BIBLIOTECA Faculdade de Ciências Farmacéuticas Universidade de São Paulo

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Insumos Farmacêuticos

Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de pró-fármacos "triglicerídicos" de primaquina

Guilherme Costa Matsutani

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo 2004

17925

DEDALUS - Acervo - CQ



Ficha Catalográfica

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

Matsutani, Guilherme Costa

M434a Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de prófármacos "triglicerídicos" de primaquina / Guilherme Costa Matsutani. -- São Paulo, 2004. 168p.

> Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

> 1. Fármaco: Planejamento: Química farmacêutica 2. Antimaláricos: Farmacodinâmica I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Guilherme Costa Matsutani

Antimaláricos potenciais: planejamento e síntese de pró-fármacos "triglicerídicos" de primaquina

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Elizabeth Igne Ferreira orientadora/ presidente

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato 1° examinador

Profa. Dra. Veni Maria Andrés Felli 2° examinador

São Paulo, 18 de março de 2004.

Ao meu pai Akira Matsutani...

"... O homem que venceu na vida, foi aquele que viveu bem, riu muito e amou muito; conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças; que preencheu um lugar e cumpriu uma missão; que deixa o mundo melhor do que encontrou, seja como uma flor, um poema perfeito, o salvamento de uma alma; que procurou nos outros e deu aos outros o melhor de si mesmo".

AGRADECIMENTOS

- À professora titular Elizabeth Igne Ferreira pelo exemplo de dedicação ao seu trabalho e seus orientados;
- À minha mãe Regina Glycia Matsutani, por uma vida de trabalho, luta, dedicação e amor a mim e minha família;
- Ao professor Carlos Alberto Brandt pela sábia orientação em síntese e análise espectral;
- À professora Veni Maria Felli por todo apoio e orientação;
- À professora Nilsa Wadt por todo incentivo e apoio desde os tempos de graduação;
- À doutora Carla Menezes por toda a revisão e orientação neste trabalho;
- À minha Tia Glicéria Costa, pela moradia, apoio e principalmente amizade nos momentos mais difíceis;
- À minha namorada Érica Torquato e sua família por todo amor e compreensão;
- Aos meus irmãos Nelson Freitas, Regis Costa de Freitas e Fábio de Freitas os quais são mais do que irmãos, verdadeiros pais;
- A parceira de laboratório Kátia Botelho pela paciência diária;
- Ao Colega de laboratório Gustavo Trossini pela amizade e troca de idéias;
- Aos doutores Diogo de Oliveira Silva e Iguatemi Costa, por todos os ensinamentos e parceria;
- Ao doutorando Hélio Santa Rosa Costa e Silva pelas intermináveis discussões em português e inglês;
- A Rachel e Sérgio Salvarani, por terem me recebido em sua casa como um filho;
- Aos meus grandes amigos Israel Clemente, Renato Salvarani e Christian Souza Santos, assim com a suas famílias, por todo incentivo, amizade e carinho:
- A Fundação de Amparo a Pesquisa, FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida a este pós-graduando (Processo: 01/09385-5).

ANTIMALÁRICOS POTENCIAIS: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE TRIGLICERÍDIOS DE PRIMAQUINA

Mestrando: GUILHERME COSTA MATSUTANI
ORIENTADORA: Profa. Titular ELIZABETH IGNE FERREIRA

