celular	Dupla marcação (GFP + sonda) (%) celular
ES ^a	100	0	0	-	0
EI ^b	38,2	61,8	0	-	0,013
EI.3-AFA ^c	45,1	11,4	1,98	-	42
EI.3-AFA ala ^d	26,2	14,7	-	1,78	57,4
ES. 3-AFA ^e	99,3	0,048	0,49	-	0,17
ES.3-AFA ala ^f	98,8	0,041	-	0,95	0,20

Legenda: ^aEritrócitos sadios, ^bEritrócitos infectados; ^cEritrócitos infectados com a sonda 3-AFA; ^dEritrócitos infectados com a sonda 3-AFA ala; ^eEritrócitos sadios com a sonda 3-AFA; ^fEritrócitos sadios com a sonda 3-AFA ala; *amostras com DMSO deram o mesmo resultado.

A sonda fluorescente 3-AFA só marca eritrócitos infectados com o plasmódio. Já a sonda 3-AFA ala além de mostrar sua semelhança em relação a sonda 3-AFA em marcar eritrócitos infectados, mostrou-se capaz de carrear substâncias para o meio intracelular.

4.1.6. Avaliação da capacidade de penetração em eritrócitos do composto 3-AFA através da obtenção das imagens por microscopia de fluorescência

Dado os resultados obtidos através da citometria de fluxo, foram realizadas análises por microscopia confocal (Zeiss LSM780 com multifótons - Chamaleon). A escolha por está técnica se dá pela utilização principalmente na obtenção de imagens de amostras vivas por informação computadorizada tridimensional muito usada na pesquisa biológica.

As análises foram feitas após o preparo das amostras. Assim como mostra a **figura 14** (p. 71), foram preparadas 5 amostras em tubos diferentes e após o preparo levados para a análise microscopical. Vale ressaltar que estas análises foram realizadas no INFAR – Unifesp.

Para a análise foram preparadas lâminas de microscópio com 10 µL da amostra (sangue, meio de cultura e molécula juntamente com seu veículo (DMSO) previamente tratados e incubados nas condições já descritas anteriormente neste trabalho). As lâminas já com as amostras foram vedadas com esmalte incolor após a fixação de lamínulas. Isso se fez necessário porque quando se trata de amostras vivas a utilização desta técnica traz segurança para quem as manipula. Também por ser utilizada objetiva de 100x (imersão) se faz necessário a proteção e contenção da amostra.

A **figura 35** mostra a imagem adquirida pela microscopia confocal da amostra onde havia somente sangue sadio.

Figura 35: Eritrócitos Sadios

Legenda: Imagem obtida por microscopia confocal de eritrócitos sadios provenientes da coleta sanguínea de veia submandibular de camundongo Balb/c.

Com a aquisição da imagem de células saudáveis, foram analisadas células infectadas com plasmódio transfectado com GFP (**figura 36**) e amostra de sangue infectada incubado com a sonda 3-AFA (**figura 37**) respectivamente.

Figura 36: Eritrócitos infectados por *P.berghei* ANKA GFP

Legenda: Imagem adquirida através de microscópio confocal de uma amostra com sangue infectado por *P. berghei* GFP de sangue de camundongo Balb/c. As setas identificam as células parasitadas marcadas com o fluorocromo GFP.

Figura 37: Eritrócito infectado com *P. berghei* ANKA GFP incubado com a sonda 3-AFA

Legenda: A primeira imagem (1) mostra uma célula sadia (esquerda) e célula infectada (direita). A segunda imagem (2) mostra a presença do parasita transfectado com GFP. A terceira imagem (3) mostra a presença da sonda 3-AFA. E a última imagem (4) revela a dupla marcação, ou seja, a sobreposição na célula infectada (verde do GFP e azul da sonda 3-AFA). Na imagem 5 é possível ver um eritrócito infectado, a imagem 6 a fluorescência do GFP, a imagem 7 a sonda 3-AFA ala e a 8 a dupla marcação (GFP e 3-AFA ala).

Como mostrado anteriormente (**figura 37**) a sonda 3-AFA é capaz de marcar o parasita da malária. Alterações na membrana do eritrócito podem facilitar a entrada da sonda e atingir o parasita, mas esta suposição não pode ser confirmada ainda.

4.1.7. Avaliação da capacidade de penetração do composto 3-AFA ala em eritrócitos infectados por *P. berghei* GFP através da obtenção das imagens de amostras vivas por microscopia de fluorescência.

Com a molécula fluorescente acoplada a um aminoácido (*L*- alanina) 3-AFA ala sintetizada, foram realizadas as análises em microscópio de fluorescência para avaliar a especificidade desta sonda.

As mesmas amostras descritas no item acima foram preparadas e levadas para aquisição das imagens.

Como é possível ver na **figura 38**, há a presença de parasita (trofozoíto) na célula, com isso a expressão de GFP e consequentemente a marcação deste parasita pela sonda 3-AFA ala resulta então, na dupla marcação (verde – GFP e azul – 3-AFA ala).

Figura 38: Eritrócito infectado com *P.berghei* ANKA GFP incubado com a sonda fluorescente 3-AFA ala

Legenda: A imagem 1 mostra uma célula eritrocítica infectada pelo parasita da malária em seu estágio 2 (trofozoíto), a imagem 2 é o plasmódio transfectado com GFP, a imagem 3 mostra a incidência do laser e a emissão da fluorescência da sonda 3-AFA ala e na imagem 4 revela a sobreposição das fluorescências (verde e azul).

A sonda sintetizada 3-AFA ala foi capaz de penetrar nos eritrócitos infectados e marcar os parasitas ali instalados expressados por GFP.

4.1.8. Avaliação da capacidade de penetração dos compostos 3-AFA e 4-AFAPQ em amostras vivas de eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* 3D7, análise em microscopia de fluorescência

Com as análises realizadas em murinos, houve a oportunidade de fazer os testes em células sanguíneas de humano infectadas com *P. falciparum* 3D7 transfectado com GFP.

Para a realização dos testes foi utilizado sangue humano O positivo proveniente de doação do Hospital das Clínicas, este sangue foi infectado com o *P.*

falciparum 3D7. Quando o nível de parasitemia chegou a aproximadamente 5%, 500 μ L deste sangue foi separado e posto em contato com a sonda 3-AFA (10 μ M), não sendo necessária incubar como feito nos testes anteriores. A **figura 39** mostra as imagens provenientes da análise em microscópio de fluorescência (AxioCam Imager M2), sendo possível visualizar a sonda fluorescente.

Figura 39: Eritrócito infectado com *P. falciparum* 3D7 transfectado com GFP marcado com 3-AFA

Legenda: A imagem **A** mostra um eritrócito infectado com o parasita *P. falciparum* 3D7 GFP em sua forma de anel. Imagem **B** evidencia a célula infectada em sua forma de trofozoíto e a Imagem **C** em seu último estágio na hemácia (esquizonte). Todos expressos pela proteína GFP e marcados com a sonda 3-AFA.

Já a **figura 40** mostra imagens provenientes da análise em microscópio de fluorescência da sonda 4-AFAPQ.

Figura 40: Eritrócito infectado com *P. falciparum* 3D7 transfectado com GFP marcado com 4-AFAPQ

Legenda: A imagem 1 mostra eritrócitos sadios (RBC- *Red cells blood*) e um eritrócito infectado (RBCi- *Red cell blood infected*) marcado com o composto 4-AFAPQ. Na imagem 2A mostra um eritrócito infectado com o parasita *P. falciparum* 3D7 GFP em sua forma de anel. Imagem 2B em sua forma de trofozoíto e a imagem 2C em seu último estágio na hemácia (esquizonte).

4.1.9. Diagnóstico por análise visual com emissão de fluorescência.

Foram realizadas análises para saber se os compostos fluorescentes sintetizados (3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ) poderiam ser utilizados em kits rápidos

para diagnóstico da malária. Como pode ser visualizado na **figura 41** é possível visualizar os compostos nos tubos 3 quando submetidos em luz UV.

Figura 41: Amostras com eritrócitos infectados e marcados pelas moléculas sintetizadas 3-AFA e 4-AFAPQ

Legenda: Tubos com amostras contendo sangue de camundongos sadios e infectados com *P. berghei* GFP em meio RPMI 1640 e as moléculas sintetizadas. No tubo 1 contem eritrócitos sadios, no tubo 2 eritrócitos infectados, no tubo 3 eritrócitos infectados com a sonda 4-AFAPQ e 3-AFA respectivamente (100 µM); no tubo 4 eritrócitos sadios com a sonda 3-AFA ala (100 µM) e o tubo 5 contendo eritrócitos sadios com a sonda 4-AFAPQ (100 µM). Todos foram submetidos à luz UV 365 nm.

Como visto acima, é possível utilizar os compostos sintetizados acima para diagnóstico rápido da malária, pois a técnica é rápida e de fácil desenvolvimento, além de ser necessário tempo bastante curto desde o preparo das amostras até a revelação dos resultados.

Vale ressaltar que o mesmo resultado ocorreu quando analisada a sonda 3-AFA ala.

4.1.10. Avaliação da eficácia da atividade parasiticida através de EC_{50} das moléculas 3-AFA, 4-AFAPQ em relação a Primaquina em amostras vivas de *P. falciparum* 3D7

Com este resultado foi possível avaliar a eficácia da atividade parasiticida das moléculas sintetizadas 3-AFA e 4-AFAPQ em relação ao fármaco Primaquina através de testes de EC_{50} , uma curva de dose-resposta em que 50% da população exibe uma resposta.

Esta técnica de análise de eficiência de drogas e moléculas disponibiliza resultados bastante esclarecedores e confiáveis.

O EC_{50} dos compostos 3-AFA, 4-AFAPQ e da Primaquina pôde nos dar uma curva da dose-reposta *quantal* que representa a concentração em 50% da população das amostras vivas de *P. falciparum* 3D7 exibe uma resposta.

Os gráficos da **figura 42** mostram qual o comportamento das moléculas sintetizadas (3-AFA e 4-AFAPQ) em relação ao efeito relativo da Primaquina.

Figura 42: EC_{50} *P. falciparum* 3D7 da sonda 3-AFA, 4-AFAPQ e Primaquina

Legenda: O composto 3-AFA não tem nenhum efeito no *P. falciparum* 3D7.

Legenda: Esse acoplamento do composto 4-AFA e PQ piora o EC₅₀ mais que 10 x em relação ao EC₅₀ da PQ.

Legenda: EC₅₀ da Primaquina inicia ação com 1,8 μM no estágio sanguíneo.

Como é possível ver no primeiro gráfico da figura acima, a sonda 3-AFA não chega em EC₅₀ de *P. falciparum* 3D7 em uma concentração máxima de 1 mM de 3-AFA devido a não solubilidade acima deste valor.

Já a sonda 4-AFAPQ obteve um EC₅₀ pior quando comparado ao da Primaquina, ou seja, este acoplamento piorou a atividade parasiticida da PQ.

4.1.11. Microscopia de fluorescência dos compostos 3-AFA, 4-AFAPQ e PQ em HepG2

Em se tratando da seletividade das moléculas sintetizadas em relação ao tipo celular, a técnica utilizada possibilitou a visualização dos compostos através de microscopia de fluorescência e saber se marcam somente parasitas ou se possuem afinidade por núcleo, citosol, membrana de outras células.

Vale ressaltar que em todas as amostras as moléculas sintetizadas foram incubadas em uma concentração de 10 μM (2 μL) em $4 \cdot 10^4$ células/poço em placa de cultura com 24 poços.

Um composto comparativo, este vale ressaltar, é um corante que marca núcleo celular comercialmente disponível (HOECHST 33342) e que desta forma foi utilizado para avaliar se há diferença do local de marcação deste em relação aos compostos fluorescentes sintetizados. Analisando as imagens obtidas foi possível definir qual afinidade que as moléculas possuem em relação a células HepG2. A **figura 43** mostra o efeito do HOECHST 33342 e das moléculas sintetizadas 3-AFA e 4-AFAPQ, respectivamente.

Figura 43: HepG2 incubados com HOECHST, 3-AFA e 4-AFAPQ

Legenda: Imagem A mostra HepG2 incubadas com HOECHST e os núcleos celulares marcados por este composto. A imagem B HepG2 com a sonda 3-AFA e a imagem C HepG2 com 4-AFAPQ.

Vale ressaltar que a variação de tempo de incubação alterou o resultado, então o tempo de incubação foi padronizado para 1 hora em todas as amostras.

Então é possível ver que as moléculas sintetizadas fluorescentes 3-AFA e 4-AFAPQ marcam citosol celular, já o corante utilizado para comparar os resultados marca o núcleo das células.

4.1.12. Avaliação da citotoxicidade dos compostos fluorescentes sintetizados 3-AFA, 4-AFAPQ e do fármaco PQ através de EC_{50} em HepG2.

Primeiramente houve a avaliação da citotoxicidade do fármaco Primaquina, composto este que é muito utilizado para tratar infectados pelo plasmódio. A **figura 45** mostra os gráficos obtidos pela análise dos resultados adquiridos através do programa *GraphPad Prisma 5*.

Figura 44: EC_{50} HepG2 da Primaquina, 4-AFAPQ e 3-AFA

Legenda: A viabilidade se refere à sobrevivência celular em relação ao controle. A concentração está apresentada em μ M em todos os experimentos realizados nesta etapa.

4. Resultados e Discussões

Legenda: A viabilidade se refere a sobrevivência celular em relação ao controle. A concentração está apresentada em μM em todos os experimentos realizados nesta etapa.

Legenda: A viabilidade se refere a sobrevivência celular em relação ao controle. A concentração está apresentada em μM em todos os experimentos realizados nesta etapa.

Mesmo com uma concentração de 5 mM a sonda 3-AFA não apresentou citotoxicidade, não chegando a 50% de viabilidade, isso impossibilitou o cálculo de EC₅₀ desta molécula.

O composto 4-AFAPQ, que é acoplado a PQ tem um EC₅₀ de 332,4 μM. Isso mostrou que o acoplamento não muda, ou, diminui significativamente o EC₅₀ da PQ,

e neste caso, não aumenta sua citotoxicidade; mostrando-se menos citotóxico que o fármaco.

A Primaquina que já é usada como droga antimalárica mostra que o EC_{50} em HepG2 é de 392,9 μ M. Esse valor é mais que 200 vezes maior que o EC_{50} contra o *P. falciparum* no estágio sanguíneo.

4.2. Discussão

A ativação de macrófagos é fundamental para resistir à várias infecções geradas por patógenos intracelulares, como por exemplo, o parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*.⁷⁵

Contudo, havia uma grande expectativa da sonda sintetizada marcar estas células, podendo assim, ser uma potente alternativa de diagnóstico e até mesmo de tratamento.

Porém, após as análises de microscopia foi constatado que a sonda 3-AFA não foi capaz de entrar nessas células assim como mostram as **figuras de 21 a 24** (p. 83 a 86). Mas esses resultados também revelaram que a sonda 3-AFA possuía um grande potencial, uma vez que, macrófagos são células participantes do sistema imune e dentre as suas mais importantes funções é proteger o organismo de substâncias e organismos estranhos, fagocitando-as.⁷⁶ Então quando o esperado era a fácil entrada da sonda nessas células, devido as suas características isso não ocorreu. E mesmo com o aumento da concentração da sonda 3-AFA, não houve a entrada da mesma nas células.

A obtenção de imagens com a presença de fluorescência é uma grande vantagem sobre análises de amostras por microscopia normal. A marcação de células, parasitas, tecido, microrganismos entre outros com sondas fluorescentes é um grande avanço para a medicina, pois possibilita diagnósticos, tratamentos mais precisos de maneira qualitativa e o mais interessante, quantitativa. Por isso este trabalho se esforça em trazer um composto seletivo para contribuir de alguma maneira e melhorar processos e técnicas já utilizadas.⁵⁷

Sendo assim, com a não expressão de fluorescência dentro dos macrófagos, partimos para testes com outros tipos celulares.

A malária é causada por um parasita intracelular que infecta e destrói eritrócitos,^{77, 78} tendo como uma das complicações mais comuns a anemia, já que essas células possuem como papel principal o transporte de hemoglobina (Hb), que por sua vez, transporta O₂.^{79,80} Com a destruição dos eritrócitos parasitados, tanto o aumento da eliminação de eritrócitos não parasitados quanto à diminuição da produção dessas células devido à disfunção na eritropoiese teriam importantes contribuições para a patogênese da anemia na malária.^{75, 81}

Os primeiros testes realizados com eritrócitos sadios e infectados foram obtidos de camundongos Balb/c infectados com *P. berghei* ANKA GFP com parasitemia em aproximadamente 10%, o qual mostrou através da microscopia de fluorescência e citometria de fluxo que a sonda foi capaz de entrar nas células eritrocíticas contaminadas, marcando o citosol, mesmo local onde há a expressão da proteína GFP. Vale ressaltar que o nível de parasitemia foi variado de 0,5; 5; 10 e 60% e não houveram alterações significativas e relevantes para o resultado final.

GFP é uma das proteínas mais amplamente estudadas e exploradas em bioquímica e biologia celular. A capacidade de gerar de forma eficiente um fluoróforo emissor interno altamente visível é extremamente valioso, estruturas cristalinas de alta resolução do GFP oferecem oportunidades de compreender e manipular a relação espectroscópica entre estrutura e função das proteínas.⁸²

Esse fluoróforo tornou-se bem estabelecido como um marcador de expressão do gene e proteína de segmentação em células intactas e organismos. Permite o controle em tempo e espaço de um número cada vez maior de fenômenos em células e organismos como a expressão do gene, localização e dinâmica de proteínas, interações proteína-proteína, divisão celular, replicação de cromossomos; via de transporte intracelular e organela.⁸³

As técnicas fluorimétricas já descritas utilizam corantes de ácidos nucleicos, como por exemplo, dimetiloxacarbocianina (DiOC1-3), HOECHST 33258.^{84, 85} As metodologias de marcação de ácidos nucleicos apresentam limitações pois, necessitam de várias etapas na preparação do sangue, tais como: fixação, coloração e tratamentos adicionais para prevenir o aparecimento de fluorescência inespecífica. Alguns fatores específicos limitam o uso de alguns destes corantes para a quantificação de parasitas *in vivo*, como é o caso de corantes de RNA, há uma dificuldade de distinguir eritrócitos infectados de reticulócitos não infectados

que contém RNA.⁸⁶ Já os métodos que utilizam corantes de DNA apresentam colorações falso-positivas com plaquetas e eritrócitos não infectados. Outro método, descrito recentemente para utilização em ensaios quimioterápicos *in vitro* foi a quantificação de parasitas da malária por PCR em tempo real, mas esta metodologia, apesar de sensível, não têm aplicação em ensaios quimioterápicos devido ao alto custo dos reagentes.⁸⁶ Por isso os compostos fluorescentes sintetizados possuem um grande potencial porque além de possuírem eficiência na detecção de células parasitas, o seu preparo é de baixo custo.

A vantagem na utilização de parasitas transfectados com GFP se dá pela simplicidade e facilidade da técnica, não sendo necessária qualquer preparação prévia das amostras para a leitura da fluorescência. Estas cepas estão catalogadas em um banco de reagentes de malária (*Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* - MR4) e os compostos sintetizados nesta dissertação têm características parecidas das deste fluorocromo.

Para obter os resultados provenientes das análises em citometria de fluxo, se fez necessário selecionar a população a qual fica na região em P2, região esta, que se localizam eritrócitos em sua totalidade, mostrado na **figura 25** (p. 87).

Quando amostras de sangue sadio com a sonda 3-AFA foram analisadas, possibilitou visualizar que não houve a entrada desta nas células. Quando analisadas amostras de sangue infectado com o *P. berghei* GFP incubado com a sonda 3-AFA foi possível ver que as células parasitadas também estavam marcadas com o azul da molécula fluorescente 3-AFA. E como é possível ver na **figura 32** (p. 93), quanto maior a concentração da sonda, maior foi a quantidade de eritrócitos expressos com GFP com a dupla marcação.

Já quando foi analisado amostras com a sonda 3-AFA ala, ou seja, a sonda acoplada ao aminoácido *L*-alanina, os resultados mostraram que este composto é capaz de penetrar nos eritrócitos parasitados e marcá-los assim como é possível ver na **figura 33** (p. 94), mostrando que a sonda mesmo acoplada a outra substância, ainda é capaz de penetrar eritrócitos e manter suas características.

Com estes resultados de citometria de fluxo, partimos para as análises de microscopia confocal.

A sonda 3-AFA foi submetida a esta análise a partir do preparo de 5 amostras distintas. Quando amostras contendo sangue infectado incubado com a sonda 3-

AFA foram analisadas, é possível ver (**figura 37**, p. 98) que há a marcação do parasita com o azul desta molécula e que ela marca o citosol, local este que o GFP também atua. Dentre as 5 amostras preparadas somente a que estava parasitada revelou resultados positivos de dupla marcação. Nas demais amostras não houve a entrada da sonda ou expressão de fluorescência (azul), tanto as parasitadas incubadas com DMSO quanto as sadias incubadas com este composto (3-AFA).