A malária é uma doença que atinge 40% da população mundial e está entre as três maiores doenças infectantes do planeta, juntamente com a AIDS e a tuberculose. As crianças são as principais atingidas, uma vez que se estima que uma criança morra de malária a cada 40 segundos. As principais regiões atingidas são as que relacionam o clima tropical com altos índices de pobreza, como por exemplo a África sub-Sahariana. Este quadro agrava-se com o surgimento de cepas cloroquino-resistentes do Plasmodium falciparum, principal agente causador da malária grave. Muitos dos fármacos aplicados na terapêutica da malária apresentam inúmeros efeitos adversos, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade, o que dificulta o emprego na terapêutica. Diante deste quadro urge o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. A primaquina, fármaco desenvolvido na segunda guerra mundial, é o único esquizonticida tecidual disponível até o momento, porém apresenta baixa biodisponibilidade, em razão da meia-vida curta, e alta toxicidade. Estas características apresentadas pela primaquina podem ser atenuadas com o emprego da latenciação. O trabalho em questão visa ao desenvolvimento de pró-fármacos "triglicerídicos", também conhecidos com lipóides. Os pró-fármacos lipóides utilizam a digestão e absorção dos lipídeos para promover absorção, aumentando a biodiponibilidade e tempo de meia-vida, consequentemente, diminuindo a toxicidade. Serão sintetizados como transportadores os diglicerídicos dos ácidos palmítico, esteárico e decanóico. Estes ligar-se-ão à primaguina através dos espaçantes succnil, maleil e ftalil.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 MALÁRIA	7
3.1.1 Distribuição geográfica	7
3.1.2 Espécies de Plasmódios	10
3.1.3 Ciclo biológico do parasito	11
3.1.4 Patogenia	16
3.1.5 Quimioterapia da Malária	17
3.1.5.1 Histórico	17
3.1.5.2 Classificação da Terapêutica	19
3.1.5.2.1 Classificação quanto a ação no ciclo	
biológico	19
3.1.5.2.2 Classificação Química	20
3.1.5.2.3 Primaquina	36
3.1.5.2.4 Quimioterapia e Resistência	39
3.1.6 Novas Tendências na Luta Antimalárica	42
3.1.7 O desenvolvimento de pró-fármacos	43
3.1.7.1 Pró-Fármacos Clássicos	44
3.1.7.2 Bioprecursores	46
3.1.7.3 Pró-fármacos mistos	47
3.1.7.4 Fármacos dirigidos	48
3.1.7.5 Pró-fármacos "Triglicerídicos"	50
3.1.8 Planejamento Antimalárico Potencial	54
3.1.8.1 Síntese dos transportadores diglicerídicos	56
3.1.8.2 Síntese utilizando a 1.3-dibromo-2-propanol	60

3.1.8.3 Reações de condensação	62
4. MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 MATERIAL	65
4.2 MÉTODOS	66
4.2.1. Síntese	66
4.2.1.1. Síntese dos transportadores diglicerídicos	66
4.2.1.2 Síntese de hemiamidas de primaquina	66
4.2.1.3. Síntese dos derivados "triglicerídicos" de	
primaquina	67
4.2.3. Análises	68
4.2.3.1 Análise cromatográfica	68
4.2.3.1.1 POR CCD	68
4.2.3.1.2 Determinação da faixa de fusão	69
4.2.3.1.3Análise elementar	69
4.2.3.1.4Espectrometria de massas	69
4.2.3.1.5 Análises espectrométricas	69
5. EXPERIMENTOS	70
5.1 SÍNTESE	70
5.1.1 Síntese dos diésteres do glicerol	70
5.1.1.1 Síntese do 1,3-dipalmitoilglicerol	70
5.1.1.2 Síntese do 1,3-diestearilglicerol	72
5.1.1.3 Síntese do diglicerídeo do ácido decanóico	72
5.1.1.3.1 Tentativa síntese do ácido decanóico	73
5.1.2 Síntese de hemiamidas de primaquina	75
5.1.2.1 Síntese da succinilprimaquina	76
5.1.2.2 Síntese de maleilprimaquina	77
5.1.2.3 Tentativa de síntese da ftalilprimaquina	78

5.1.3 Síntese dos derivados triglicerídicos de	
primaquina	78
5.1.3.1 Síntese da diestearilmaleilprimaquina	79
5.1.3.2 Tentativa de síntese de diestearilsuccinilprimaquina	80
5.1.3.3 Tentativa de síntese de dipalmitoilmaleilprimaquina	81
5.1.3.4 Tentativa de síntese do dipalmitoilsuccinilprimaquina	82
5.1.3.5 Tentativa síntese do dipalmitoilftalilprimaquina	83
5.1.3.6 Síntese do diestearilftalilprimaquina	84
5.1.3.7 Síntese do ftalildiestearilglicerol e	
ftalildipalmitoilglicerol	85
5.1.3.8 Tentativa de síntese do dipalmitoilftalilprimaquina	86
5.1.3.9. Síntese do didecanoilsuccinilprimaquina	87
5.1.3.10. Síntse do didecanoilmaleilprimaquina	88
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
6.1 SÍNTESE DOS DIGLICERÍDIOS DOS ÁCIDOS	
PALMÍTICO E ESTEÁRICO	89
6.1.1 Síntese do diestearilglicerol	97
6.1.2 Síntese do didecanoilglicerol	101
6.1.2.1 Síntese do ácido decanóico	101
6.1.2.2 Síntese do diglicerídio do ácido decanóico	104
6.2 SÍNTESE DAS HEMIAMIDAS DE PRIMAQUINA	107
6.3 SÍNTESE DOS DERIVADOS "TRIGLICERÍDICOS" DE	
PRIMAQUINA	118
6.3.1 Síntese dos derivados diglicerídicos de	
primaquina utilizando o grupo ftalil como espaçante.	136