Quando analisamos amostras com a sonda 3-AFA ala, foi possível constatar os mesmos resultados citados acima quando a sonda sozinha 3-AFA foi avaliada. Amostras infectadas incubadas com a molécula possuíam dupla marcação, ou seja, o parasita estava expresso com o GFP e marcado (citosol) também com a sonda 3-AFA ala assim como é possível ver na **figura 38** (p. 99).

Este resultado mostra que a sonda possui por si só, um grande potencial em não só marcar o parasita, mas de carrear outros compostos para dentro das células sanguíneas. Isso possibilitou dar continuidade no trabalho podendo então acoplar o fármaco Primaquina nesta sonda e ampliar a sua utilização.

Com isso, resolvemos sintetizar alguns compostos e adaptar a sonda 3-AFA para acoplar a Primaquina nela, dando origem a molécula fluorescente 4-AFAPQ.

Estudos já descritos mostraram que modificações moleculares nos fármacos já utilizados contra a malária tem sido uma abordagem mais eficiente para introduzir novos medicamentos na terapêutica.

Contudo, os testes realizados a partir daí, não mais foram com plasmódio de murinos, mas sim com plasmódio de humano assim como o *P. falciparum* 3D7.

O *P. falciparum*, o mais virulento dos parasitas da malária humana, passa por uma transformação morfológica notável, quando inicia a reprodução sexual e transmissão via mosquito. Na verdade *P. falciparum* é nomeado fazendo uma referência a falciforme.⁸⁷

Com estes conhecimentos e à oportunidade de uma colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Carsten Wrenger, utilizamos o *P. falciparum* 3D7 expressado com GFP. Este parasita 3D7 foi obtido a partir do isolado NF54 inicialmente obtido de um paciente residente perto do Aeroporto de Schiphol, Amsterdã. A origem deste parasita (NF54) tem sido um mistério para a sociedade científica. Alguns estudos recentemente disponibilizados (*Nature*) sugere que o parasita tem sua origem na África.⁸⁸

Sendo assim, a partir destas modificações no gene do parasita NF54 houve a produção do parasita 3D7, possibilitando estudos utilizando estes parasitas.

Os compostos 3-AFA e 4-AFAPQ foram submetidos a análises em microscopia de fluorescência para confirmar sua afinidade por parasitas de amostras vivas de *P. falciparum*.

Neste caso, não houve a necessidade de incubar as moléculas por muito tempo no sangue.

Após o preparo das amostras, foi possível observar (**figura 39**, p. 100) que a sonda 3-AFA marca o citosol parasitário, bem como o GFP.

Quando a molécula 4-AFAPQ foi analisada, observou-se que este composto possui o mesmo efeito da sonda 3-AFA. É capaz de marcar o citosol. É possível observar claramente na **figura 40** (p. 101) que a molécula expressa sua fluorescência somente nas células que estão infectadas, e que esta molécula marca o citosol destes parasitas em seus 3 estágios eritrocíticos (anel, trofozoíto e esquizonte). Células saudáveis como é possível observar na **figura 40-1** (p. 101), não possuem a expressão de fluorescência de GFP e 3-AFA, já que só marcam os parasitas.

Neste caso, o grande desafio seria analisar se estes compostos não marcam o parasita simplesmente, mas se eles podem ser utilizados no tratamento desta doença, ou seja, potencializar o efeito da Primaquina.

Apesar dos métodos atualmente utilizados para diagnosticar a malária como o exame da gota espessa que apesar de apresentar inquestionável vantagem para o diagnóstico, inúmeros fatores podem interferir nos resultados adquiridos, tais como: a habilidade técnica no preparo da lâmina, seu manuseio e coloração; qualidade ótica e iluminação do microscópio; competência e cuidado por parte do profissional além do grau de parasitemia.^{14b} Considerando-se esses fatores, realizar o diagnóstico específico de malária torna-se difícil em muitos locais, seja pela precariedade dos serviços de saúde, seja pela dificuldade de acesso da população aos centros de diagnóstico. Por esta razão, nos últimos 15 anos métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos.¹⁷

Como mostrado anteriormente, é possível confirmar que quando se coloca as moléculas fluorescentes sintetizadas em contato com sangue parasitado, este sangue emite fluorescência. Também é possível ver que quando se incuba as

moléculas com sangue sadio, o mesmo não apresenta fluorescência. Isso nos permite dizer que a sonda entra somente em células infectadas, pois marca estes parasitas, podendo ser confirmado nas análises de microscopia e provando sua seletividade. Com estes resultados podemos propor a utilização destas moléculas na produção de Kits para diagnóstico rápido da malária.

Nesta proposta, a utilização de uma câmara escura para análise de ultravioleta com lâmpada de 4 Watts, meio RPMI 1640 e as moléculas fluorescentes sintetizadas são os únicos materiais essenciais para a execução desta técnica, isso facilitaria muito e com maior rapidez o diagnóstico da malária, além do mais, esta técnica alcançaria locais que hoje não existe o diagnóstico, beneficiando uma maior quantidade de pessoas que vivem principalmente nessas áreas. A **figura 45** exemplifica como é a câmara escura para a utilização na proposta aqui desenvolvida.

Figura 45: Câmara escura para análise de fluorescência

Legenda: Foto de uma câmara escura para análise de fluorescência com lâmpada de 4 Watts para utilização na técnica para diagnosticar a infecção por malária de forma simples, barato e rápida. (SPLABOR).

Muitas vantagens podem ser citadas na utilização dos compostos com esta técnica: o custo é muito mais baixo quando comparado com as técnicas utilizadas atualmente, enquanto um microscópio de fluorescência, utilizado na maioria dos diagnósticos, custa em torno de 165 mil reais uma câmara escura com a lâmpada específica para expressar a fluorescência custa em torno de 2.800 reais e a síntese destes compostos é muito mais barato que corantes utilizados nas outras técnicas já utilizadas. Além da questão financeira, existe nesse caso a facilidade de diagnosticar

a doença em qualquer lugar, mesmo em locais de difícil acesso, pois o material utilizado é de fácil transporte. A necessidade de pessoal bem treinado quando se utiliza microscopia é de extrema importância, e, neste caso, qualquer pessoa com o mínimo de instrução poderia realizar estes testes.

Nestes testes com os compostos sintetizados foram realizadas variações na concentração dos compostos e no tempo de incubação, resultando no gráfico a seguir.

Figura 46: Gráfico de tempo e concentração dos compostos 3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ

Legenda: Porcentagem aproximada de fluorescência (eixo y) com a variação da concentração (µM) (eixo x) em função do tempo de incubação dos compostos fluorescentes sintetizados.

No gráfico da **figura 46**, mostra que a partir de uma concentração de 100 µM já é possível obter resultados satisfatórios de marcação de eritrócitos infectados com a fluorescência dos compostos sintetizados, onde o tempo de incubação não altera significativamente a eficácia das sondas (3-AFA, 3-AFA ala e 4-AFAPQ).

Vale ressaltar que em todos os compostos testados o resultado permaneceu inalterável.

A técnica desenvolvida e a utilização das moléculas para diagnosticar a malária é um grande passo para que tanto o diagnóstico quanto o tratamento alcance pessoas em locais muitas vezes esquecidos pela sociedade.

Quando realizamos testes de EC₅₀ de amostras vivas de *P. falciparum* e analisamos a sonda 3-AFA, não foi possível obter resultados conclusivos porque

mesmo em altas concentrações não chegou ao EC₅₀ (**figura 42–1**, p. 103), mas quando analisamos a 4-AFAPQ em relação aos resultados do fármaco PQ, é possível observar que os resultados pioram em 10 x, mostrando que esse acoplamento não foi o mais viável para tratamento da malária em se tratando da Primaquina.

A PQ inicia seu efeito no crescimento de *P. falciparum* com uma concentração de cerca de 1,8 µM, já a 4-AFAPQ inicia sua ação em cerca de 22,4 µM, possível visualizar na **figura 42–2 e 3** (p. 104).

Quando se fala em mecanismo de ação da Primaquina, podemos dizer que ela possivelmente atua através do stress oxidativo do grupo amino terminal de sua estrutura química.⁸⁹ Quando a molécula 4-AFA foi acoplada, houve um impedimento deste mecanismo de ação do fármaco, pela inativação do grupo amina. Isso explica o EC₅₀ deste composto proveniente do acoplamento (4-AFAPQ), podendo observar que ainda havia muitos parasitas vivos.

Os compostos sintetizados (3-AFA e 4-AFAPQ) foram incubados com células HepG2 e analisados em microscopia de fluorescência para verificar a seletividade destes compostos, mas assim como foi possível observar na **figura 43** (p. 105), houve a marcação do citosol celular. Então podemos dizer que os compostos são seletivos para eritrócitos sadios mas inespecíficos, já que expressam a fluorescência em células HepG2.

Quando analisamos a figura acima citada, é possível observar que a sonda 3-AFA marca o citosol (composto por uma grande parte de água, glicídios, proteínas, aminoácidos, lipídeo, bases nitrogenadas, íons, etc.). Ao contrário do corante de núcleo celular usado para comparar, o HOECHST 33342.

Em se tratando da molécula 4-AFAPQ foi possível observar que possui o mesmo efeito quando comparada a sonda 3-AFA. A molécula 4-AFAPQ marca o citosol celular, também mostrando ser diferente do corante utilizado como comparativo.

Com a aquisição destas imagens através das amostras preparadas podemos ver claramente a afinidade dos compostos fluorescentes sintetizados pelo citosol das células. Não tendo diferenciação em relação a tipo celular, mesmo porque marca parasitas da malária em seu estágio sanguíneo e células que possuem núcleo, mostrando inespecificidade.

Uma explicação bastante coerente em relação a esta afinidade seria as características moleculares destes compostos. A Primaquina é transportada por permeabilidade, o transporte é feito por difusão, e podemos dizer que é transportada por este mecanismo assim como toda a classe das 8-aminoquinolinas e compostos aromáticos que por suas características lipofílicas, atravessam membrana por este mecanismo de difusão.⁹⁰

O teste de EC₅₀ dos compostos fluorescentes sintetizados 3-AFA, 4-AFAPQ e do fármaco PQ foram realizados em HepG2.

Os aminoácidos e os peptídeos têm sido muito utilizados como veículos, devido a pró-fármacos terem sua biodisponibilidade aumentada através da hidrossolubilidade aumentada e/ou declive da toxicidade. Trabalhos publicados já mostraram que a associação de Primaquina com aminoácidos ou peptídeos diminuiu a toxicidade e sua ação permaneceu a mesma. Isso se deve a clivagem seletiva desses peptídeos através da plasmina (uma importante enzima presente no sangue que degrada muitas proteínas do plasma sanguíneo).⁶⁹

A citotoxicidade de compostos no meio intracelular é um impasse o qual é necessário contornar. Mesmo que um composto seja muito eficaz contra algum parasita, microrganismo ou qualquer que seja o organismo vivo é prioridade que não seja tóxico para as células porque perderia totalmente sua utilidade.

Por isso este teste é de extrema importância para avaliar se estes compostos sintetizados podem trazer algum risco tóxico às células.

Assim como descrito na **figura 44-1** (p. 106) a sonda 3-AFA mesmo em uma concentração de 5 mM, não apresentou citotoxicidade, não chegando a 50% de viabilidade, isso impossibilitou o cálculo de EC₅₀.

Já na **figura 44-2** (p. 107) o composto 4-AFAPQ tem um EC₅₀ de 332,4 µM, quando vemos a Primaquina o EC₅₀ é de 392,9 µM, valor este que é 200 vezes maior que o EC₅₀ contra *P. falciparum*, mostra que esse acoplamento do fármaco e a sonda diminui a citotoxicidade em relação a PQ sozinha.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Com a análise do projeto inicial e de todo o trabalho até aqui desenvolvido, podemos relacionar algumas considerações e conclusões relevantes.

Houve a necessidade de troca do título inicial da dissertação de “Síntese de 2,5-diaril/heteroarilfuranos: Potenciais Sondas fluorescentes usadas como biomarcadores em doenças negligenciadas” para “Síntese de 2,5-Diarilfuranos: Potenciais Sondas fluorescentes usadas como biomarcadores em malária”, devido a caminhos diferentes que o trabalho tomou após análise de alguns resultados obtidos. Não sendo possível devido ao tempo, sintetizar compostos heteroarilfuranos e abordar nesta dissertação, além da malária, outras doenças negligenciadas.

A síntese de compostos fluorescentes através de reações de acoplamento tipo Suzuki-Miyaura abriu a possibilidade de produzir compostos acoplados ou não a fármacos que tenham um potencial fluorescente e biológico.

Desta maneira, o composto sintetizado 3-AFA pode ser utilizado para diagnóstico da malária, segundo a proposta descrita neste trabalho, trazendo vantagens em se tratando de custo/benefício porque pode trazer uma grande economia de tempo para diagnóstico já que, a maioria das pessoas acometidas por esta doença vive em locais de difícil acesso. Aumentaria a acessibilidade ao diagnóstico precoce e consequentemente o tratamento muito mais rápido, já que a proposta apresentada necessita de material de fácil manuseio e transporte. Outra vantagem é a economia de recursos monetários, já que desde a síntese dos compostos até a utilização do material necessário é barato e não necessita de pessoal altamente treinado para manuseá-lo. Porém, se faz necessário mais estudos frente a esta proposta, já que o teste não diferencia espécie de plasmódio.

A sonda 3-AFA não é citotóxica para as células podendo ser um bom corante citosólico já que não mata as células por um bom período de tempo (48 horas em HepG2 e 96 horas em células parasitas com *P. falciparum*).

A molécula acoplada ao fármaco Primaquina, a 4-AFAPQ não aumenta a citotoxicidade, porém não melhora a eficiência deste fármaco contra *P. falciparum*, ou seja, não possui atividade parasiticida. Assim, esta junção não foi uma boa escolha para analisar estágios sanguíneos da malária.

Acredita-se que os compostos sintetizados atravessam a membrana celular por difusão,⁹⁰ isso explica a marcação por fluorescência do citosol celular tanto em HepG2 quanto em plasmódio da malária. Características lipofílicas destes compostos, bem como da PQ devem ser evitadas para que a passagem seja por algum mecanismo de transporte, podendo assim, aumentar sua seletividade, porém se fazem necessários mais estudos e testes para confirmar esta proposta.

As moléculas fluorescentes sintetizadas são seletivas para eritrócitos infectados pelo Plasmódio da malária. A especificidade ainda não foi estudada totalmente.

O fato de as moléculas sintetizadas terem afinidade com células infectadas e marcarem citosol celular se deve a ligação a alguma proteína deste processo, então estudos de afinidade para detectar qual proteína os compostos fluorescentes se ligam deveriam ser realizados. Para isso é extremamente necessário dar sequência nas análises para que se conheça claramente o mecanismo pelo qual estes compostos desempenham sua função e assim, poderem ser utilizados para tratamento mais eficaz contra a malária, além da possibilidade de serem utilizados no diagnóstico precoce.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde, **2016**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646>. Acesso em: 07 de mai. 2016.
2. Chan, M. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), World Malaria Report. França. **2015**, 243 p. Página 12.
3. Chan, M. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), World Malaria Report. França. **2015**, 243 p. Página 93. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2015/en/>>. Acesso em: 03 de mai. 2016.
4. Sherman, I. W. *Am. Soc. Microbiology*. Malaria Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection, **1998**, cap 7, p. 93.
5. Miller, L.; Baruch, D.; Marsh, K.; Doumbo, O. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. **2002**, 415, 673.
6. Oliveira, M. S. **Caracterização hematológica, com malária vivax, diagnosticadas e tratadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas-FMTAM**. 2004. 77 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2004. p.18.
7. Correia, A.; Gomes, A.; Eira, J. **Mecanismo de Ação dos Antimaláricos e Emergência de Resistência**. 2011. 30 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Faculdade de Ciências do Porto, Portugal, 2011. p. 05.
8. Kiaran Kirk. *Am. Physiol. Soc.* **2001**, 81, 495.

9. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The biology of malaria parasites**. Report of a WHO Scientific Group. Suíça, 1987. 115 p. Página 63. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40847/1/WHO_TRS_743_\(part1\).pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40847/1/WHO_TRS_743_(part1).pdf)>. Acesso em: 19 de mai. 2016.
10. CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Malaria, Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/index.html>>. Acesso em: 29 de mai. 2016.
11. Ferreira, M. V. D. **Primaquina e Carboxiprimaquina em pacientes com malária vivax**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014. p. 22.
12. BRASIL. Ministério da Saúde, SVS. Guia prático de tratamento da malária no Brasil Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2010**, 38 p. Página 11.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the Treatment of Malaria 2015**. Itália, 2015. 317 p. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>>. Acesso em: 02 de jun. 2016.
14. a) BRASIL. Ministério da Saúde, SVS. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2010**, 118 p. Página 29. b) BRASIL. Ministério da Saúde, SVS. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2010**, 118 p. Página 40.
15. Fontes, C. J. F.; Santelli, A. C. F. S.; Silva, C. J. M.; Tavi, P. L.; Ladislau, J. L. B. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2005**, 38 p. Página 13.

6. Referências

16. Fontes, C. J. F.; Santelli, A. C. F. S.; Silva, C. J. M.; Tavi, P. L.; Ladislau, J. L. B. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2005**, 38 p. Página 15.
17. BRASIL. Ministério da Saúde, SVS. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2010**, 118 p. Página 69.
18. Correia, A.; Gomes, A.; Eira, J. **Mecanismo de Ação dos Antimaláricos e Emergência de Resistência**. 2011. 30 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Faculdade de Ciências do Porto, Portugal, 2011. p. 08.
19. Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. M.; Araújo, M. T.; Silva, B. M. *Sitientibus*. **2006**, 34, 47.
20. Camargo, L. M.; Oliveira, S.; Basano, S.; Garcia, C. R.S. *Ther Clin Risk Manag*. **2009**, 5, 311.
21. Fontes, C. J. F.; Santelli, A. C. F. S.; Silva, C. J. M.; Tavi, P. L.; Ladislau, J. L. B. Guia prático de tratamento da malária no Brasil, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasil. **2005**, 38 p. Página 18
22. Añez, A.; Moscoso, M.; Laguna, A.; Garnica, C., et.al. *Malar J*. **2015**, 14, 261.
23. Rang, H.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. **Farmacologia**. 7. ed. São Paulo. Elsevier, 2011. p. 657.
24. CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Malaria. Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/drugs/Primaquine_pt.pdf>. Acesso em: 20 de mai. 2016.

25. Barros, R. C. M. **Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina – algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro**. 151 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. p. 30.
26. Barros, R. C. M. **Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina – algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro**. 151 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. p. 32.
27. White, N. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **1999**, 354, 739.
28. Canavati, S. E.; Beyl, C.Z.; Boukheng, T. et.al. *Malar J.* **2016**, 15, 249.
29. Filho, F. S. S.; Arcanjo, A. R. L.; Chehuan, Y. M.; Costa, M. R., et.al. *Emerg Infect Dis.* **2007**, 13, 1125.
30. Marques, M. M.; Costa, M. R. F.; Filho, F. S. S., et.al. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**, 58, 342.
31. UNIVERSIDADE NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO. Faculdade de Medicina. **Clínica de Atención Preventiva del Viajero (CAPV)**, 2016. Disponível em: <<http://clinicadelviajero.com.mx/2015/04/08/malaria-en-viajeros/>>. Acesso em: 16 de abr. 2016.
32. Sousa, C. P. M. L. **Detecção de hemozoína em eritrócitos infectados com monitorização do efeito de antimaláricos**. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências de Lisboa. Lisboa, 2013. p. 15.
33. Quashie, N. B.; Duah, N. O.; Abuaku, B. et.al. *Malar J.* **2013**, 12, 450.
34. Heck, R. F. *Angew. Chem.* **1985**, 99, 377.

35. Suzuki, A. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 576, 147.
36. Wolfe, J. P.; Wagaw, S.; Marcoux, J-F.; Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 805.
37. Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 508.
38. Diederich, F.; Stang, P. **Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions**. New York. Wiley-VCH, 1998. p. 495.
39. Netherton, M. R.; Daí, C.; Neuschutz, K.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10099.
40. Farina, V.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. *J. Org. React.* **1997**, 50, 1.
41. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 01.
42. a) Darses, S.; Genet, J-P. *Eur.J. Org. Chem.* **2003**, 4313. b) Molander, G. A.; Figueroa, R. *Aldrichimica Acta*. **2005**, 38, 49. c) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 3623.
43. (a) De Mora, S. J. *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*; Cambridge University Press: Cambridge, **1996**. b) Boyer, I. J. *Toxicology*. **1989**, 55, 253.
44. Pelter, A.; Smith, K.; Brown, H. C. *Borane Reagents*; Academic Press; London, **1988**.
45. For review: a) Petragnani, N.; Stefani, H. A. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 1613. b) Petragnani, N.; Comasseto, J. V. *Synthesis*. **1991**, 793. c) Comasseto, J. V.; Ling, L.

W.; Petraghani, N.; Stefani, H. A. *Synthesis*. **1997**, 373. d) Zeni, G.; Braga, A. L.; Stefani, H. A. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 731.

46. a) Stefani, H. A.; Cella, R.; Dörr, F. A.; Pereira, C. M. P.; Zeni, G., Jr.; Gomes, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 563. b) Cella, R.; Cunha, L. O. R.; Reis, A. E. S.; Pimenta, D. C.; Klitzke, C. F.; Stefani, H. A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 244. c) Cella, R.; Stefani, H. A. *Tetrahedron*. **2006**, 62, 5656. d) Cella, R.; Orfão, A. T. G.; Stefani, H. A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5075.