6.3.1.2	Ten	tativa	de	síntes	e	do
ftalildij	palmitoilg	licerol e ft	alildies	stearilglic	erol	138
6.3.1.3 7	Tentativa de	síntese do	dipalmi	toilftaliprim	aquina.	142
6.4. Síi	ntese dos	derivados	"Trigli	cerídicos"	do á	cido
decanói	ico				***********	145
7. CONC	CLUSÕES PA	ARCIAIS			•••••	149
8. PERS	PECTIVAS F	PARA O TRA	BALHO.			151
9. REFE	RÊNCIAS B	BLIOGRÁFIC	CAS			153

1.INTRODUÇÃO

Considerada como doença social, por estar relacionada com pobreza e falta de condições sanitárias adequadas, a malária é uma das moléstias que causou e ainda causa, mais sofrimento ao ser humano (Sachs, Malaney, 2002).

Atualmente, esta parasitose é uma das mais disseminadas doenças endêmicas nas áreas tropicais e subtropicais (Olliaro, 1996; WHO, 1992). Mais de 40% da população mundial em 101 países encontram-se sob áreas de risco de contaminação. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a malária está entre as três maiores doenças infecciosas do planeta, sendo comparada com a AIDS e tuberculose pelo número de infectados (Roll Back Malaria, 2002) e pelo risco de contrair a parasitose.

Este quadro agrava-se devido ao aparecimento de formas resistentes de *P. falciparum*, o principal agente causador da parasitose. Mudanças climáticas e o desflorestamento também têm contribuído para o aumento do número de infectados (Malária Foundation International, 2001). Estas mudanças levam ao favorecimento da multiplicação do mosquito *Anopheles*, que atua como agente transmissor da doença, assim como à exposição dos humanos ao mosquito infectado.

Anualmente, registram-se no mundo 300-500 milhões de casos clínicos, sendo que 90% destes encontram-se na África sub-Sahariana, onde a pobreza predomina. Não existem dados precisos, porém acredita-se que a mortalidade causada pela malária seja da ordem de um milhão de pessoas por ano, atingindo, principalmente, crianças (Roll Back Malaria, 2002).

Estima-se que uma criança morra a cada 40 segundos, resultando na perda de mais de 2000 crianças por dia devido à parasitose (Sachs, Malaney, 2002). A malária possui estreita relação com pobreza e subdesenvolvimento

sócio-econômico, uma vez que se expande em áreas muito pobres, levando a população a perder sua capacidade de trabalho, aprendizagem e desenvolvimento, promovendo aumento das contaminações pela doença, como um ciclo vicioso. Portanto, nas regiões em que a malária evoluiu muito, a sociedade prosperou pouco (Sachs, Malaney, 2002).

Diversos programas sociais vêm sendo desenvolvidos para o controle da parasitose, principalmente nas áreas mais pobres, onde a doença aumenta constantemente. Estes programas consistem em melhorias sanitárias, erradicação do mosquito através de da aplicação do inseticida DDT em lagoas e pontos de água parada, utilização de "mosquiteiros" sobre camas e, o mais importante, educação da população quanto aos perigos da malária e como evitar o contágio (Roll Back Malaria, 2002).

No Brasil, a mais recente intervenção para o controle da malária foi o Plano de Intensificação das Ações para Controle da Malária na Região Amazônica (PIACM). O PIACM apresentou bons resultados como diminuição de 38% das infestações pela malária e diminuição de 35 % dos óbitos por malária. Visando à maior amplitude no controle desta endemia, o PIACM foi substituído pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Este programa apresenta as principais estratégias no controle da doença:

- Apoio à estruturação dos serviços locais de saúde;
- Diagnóstico e tratamento da doença;
- Fortalecimento da vigilância da malária;
- Capacitação de recursos humanos;
- Educação em saúde, mobilização social;
- Controle seletivo de vetores:
- Pesquisa.

Espera-se que a interação destas estratégias possa diminuir a incidência desta parasitose (Plano Nacional de Controle da Malária, 2002) .