47. Stanforth, S. P. *Tetrahedron*. **1998**, 54, 263.

48. Rogers, C. W.; Wolf, M. O. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233.

49. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 01.

50. Andrei, G.; Sienaert, R.; McGuigan, C.; et.al. *Am. Soc. Microbiology*. **2005**, 49, 1081.

51. Curini, M.; Cravotto, G.; Epifano, F.; Giannone, G. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 199.

52. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 05.

53. Lakowicz, J. R. University of Maryland School of Medicine. **Principles of fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. 2010. p 1.

54. Centro Estadual de Pesquisas em Sensoriamento Remoto e Meteorologia (CEPSRM), UFRS, Página Dinâmica para Aprendizado do Sensoriamento Remoto. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/engcart/PDASR/rem.html>>. Acesso em 01 de ago. 2016.
55. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 06.
56. UCDAVIS Chemwiki. *Photoluminescence Spectroscopy*. Disponível em: < http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/10_Spectroscopic_Methods/10.6%3A_Photoluminescence_Spectroscopy>. Acesso em: 09 de Abr. 2016.
57. Nagno, T.; Terai, T. *Curr. Opin. Chem. Bol.* **2008**, 12, 515.
58. Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Chien, L.B. *Froc. Natl. Acad. Sc. USA.* **1980**, 77, 990.
59. Wei, L.; Zhu, Z.; Li, Y.; Yi, L.; Xi, Z. *R. Soc. Chem. Adv.* **2015**, doi: 10.1039/C5CC03707G.
60. Loh, C. C. Y.; Suwanarusk, R.; Lee, Y. Q. et.al. *Plos one*. 2014, 9, 10.
61. Combrinck, J. M.; Fong, K. Y.; Smith, P. J. et.al. *Malar J.* **2015**, 14, 253.
62. Bleavins, M. R.; Carini, C.; Romet, M.J.; Rahbari, R. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia. Biomarkers.* **2010**, p. 2-3.
63. Zeni, G.; Lüdtke, D. S.; Nogueira. C. W.; Panatieri, R. B.; Braga, A. L.; Silveira, C. C.; Stefani, H. A.; Rocha, J. B. T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7921.

64. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 42.
65. Solorzano, C.; Antonietti, F.; Duranti, A., et.al. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5770.
66. Botteselle, G. D.V. **Síntese de 2-aril e 2,5-diarilfuranos funcionalizados: potenciais sondas fluorescentes**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 45.
67. Tom, N. J.; Simon, W. M.; Frost, H. N.; Ewing, M. *Tetrahedron Letters*. **2004**, 45, 905.
68. Sliman, F; Desmaële, D. *Synthesis*. **2010**, 4, 0619.
69. Chung, M. C.; Gonçalves, M. F. Gonçalves.; Colli, W. E. I. F and Miranda, M. T. M. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1997**, 86, 1127.
70. Gupta, M.; Paul, S.; Gupta, R.; Loupy, A. *Tetrahedron Letters*. **2005**, 46, 4957.
71. Ligner, P; Estager, J; Kardos, N. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2011**, 18, 28.
72. Kitamura, Y. Hatanaka, K. Murakami, M. Shibata, H. *Am. Soc. Hematology*. **1979**, 53, 1085.
73. Jensen, JB.; Trager, W. *Science*. **1976**, 193, 673.
74. Gupta, N.; Zahn M. M.; Coppens, I., et.al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 164345.
75. Clark, I. A.; Cowden, W. B. *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 221.

76. Nature Reviews Immunology. **Monocytes and macrophages**. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/nri/focus/macrophages/index.html>>. Acesso em: 28 de abr. 2016.
77. Neves, D.P. et.al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo. Atheneu. 2005. 494 p.
78. Zuckerman, A. *Exp Parasitol*. **1964**, 15, 138.
79. Lacerda, L. A. **Bioquímica do tecido animal: O Metabolismo do eritrócito**. 22 f. Seminário. Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. p. 1.
80. Chang, K.; Stevenson, M. M. *Intern. J. Parasitol*. **2004**, 34, 1501.
81. Schofield, L.; Grau, G. E. *Nature*. **2005**, 5, 722.
82. Ry, T. *Annu Rev. Biochem*. **1998**, 67, 509.
83. Tsien, R. Y.; Chalfie, M.; Shimomura, O. The Royal Swedish Academy of Sciences. *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry*. **2008**, p. 1.
84. Jacobberger, J. W.; Horan, P. K.; Hare, J. D. 1983. *Cytometry*. **1983**, 4, 228.
85. van Vianen, P.H.; van Engen, A.; Thaithong, S., et.al. *Cytometry*. **1993**, 14, 276.
86. Sanchez, B. A. M. **Plasmódios transfectados com a proteína de Fluorescência verde (GFP) para ensaios de quimioterapia Experimental**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007. p. 38.
87. Dearnley, M. K.; Yeoman, J. A.; Hanssen, E., et.al. *Journal of Cell Science*. **2012**, 125, 2053.

88. Xin-zhuan Su. *Pathogens and Global Health*. **2014**, 108, 261.

89. Barros, R. C. M. **Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina – algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro**. 151 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. p. 36.

90. Manzano, J. I.; Carvalho, L.; Hernández, R. G., et.al. *J Antimicrob Chemother*. **2011**, 66, 2562.

DADOS
ESPECTROSCÓPICOS E
ESPECTROMÉTRICOS

7. DADOS ESPECTROSCÓPICOS

7.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectro RMN ¹H do composto 1 em CDCl₃ a 300 MHz.

Espectro RMN ¹³C do composto 1 em CDCl₃ a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ^1H do composto **2** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^{13}C do composto **2** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^1H do composto **3** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^{13}C do composto **3** em CDCl_3 a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ¹H do composto **4** em CDCl₃ a 300 MHz.

Espectro RMN ¹³C do composto **4** em CDCl₃ a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ¹H do composto **5** em CDCl₃ a 300 MHz.

Espectro RMN ¹³C do composto **5** em CDCl₃ a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ¹H do composto **6** em CDCl₃ a 300 MHz.

Espectro RMN ¹³C do composto **6** em CDCl₃ a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ^1H do composto **8** em Acetona a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ¹H do composto **9** em Acetona a 300 MHz.

Espectro RMN ¹³C do composto **9** em Acetona a 300 MHz.

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Espectro RMN ^1H do composto **11** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^{13}C do composto **11** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^1H do composto **10** em CDCl_3 a 300 MHz.

Espectro RMN ^{13}C do composto **10** em CDCl_3 a 300 MHz.

7.2. Espectro de Infravermelho (IV)

Composto 2

Agilent Technologies

Sample ID: A125A
 Sample Scans: 32
 Background Scans: 32
 Resolution: 8 cm⁻¹
 System Status: Good
 File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\A125A_2015-09-29T15-12-39.a2r

Method Name: Fred
 User: Admin
 Date/Time: 9/29/2015 3:11:00PM
 Range: 4,000.00 - 650.00
 Apodization: Happ-Genzel

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Composto 8

Agilent Technologies

Sample ID:	A164A acid.carbox	Method Name:	Stanley
Sample Scans:	8	User:	Admin
Background Scans:	8	Date/Time:	6/7/2016 9:17:35AM
Resolution:	4 cm ⁻¹	Range:	4,000.00 - 650.00
System Status:	Good	Apodization:	Happ-Genzel
File Location:	C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\A164A acid.carbox_2016-06-07T09-19-07.a2r

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Composto 9

Agilent Technologies

Sample ID: A179A 4 AFA
Sample Scans: 8
Background Scans: 8
Resolution: 4 cm⁻¹
System Status: Good
File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\A179A 4 AFA_2016-06-07T09-22-52.a2r

Method Name: Stanley
User: Admin
Date/Time: 6/7/2016 9:21:28AM
Range: 4,000.00 - 650.00
Apodization: Happ-Genzel

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Composto 10

Agilent Technologies

Sample ID: A158A
Sample Scans: 8
Background Scans: 8
Resolution: 4 cm⁻¹
System Status: Good
File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\A158A_2016-01-19T14-58-58.a2r

Method Name: Stanley
User: Admin
Date/Time: 1/19/2016 2:57:49PM
Range: 4,000.00 - 650.00
Apodization: Happ-Genzel

7.3. Dados espectrométricos: Espectro de Massa de alta Resolução

Composto 8

PM= 294,09

Zoom em 290

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Zoom região 290

Modo negativo

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Composto 9

PM= 535,25 g/mol

Zoom

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

Modo Negativo

Amostra final, injeção para analisar a absorção

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos_____

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos

7. Dados Espectroscópicos e Espectrométricos_____

Composto **10**

PM= 275,09 g/mol

Zoom

ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 35.2015-P496

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Síntese de 2,5-Diaril/Heteroarilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes Usadas como Biomarcadores em Doenças Negligenciadas**" (Protocolo CEUA/FCF/496), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Ariane Cavalcante dos Santos Sousa**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **12 de junho de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de junho de 2015.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO 2 - CURRÍCULO LATTES

los gerais	Formação	Atuação	Produções	Eventos	Orientações	+
------------	----------	---------	-----------	---------	-------------	---

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2066502653306404>
Última atualização do currículo em 26/08/2016

Possui graduação em Farmácia Bioquímica pela Universidade Paulista (2012). Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos na área de Insumos Farmacêuticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), com ênfase em síntese de Compostos Heterocíclicos. Tem experiência na área de Farmácia, atuando em laboratório de compostos heterocíclicos, principalmente nos seguintes temas: imina, sondas Fluorescentes, doenças negligenciadas como Malária. Possui experiência em técnicas de Laboratório de Toxicologia, como manipulação de animais, entre outros. Experiência em Laboratório de Parasitologia com cultura de células sanguíneas infectadas com cepas de Plasmódio e análises em Microscópio. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Nome em citações bibliográficas

Ariane C.S. Sousa;SOUSA, ARIANE C.S.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Avenida Professor Lineu Prestes, 580, BL 13 superior
Butantã
05508000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913654

Formação acadêmica/titulação

2014

Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Síntese de 2,5-Dianilfuranos: Potenciais Sondas Fluorescentes usadas como Biomarcadores em malária, Orientador: Hélio Alexandre Stefani.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química orgânica.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Malária.

2009 - 2012

Graduação em Farmácia Bioquímica.
Universidade Paulista, UNIP, Brasil.
Título: RELEVÂNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE FARMACOTERAPIA E TERAPIAS NÃO MEDICAMENTOSAS NO CONTROLE DA DOENÇA DE ALZHEIMER.
Orientador: Luis Cesar Farias de Oliveira.
Bolsista do(a): Pronui, PROU, Brasil.