A despeito de estes programas e mesmo com os avanços na terapêutica, a malária é uma doença sem controle total e de preocupação mundial.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Face à necessidade de quimioterápicos realmente úteis contra malária, especialmente malária resistente, e menos tóxicos, em se tratando de malária sensível, é imperativa a busca de novas alternativas que enriqueçam o arsenal terapêutico contra a parasitose.

A primaquina, fármaco desenvolvido durante a segunda guerra mundial (Ferreira, 1982.), surgiu a fim de diminuir os efeitos tóxicos causados pelo seu protótipo, a pamaqina. Atualmente, é o único esquizonticida tecidual disponível na terapêutica, atuando, inclusive, contra os hipnozoítos. Além disto, a primaquina é ativa contra o *P. vivax*, espécie esta que é predominante no Brasil.

Infelizmente, este fármaco apresenta problemas de absorção, alta taxa de biotransformação que pode levar a problemas graves de toxicidade, como anemia intravascular.(Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Olliaro 2001; Casteel, 1993; Augusto, Schereiber, Mason, 1988; Mihaly *et al*, 1984).

Ante à possibilidade de se aprimorar a ação de compostos de atividade comprovada em malária e face aos resultados obtidos com transportadores "triglicerídicos" de outras classes terapêuticas como as descritas por Paris e colaboradores (1980, 1979), Garzon Abuerpeh e colaboradores (1983), Jacob, Hesse e Shashoua (1987), Deverre e colaboradores (1989) e Lambert (2000), pretende-se sintetizar derivados de primaquina utilizando diésteres do glicerol com ácidos graxos – ácidos palmítico, esteárico e outros de cadeia longa, como o decanóico, como transportadores, e ácidos dicarboxílicos – succínico, maléico e ftálico -- como grupos espaçantes.

Grupos espaçantes são utilizados com o propósito de se distanciar o fármaco do transportador de modo a facilitar o acesso da enzima envolvida à ligação compreendida (Korolkovas, 1988). É possível, dessa forma, obter-se própró-fármacos, ou pró-fármacos duplos, ou em cascata, como também são denominados (Friis, Bundgaard, 1996; Wermuth, 1996; Bundgaard, 1991, 1985), permitindo o controle de ação.

Espera-se que os derivados sintetizados, a exemplo do que se observa com os triglicerídeos naturais (Jones, 1980; Lambert, 2000), sejam cindidos pela lipase pancreática nas posições 1 e 3, liberando os monoglicerídeos com a primaquina e espaçante na posição 2 como observa-se na figura 1.

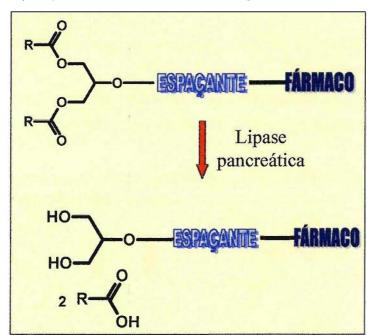


Figura 1: Pró-fármacos triglicerídicos e sua liberação pela lipase pancreática.

Esta liberação do fármaco poderá ser analisada por ensaios *in vitro*, através de hidrólise química, em plasma e em presença de lipase pancreática, como descrito por Scriba (1993).

Após absorção do monoéster derivado, o antimalárico poderá ser liberado paulatinamente, prolongando a ação, diminuindo, em paralelo, a toxicidade. Esta diminuição da toxicidade deve-se ao fato de que com a diminuição da metabolização causada pelo espaçante, ocorrerá também a diminuição da formação de compostos tóxicos.

Os compostos obtidos serão ensaiados em malária experimental em camundongos infectados com *P. berghei*.

A obtenção dos transportadores diglicerídicos foi otimizada em nosso grupo de pesquisa, propondo-se rota sintética de menos passos (Sanai, Ferreira, 2000), representando vantagens em relação àquelas propostas na literatura (Lambert, 2000; Scriba, Lambert, Poupaert, 1995; Scriba, 1993).

Espera-se que o compostos finais apresentem maior biodisponibilidade, maior tempo de meia-vida e, principalmente, menor toxicidade que a primaquina.