Formação Complementar

2016 - 2016

Extensão universitária em Hexis Day | NOVAS SOLUÇÕES. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 - 2016

Extensão universitária em Pluricell Biotech: aplicando a tecnologia de iPS para resolver os novos des. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 - 2016

Extensão universitária em O case Cristália: Um laboratório voltado para Pesquisa & Inovação. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 - 2016

Extensão universitária em Inovação e propriedade intelectual. Foco em patentes e informações tecnológ. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2016 - 2016

Extensão universitária em British Council Researcher Connect: Disseminando os Conhecimentos Adquirido. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Bases Farmacológicas para prescrição Farmacéutica. (Carga horária: 21h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Introdução à Síntese de Fármacos. (Carga horária: 150h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Noções de Segurança em Laboratórios de Química e B. (Carga horária: 30h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Transition m.catalysis, diversity-oriented syntheses. (Carga horária: 2h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Prospecção BPPs na peçonha Bothrops jararaca de CPP. (Carga horária: 1h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2015 - 2015

Extensão universitária em Parcerias P&D, forma de potencializar a cadeia valor. (Carga horária: 1h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 - 2014

Extensão universitária em Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I. (Carga horária: 45h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 - 2014

Extensão universitária em Conceitos Básicos de Espectroscopia (IQ-USP). (Carga horária: 150h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2013 - 2013

Interpretação da norma NBR ISO 9001-2008. (Carga horária: 16h).
SENAI - Departamento Regional de São Paulo, SENAI/DR/SP, Brasil.

2013 - 2013

Cuidados farmacêuticos em suplementos alimentares. (Carga horária: 9h).
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.

2013 - 2013

Responsabilidade técnica do farmacêutico. (Carga horária: 3h).
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.

2013 - 2013

Eventos adversos e farmacovigilância. (Carga horária: 9h).
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São paulo, CRF-SP, Brasil.

2011 - 2011

Curso de balconista de drogaria com ap.injetáveis. (Carga horária: 72h).
Drogaria Bifarma, DBF, Brasil.

2011 - 2011

Curso de formação de socorristas. (Carga horária: 15h).
Corpo de bombeiros, CB, Brasil.

Aplicação de injetáveis. (Carga horária: 11h).
Centro Universitário Paulistano, UniPaulistana, Brasil.

Atuação Profissional

Drogaria Bifarma, DBF, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2013

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 46, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Recebimento e conferência de estoque de medicamentos; atendimento ao balcão e dispensa de medicamentos; aferição de pressão, realização de teste de glicemia e aplicação de injetáveis.

Pharmaville, PV, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2012

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

Outras informações

Manipulação de cápsulas e sachês, fórmulas homeopáticas, fórmulas semi-sólidas e líquidas. Controle de temperatura do laboratório e acondicionamento dos medicamentos.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Pesquisa e Desenvolvimento, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Idiomas

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Pouco/Lê Pouco.

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

26/08/2016

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Ariane Cavalcante dos Santos Sousa)

Ordem Cronológica

1.

★ STEFANI, HÉLIO A. ; MANARIN, FLÁVIA ; **SOUZA, ARIANE C.S.** ; SOUZA, FREDERICO B. ; FERRAZ, WITOR RIBEIRO . Three-component reaction for the synthesis of diverse β -unsaturated α -amino esters. *Tetrahedron (Oxford, Print)* **JCR**, v. 70, p. 3243-3248, 2013.

Citações: **WEB OF SCIENCE**® 1 | **SCOPUS** 1

Demais tipos de produção técnica

1.

STEFANI, H. A. ; **Ariane C.S. Sousa** . Compostos Heterocíclicos. 2014. .

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Cuidados Farmacêuticos em Dermocosméticos CRF-SP,Cuidados Farmacêuticos em Dermocosméticos, 2013. (Seminário).

2.

Cuidados Farmacêuticos em Suplementos Alimentares - CRF/SP,Cuidados Farmacêuticos em Suplementos Alimentares - CRF/SP, 2013. (Seminário).

3.

Erros de medicação: Responsabilidade Multiprofissional - CRF/SP,Erros de medicação: Responsabilidade Multiprofissional - CRF/SP, 2013. (Seminário).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Orientações de outra natureza

1.

Hélio Alexandre Stefani, Sondas fluorescentes, Início: 2014, Orientação de outra natureza, Universidade de São Paulo, (Orientador).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 26/08/2016 às 11:03:51

Baixar Currículo

Imprimir Currículo

ANEXO 3 - FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 9129271/1 - Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Email: ane.cavalcante@usp.br
Data de Nascimento: 27/02/1990
Cédula de Identidade: RG - 46.195.798-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmácia - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 03/07/2014
Início da Contagem de Prazo: 03/07/2014
Data Limite para o Depósito: 03/01/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Helio Alexandre Stefani - 03/07/2014 até o presente. Email: hstefani@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/07/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/09/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 29/08/2016 14:37:35

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9138 - 9129271/1 - Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	14/08/2014	26/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
QFL5947-2/3	Conceitos Básicos de Espectroscopia (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	25/08/2014	07/12/2014	150	10	100	B	N	Concluída
FBF5712-7/1	Introdução à Síntese de Fármacos	02/03/2015	10/05/2015	150	10	90	B	N	Concluída
QFL5930-4/1	Noções de Segurança em Laboratórios de Química e Bioquímica, Ética e Responsabilidade em Pesquisa (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2015	17/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 29/08/2016 14:37:35

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 9129271/1 - Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
58231	Helio Alexandre Stefani	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 29/08/2016 14:37:35

Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

ANEXO 4 - THREE-COMPONENT REACTION FOR THE SYNTHESIS OF DIVERSE β -UNSATURATED α -AMINO ESTERS

Tetrahedron 70 (2014) 3243–3248

Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tet

Three-component reaction for the synthesis of diverse β -unsaturated α -amino esters

Hélio A. Stefani^{a,*}, Flávia Manarin^b, Ariane C.S. Sousa^a, Frederico B. Souza^a, Witor Ribeiro Ferraz^a

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2013

Received in revised form 25 November 2013

Accepted 29 November 2013

Available online 7 December 2013

Keywords:

Organotrifluoroborates

Lewis acid

Aniline

Ytterbium triflate

Multicomponent reaction

ABSTRACT

We describe an efficient multicomponent reaction for the preparation of β -unsaturated α -amino esters by ytterbium triflate catalyzed reaction of potassium organotrifluoroborate salts, aniline and ethyl glyoxalate. The synthetic viability of this protocol was demonstrated by moderate to high yields, short reaction time ranging from 0.5 to 12 h, and efficiency with respect to substrate scope.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multicomponent reactions (MCRs) occupy a prominent role in organic chemistry due to the possibility of synthesizing both small and large organic molecules with increased diversity and complexity.^{1,2}

This approach is particularly important because it minimizes production of wastes, is rapid, and utilizes simplified workup procedures allowing the construction of diverse chemical libraries of drug-like molecules.^{3,4}

The potential of multiple bond formations among more than two building blocks in a one-step procedure has been widely exploited in combinatorial and medicinal chemistry.^{5,6} Many complex molecules have been synthesized using these methodologies, such as bile acids,⁷ chimeric peptide-steroids,² and anticancer peptides⁸ (Fig. 1).

Unsaturated α -amino acid derivatives are members of non-proteinogenic amino acids isolated from natural products.⁹ In particular, the β -alkynyl α -amino acids, such as ethynylglycine (FR-900130) isolated from *Streptomyces catenulae*,¹⁰ were shown to have antimicrobial activity against Gram-positive bacteria.

Among the available methods to synthesize β -unsaturated α -amino acid derivatives, a few of them have been successfully employed: one of the approaches has been based on the addition of terminal alkynes to α -imino esters using different catalysts (path a).¹¹ An alternative path (b) is the coupling reaction of α -haloglycinates with an excess of alkynyltin reagents (environmentally unfriendly) under reflux conditions.¹² However the most convenient strategy is represented by a three-component coupling reaction of an aldehyde, an amine and alkyne (path c).¹³ This class of reaction has emerged as an attractive and versatile strategy for the generation of novel heterocycles in a step- and atom-economical fashion¹⁴ (Scheme 1).

Fig. 1. Structures of polyfunctionalized molecules.

* Corresponding author. E-mail address: hstefani@usp.br (H.A. Stefani).

Scheme 1. Synthetic strategies to β -unsaturated α -amino acid derivatives.

To the best of our knowledge, there are no reports describing the Lewis acid-catalyzed multicomponent reaction with alkynyltrifluoroborate salts, ethyl glyoxalate, and anilines. Therefore, as part of our ongoing studies to search for new carbon–carbon bond formation processes using potassium organotrifluoroborate compounds,¹⁵ we decided to design a simple, mild, and efficient method for the synthesis of β -unsaturated α -amino acid derivatives.

2. Results and discussion

Using the three-component reaction to synthesize unsaturated α -amino acid derivatives, a preliminary study was developed to evaluate the feasibility of our approach of mixing ethyl glyoxalate, aniline, potassium phenyl ethynyltrifluoroborate, and various Lewis acids as catalysts in dichloromethane as solvent at room temperature as model reagents (Table 1).

Table 1
Optimizing the reaction conditions for the synthesis of 4a

Entry	Catalyst (mol %)	Solvent	Time (h)	Yield (%)
1	Sc(OTf) ₃ (10)	CH ₂ Cl ₂	1	35
2	Yb(OTf) ₃ (10)	CH ₂ Cl ₂	0.5	84
3	Cu(OTf) ₂ (10)	CH ₂ Cl ₂	2	20
4	CuI (10)	CH ₂ Cl ₂	4	44
5	MnCl ₂ (10)	CH ₂ Cl ₂	2	31
6	FeCl ₃ (10)	CH ₂ Cl ₂	2	67
7	In(OTf) ₃ (10)	CH ₂ Cl ₂	1	68
8	Yb(OTf) ₃ (10)	THF	0.5	64
9	Yb(OTf) ₃ (10)	Toluene	3	43
10	Yb(OTf) ₃ (10)	CH ₃ NO ₂	0.5	44
11	Yb(OTf) ₃ (10)	Dioxane	0.3	32
12	Yb(OTf) ₃ (5)	CH ₂ Cl ₂	1	68

We started screening using different Lewis acids as shown in Table 1, and we observed that all afforded the desired product. However, ytterbium triflate gave the best yield (Table 1, entry 2, 84%) and manganese chloride led to a very poor yield (Table 1, entry 5, 31%). We observed a similar yield when we employed indium and iron (Table 1, entries 6 and 7), but the use of iron has a minor inconvenience, i.e., its hygroscopic nature complicates handling.

Next we investigated the influence of the solvent in the reaction and despite of the fact that all others afforded the product, dichloromethane was the most efficient (Table 1, entry 2) and led to completion of the reaction in a short time. Also, we investigated lower catalyst loading (5 mol %), but a decrease in the yield of the reaction was observed (Table 1, entry 12, 68%).

The optimized reaction conditions were extended to create a library of 10 derivatives of β -alkynyl- α -amino acid derivatives (Table 2) and five β -alkenyl- α -amino acid derivatives (Table 3), which were obtained in poor to high yields.

Table 2
Products of the multicomponent reactions

Entry	R–BF ₃ K	Product	Time (h)	Yield (%)
1			0.5	84
2			1.0	70
3			2.0	53
4			12	85
5			2.0	64
6			3.0	65
7			3.0	62
8			4.0	79
9			24	62
10			1.0	76
11			0.6	90

Table 3
Scope of MCRs employing potassium alkenyl and allyltrifluoroborate salts

Entry	R–BF ₃ K	Product	Time (h)	Yield (%)
1			2	57
2			2	30
3			2	38
4			1.6	53
5			2	46
6			1	40
7			1	51
8			50 min	75
9			0.5	81
10			0.5	61

This procedure was efficient for aromatic alkynyltrifluoroborates, such as benzene and biphenyl that afforded the product in 84% and 85% yield, respectively (Table 2, entries 1 and 4). However, with the phenyl group bearing electron-withdrawing species, such as F, the yield drops dramatically to 53% (Table 2, entry 3). For alkynyltrifluoroborates containing electron-donor species, we observed yields ranging from 62% to 70% (Table 2,

entries 2, 5–7, and 9). In the case of cyclopropyl and thiophenyl, the yields were good with 79% and 76%, respectively (Table 1, entries 8 and 10).

Using the same reaction conditions, we tried to prepare vinyl- and allyl- α -amino acid derivatives employing potassium alkenyl- and allyltrifluoroborates as the nucleophilic species (Table 3). In the case of alkenyls, the best yield was achieved with phenylethenyltrifluoroborate with 57% yield (Table 3, entry 1) and to the other two examples poor yields, 30% and 38%, respectively (Table 3, entries 2 and 3). For allyltrifluoroborates, we observed a moderate yield of 53% (Table 3, entry 4) and to entry 5 a poor yield of 46%.

An advantageous aspect of the use of rare earth metal triflates¹⁶ is that the catalyst can easily be recovered from the reaction medium and recycled. We evaluated this possibility of reusing the Yb(OTf)₃ in our reactions. The catalyst was separated from the reaction medium by simple filtration, sequentially washed with dichloromethane, and dried at 70 °C for 2 h. This process was repeated affording the desired product in 76% (first run) and 65% (second run) recovery as shown in Fig. 2.

Fig. 2. Recyclability of the catalyst.

The structures of all products were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, and HRMS analysis.

3. Conclusion

In conclusion, a convergent and mild three-component to synthesize alkynyl-, alkenyl-, and allyl- α -amino esters was developed using ytterbium triflate as catalyst, ethyl glyoxalate, aromatic amine, and organotrifluoroborate salts, affording the products in yields ranging from poor to good. Features of this strategy include mild conditions, convenient one-pot operation, and the possibility of reusing the catalyst. Further investigations are in progress to evaluate the mechanism and their biological activity.

4. Experimental section

4.1. General

Proton nuclear magnetic resonance spectra (¹H NMR) were obtained at 300 MHz. Spectra were recorded in CDCl₃ solution, some of them in DMSO. Chemical shifts are reported in parts per million, referenced to the solvent peak of CDCl₃ or tetramethylsilane (TMS)

as the external reference. Data are reported as follows: chemical shift (δ), multiplicity, coupling constant (J) in Hertz and integrated intensity. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra (^{13}C NMR) were obtained at 75 MHz. Spectra were recorded in CDCl_3 solution. Chemical shifts are reported in ppm, referenced to the solvent peak of CDCl_3 . Abbreviations to denote the multiplicity of a particular signal are s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), quint (quintet), st (sextet), and m (multiplet). Column chromatography was performed using silica gel (230–400 mesh). Thin-layer chromatography (TLC) was performed using silica gel UV₂₅₄, 0.20 mm thickness. For visualization, TLC plates were either placed under ultraviolet light, or stained with iodine or acidic vanillin solution. Dichloromethane was dried and purified.¹⁷ All other solvents were ACS or HPLC grade unless otherwise noted. Air- and moisture-sensitive reactions were conducted in flame-dried or oven-dried glassware equipped with tightly fitted rubber septa and under a positive atmosphere of dry nitrogen. Reagents and solvents were handled using standard syringe techniques.

4.2. Representative procedure for Yb(III)-catalyzed multi-component reaction of alkynyl- or alkenyltrifluoroborate

To the sodium sulfate (5 equiv, 0.355 g), aniline (0.5 mmol, 0.616 g), and ethyl glyoxalate (0.5 mmol, 0.1 mL) in CH_2Cl_2 (5 mL), ytterbium triflate (10 mol %, 0.030 g) and potassium alkynyl-, alkenyl-, and allyltrifluoroborates (0.6 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature until total consumption of the starting material. Afterward, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (3 $\times$ 5 mL), and washed with saturated NaCl solution. The organic phase was dried using MgSO_4 , filtered, and the solvent was removed under reduced pressure.

4.2.1. Recycling procedure for $\text{Yb}(\text{OTf})_3$. The catalyst is separated from the reaction medium by simple filtration, sequentially washed with dichloromethane and dried at 70 °C for 2 h.

4.2.1.1. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-4-phenylbut-3-ynoate (4a). Yield 0.129 g (84%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.41–7.38 (m, 2H), 7.30–7.24 (m, 3H), 6.77 (dd, $J=9.0$ Hz, 4H), 4.94 (s, 1H), 4.30 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.9, 153.3, 139.4 (2C), 131.8, 128.5 (2C), 128.1, 122.1, 116.0 (2C), 114.7 (2C), 84.3, 84.2, 62.3, 55.6, 50.6, 14.0. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 310.1437; found: 310.1435.

4.2.1.2. Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenylamino)but-3-ynoate (4b). Yield 0.118 g (70%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.33 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 6.72 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.28 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 169.1, 159.9, 153.3, 139.6, 133.3 (2C), 116.0 (2C), 114.8 (2C), 114.2, 113.9 (2C), 84.3, 82.8, 62.3, 55.6, 55.2, 50.7, 14.1. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 340.1543; found: 340.1541.

4.2.1.3. Ethyl 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methoxyphenylamino)but-3-ynoate (4c). Yield 0.086 g (53%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.30–7.25 (m, 2H), 6.90–6.84 (m, 2H), 6.87 (t, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.68 (dd, $J=8.9$ Hz, 4H), 4.84 (s, 1H), 4.20 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.64 (s, 3H), 1.22 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.7, 164.2, 160.9, 153.3, 139.3, 133.6 (d, $J=8.5$ Hz), 118.2 (d, $J=3.5$ Hz), 115.9 (2C), 115.4 (d, $J=22$ Hz) (2C), 114.7 (2C), 83.9, 83.2, 62.3, 55.5, 50.5, 13.9. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{FNO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 328.1343; found: 328.1343.

4.2.1.4. Ethyl 4-(biphenyl-4-yl)-2-(4-methoxyphenylamino)but-3-ynoate (4d). Yield 0.163 g (85%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz,

δ (ppm): 7.56–7.33 (m, 9H), 6.82 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.75 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.97 (s, 1H), 4.31 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.9, 153.4, 141.4, 140.2, 139.5, 132.3 (2C), 128.8 (2C), 127.7, 127.0 (2C), 126.9 (2C), 121.0, 116.1 (2C), 114.8 (2C), 84.9, 84.2, 62.4, 55.7, 50.7, 14.1. HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 386.1750; found: 386.1748.

4.2.1.5. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-4-(4-pentylphenyl)but-3-ynoate (4e). Yield 0.121 g (64%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.31 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.93 (s, 1H), 4.29 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.56 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.58 (qui, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.33–1.27 (m, 7H), 0.87 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 169.1, 153.4, 143.8, 139.6, 131.8 (2C), 128.3 (2C), 119.3, 116.0 (2C), 114.8 (2C), 84.6, 83.5, 62.3, 55.6, 50.7, 35.8, 31.4, 30.8, 22.5, 14.1, 14.0. HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 380.2226; found: 380.2221.

4.2.1.6. Ethyl 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-2-(4-methoxyphenylamino)but-3-ynoate (4f). Yield 0.126 g (65%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.84 (s, 1H), 7.65–7.60 (m, 2H), 7.39 (dd, $J=1.5$, 8.5 Hz, 1H), 7.14–7.06 (m, 2H), 6.82 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.76 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.31 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.5, 157.9, 152.9, 139.0, 133.8, 131.2, 128.8, 128.5, 127.8, 126.2, 118.9, 116.5, 115.6 (2C), 114.3 (2C), 105.3, 84.4, 83.3, 61.8, 55.1, 54.8, 50.3, 13.6. HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 390.1700; found: 390.1700.

4.2.1.7. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)oct-3-ynoate (4g). Yield 0.089 g (62%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.78 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.69 (s, 1H), 4.25 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.17 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.47–1.37 (m, 4H), 1.29 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.87 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 169.5, 153.2, 139.7, 115.9 (2C), 114.7 (2C), 85.3, 75.1, 62.0, 55.6, 50.2, 30.4, 21.7, 18.3, 14.0, 13.5. HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 290.1750; found: 290.1749.

4.2.1.8. Ethyl 4-cyclopropyl-2-(4-methoxyphenylamino)but-3-ynoate (4h). Yield 0.107 g (79%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.70 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.57 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 4.58 (s, 1H), 4.17 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.65 (s, 3H), 1.20 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.15–1.09 (m, 1H), 0.68–0.60 (m, 2H), 0.58–0.53 (m, 2H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 169.3, 153.1, 139.5, 115.7 (2C), 114.6 (2C), 88.2, 70.1, 61.9, 55.5, 50.1, 13.9, 8.1 (2C). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 274.1437; found: 274.1435.

4.2.1.9. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-4-(trimethylsilyl)but-3-ynoate (4i). Yield 0.094 g (62%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.87 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.75 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.81 (s, 1H), 4.35 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.37 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.22 (s, 9H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.8, 153.3, 139.5, 116.0 (2C), 114.7 (2C), 100.0, 89.7, 62.2, 55.6, 50.9, 13.9, 0.3. HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 306.1520; found: 306.1518.

4.2.1.10. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-5-(phenylthio)pent-3-ynoate (4j). Yield 0.134 g (76%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.39 (m, 2H), 7.28–7.21 (m, 3H), 6.76 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.61 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 4.69 (t, $J=2.1$ Hz, 1H), 4.22 (dq, $J=2.1$, 7.1 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.57 (d, $J=2.1$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 168.6, 153.2, 139.2, 134.8, 130.3, 128.8, 126.8, 115.8 (2C), 114.7 (2C), 80.4, 78.5, 62.2, 55.5, 49.9, 22.9, 13.9. HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 356.1315; found: 356.1313.

4.2.1.11. Ethyl 2-(4-bromophenylamino)-4-cyclopropylbut-3-ynoate (4k). Yield 0.114 g (71%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz,

δ (ppm): 7.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.60 (s, 1H), 4.38 (s, NH), 4.17 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.23 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.11–1.15 (m, 1H), 0.69–0.60 (m, 2H), 0.58–0.54 (m, 2H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 169.4, 145.1, 1392.5, 116.2, 111.3, 89.2, 70.1, 62.9, 49.48, 14.6, 8.8. HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{Br}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 322.0364; found: 322.0361.

4.2.1.12. (E)-Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-4-phenylbut-3-enoate (4l). Yield 0.089 g (57%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 7.38–7.25 (m, 5H), 6.80–6.75 (m, 3H), 6.65 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.32 (dd, $J=15.9$, 5.8 Hz, 1H), 4.66 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.25–4.22 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 1.30 (t, $J=7.13$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 171.9, 152.7, 140.5, 136.3, 132.8, 128.6, 126.6, 125.4, 115.1, 114.9, 61.7, 59.9, 55.7. HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 312.1594; found: 312.1593.

4.2.1.13. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-3,4-dimethylpent-3-enoate (4m). Yield 0 g (30%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.75 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.52 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.94 (s, 1H), 4.19–4.16 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.24 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 172.4, 152.2, 140.7, 131.0, 124.3, 114.8, 114.6, 61.1, 58.6, 55.7, 21.4, 20.5, 14.1, 12.7. HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 278.1751; found: 278.1749.

4.2.1.14. (E)-Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-3-methylpent-3-enoate (4n). Yield 0.050 g (38%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.68 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.53 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 5.04 (tdd, $J=1.2$, 2.6, 8.6 Hz, 1H), 4.57 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.09 (dq, $J=2.0$, 7.1 Hz, 2H), 3.65 (s, 3H), 1.75 (d, $J=1.2$ Hz, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.15 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 172.9, 152.9, 140.2, 138.8, 121.3, 115.4, 114.8, 81.1, 56.9, 55.7, 25.7, 18.7, 14.1. HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 264.1594; found: 264.1589.

4.2.1.15. Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)pent-4-enoate (4o). Yield 0.066 g (53%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.69 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.58 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 5.72 (dt, $J=7.1$, 17.3 Hz, 1H), 5.05–5.11 (m, 2H), 4.11 (tt, $J=3.9$, 7.7 Hz, 2H), 3.98 (t, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.52 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 1.17 (t, $J=7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 173.9, 153.2, 132.8, 118.8, 115.8, 114.9, 61.1, 57.8, 55.7, 37.0, 14.3. HRMS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 250.1438; found: 250.1431.

4.2.1.16. (E)-Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)hex-4-enoate (4p). Yield 0.060 g (46%). ^1H NMR: CDCl_3 , 300 MHz, δ (ppm): 6.68 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.56 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.65–5.80 (m, 1H), 5.01–5.10 (m, 2H), 4.036–4.136 (m, 2H), 3.79 (dd, $J=5.8$, 16.4 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.63 (td, $J=7.1$, 15.2 Hz, 1H), 1.16 (dt, 1H, $J=4.3$, 7.1 Hz, 3H), 1.08 (dd, $J=2.2$, 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR: CDCl_3 , 75 MHz, δ (ppm): 173.2, 153.0, 141.0, 139.1, 116.3, 115.8, 115.5, 114.9, 62.8, 61.0, 55.7, 41.3, 40.6, 16.4, 14.3. HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 264.1594; found: 264.1588.

4.2.1.17. (E)-Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)dec-3-enoate (4q). Yield 0.063 g (40%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.77 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.59 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 5.89–5.80 (m, 1H), 5.53 (dd, $J=15.3$, 6.2 Hz, 1H), 4.45 (d, $J=6.1$ Hz, 1H), 4.23–4.16 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.08–2.01 (m, 2H), 1.37–1.23 (m, 11H), 0.89 (t, $J=6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.5, 152.6, 140.6, 135.0, 125.5, 115.1, 114.8, 61.3, 59.7, 55.7, 32.2, 31.6, 28.8, 28.6, 22.5, 14.1, 14.0; HRMS (m/z): $[\text{MH}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_3$: 320.2220, found: 320.2198.

4.2.1.18. (E)-Ethyl 2-(4-methoxyphenylamino)-5,5-dimethylhex-3-enoate (4r). Yield 0.074 g (51%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.68 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.52 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 5.83 (d, $J=15.7$ Hz, 1H), 5.37 (dd, $J=15.7$, 6.2 Hz, 1H), 4.37 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 4.13–4.09 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 1.18 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.92 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz,

CDCl_3): δ 172.7, 152.6, 145.5, 140.7, 120.7, 115.2, 114.7, 61.2, 59.9, 55.6, 33.1, 29.3, 14.1; HRMS (m/z): $[\text{MH}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_3$: 292.1907; found: 292.1900.

4.2.1.19. Ethyl 2-(4-methoxy-2-methylphenylamino)-3,4-dimethylpent-3-enoate (4s). Yield 0.109 g (75%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.60 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J=8.9$, 2.8 Hz, 1H), 6.25 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.14–4.04 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.18 (t, $J=7.11$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.6, 151.2, 138.5, 130.7, 124.3, 123.9, 116.9, 111.2, 61.1, 58.4, 55.6, 21.4, 20.5, 17.6, 14.1, 12.5; HRMS (m/z): $[\text{MH}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_3$: 292.1834, found: 292.1830.

4.2.1.20. Ethyl 2-(4-iodophenylamino)-4-methylpent-3-enoate (4t). Yield 0.145 g (81%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.41 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.37 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.07 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.20–4.16 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.27 (t, $J=7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.4, 146.0, 139.2, 137.8, 121.0, 115.6, 78.8, 61.4, 55.4, 25.7, 18.7, 14.1; HRMS (m/z): $[\text{MH}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{INO}_2$: 360.0455, found: 360.0449.

4.2.1.21. (E)-Ethyl 2-(2-chlorophenylamino)-4-phenylbut-3-enoate (4u). Yield 0.105 g (61%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.20–7.11 (m, 5H), 7.10–6.91 (m, 2H), 6.70–6.48 (m, 3H), 6.24 (dd, $J=15.9$, 5.8 Hz, 1H), 5.30 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 4.25–4.22 (m, 2H), 3.90 (s, NH), 1.23 (t, $J=7.13$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.0, 142.3, 136.1, 129.3128.6, 128.6, 127.8, 124.5, 119.8, 118.2, 112.3, 62.6, 58.7, 14.2.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the São Paulo Research Foundation (FAPESP – fellowship to F.M. 2010/15677-58, grant 2012/00424-2) for financial support and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for a fellowship (308.320/2010-7 to H.A.S.).

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.11.107>

References and notes

- Ruijter, E.; Scheffelaar, R.; Orru, R. V. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 6234–6246.
- Rivera, D. G.; León, F.; Concepción, O.; Morales, F. E.; Wessjohann, L. A. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 6417–6428.
- (a) Blackwell, H. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 203–212; (b) Akritopoulou-Zanze, I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 324–331; (c) Bräuer, S.; Alnister, M.; Antuch, W.; Behnke, D.; Taube, R.; Furer, P.; Hess, S. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 218–226; (d) Weber, L. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2085–2093; (e) Hulme, C.; Gore, V. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 51–80; (f) Dömling, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 318–323.
- Fu, L.-P.; Shi, Q.-Q.; Shi, Y.; Jiang, B.; Tu, S.-J. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 135–140.
- Multicomponent Reactions*; Zhu, J., Bienyam, H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
- For review, see: Dömling, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 17–89.
- Rivera, D. G.; Pando, O.; Bosch, R.; Wessjohann, L. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6229–6238.
- Pando, O.; Stark, S.; Denkert, A.; Porzel, A.; Preusentanz, R.; Wessjohann, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7692–7695.
- (a) Li, Y.; Xu, M.-H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2062–2065; (b) Dardenne, G.; Casimir, J.; Marier, M.; Larsen, P. O. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1897–1900.
- Williams, R. M.; Aldous, D. J.; Aldous, S. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1990**, 171–172.
- (a) Ji, J.-X.; Yeung, A.; Wu, J.; Yip, C. W.; Chan, A. S. C. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 42–44; (b) Shao, Z.; Wang, J.; Ding, K.; Chan, A. S. C. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2375–2379.
- Williams, R. M.; Aldous, D. J.; Aldous, S. C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4657–4659.

13. (a) Yoo, W.-J.; Zhao, L.; Li, C.-J. *Aldrichimica Acta* **2012**, *44*, 43–50; (b) Peshkov, V. A.; Pereshivko, O. P.; Van der Eycken, E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3790–3807; (c) Kabalka, G. W.; Venkataiah, B.; Dong, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 729–731; (d) Li, P.; Zhang, Y.; Wang, L. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 2045–2049.
14. (a) Yamamoto, Y.; Hayashi, H.; Saigoku, T.; Nishiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10804–10805; (b) Cao, K.; Zhang, F.-M.; Tu, Y.-Q.; Zhuo, X.-T.; Fan, C.-A. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 6332–6334.
15. (a) Cella, R.; Cunha, R. L. O. R.; Reis, A. E. S.; Pimenta, D. C.; Klitzke, C. F.; Stefani, H. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 244–250; (b) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3623–3658; (c) Vieira, A. S.; Guadagnin, R. C.; Fiorante, P. F.; Ferreira, F. P.; Stefani, H. A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3306–3314; (d) Vieira, A. S.; Fiorante, P. F.; Hough, T. L. S.; Ferreira, F. P.; Ludtke, D. S.; Stefani, H. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5215–5218; (e) Stefani, H. A.; Amaral, M. F. Z. J.; Rangel, G. R.; Caporali, J. V.; Juaristi, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *33*, 6393–6403.
16. (a) Curini, M.; Epifano, F.; Marcotullio, M. C.; Rosati, O. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *9*, 1562–1565; (b) Curini, M.; Epifano, F.; Maltese, F.; Marcotullio, M. C. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *9*, 1631–1634; (c) Kobayashi, S.; Sugiura, M.; Kitagawa, H.; Imai, W. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2227–2302.
17. Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 5th ed.; Elsevier: Great Britain (Cornwall), 2003; p 198.