A figura 2 mostra os pró-fármacos de primaquina pretendidos:

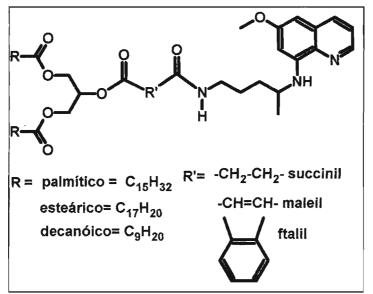


Figura 2: Pró-fármacos "triglicerídicos" de primaquina

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MALÁRIA

A palavra malária é de origem italiana e significa "Mal ar" (Ferreira, 1982), pois, inicialmente, se acreditava que a doença estava ligada às águas paradas e aos insetos oriundos destas águas. Esta teoria foi confirmada por Meckel no início do século XIX, quando conseguiu visualizar pela primeira vez o agente causador da parasitose. Em 1878, Laveram classificou o parasito como *Oscillaria malariae*, posteriormente classificado como *Plasmodium falciparum*.

Acredita-se que esta doença foi responsável pela derrocada de exércitos e até mesmo impérios, como por exemplo o império romano (Ferreira, 1982).

Estudos mostram que esta doença propagou-se principalmente durante as grandes guerras mundiais, nas quais as condições sanitárias eram as piores possíveis e os soldados tornavam-se grande transmissores da doença (Ferreira 1982).

3.1.1 Distribuição geográfica

A malária apresenta sua maior concentração nos trópicos, onde a temperatura encontra-se entre 20 e 30 °C e a umidade é alta. Esta temperatura e a umidade favorecem a multiplicação do anofelinos, transmissores da parasitose (Ferreira, 1982; Roll Back Malaria, 2002).

Na África, principalmente na região sub-saariana, encontram-se os maiores focos da doença em razão de que não só o clima favorece a transmissão da doença, mas também as condições econômicas e sociais (Malaria Foundation International, 2002; Roll Back Malaria, 2002).

Outras regiões como a Ásia e o Oriente médio também se apresentam como áreas de risco para a contaminação pela parasitose.

O mapa (Figura 3) a seguir mostra a distribuição mundial das áreas de risco da malária.

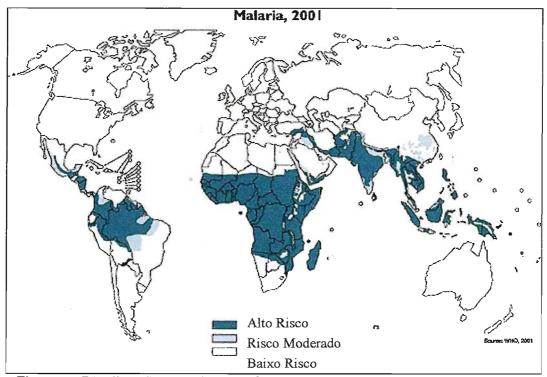


Figura 3: Distribuição mundial das áreas de risco de infecção por malária.

Fonte: Roll Back Malária-WHO, 2002

Em 2000, no Brasil, foram registrados 610.878 novos casos de malária, indicando que houve aumento no número de novos casos em relação ao ano de 1999, em que se registraram 609.504 casos (Funasa, 2002).

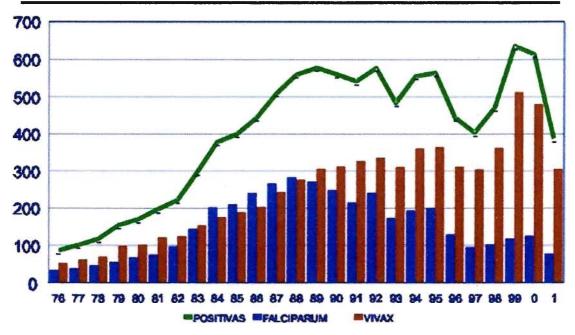
A maioria dos casos de contágio encontra-se nas regiões Norte e Centro-Oeste do País, especialmente na região conhecida como Amazônia Legal, que envolve os estados do Acre, Amapá, Amazônia, a porção oeste do Maranhão, Mato Grosso, Tocantins, Pará, Rondônia, Roraima. A figura 4 mostra as principais áreas de risco de contaminação pela malária no Brasil.



Figura 4: Distribuição das áreas de risco de malária no Brasil.

Fonte: Roll Back Malaria, 2002

Duas espécies de plasmódio predominam como agentes causadores da malária no Brasil, o *P. vivax* e o *P. falciparum*, sendo que o primeiro vem aumentando sua ocorrência, como pode ser observado na figura 5.



FONTE: CEM/SUCAM/FUNASA

Figura 5: Infestações por malária no Brasil por *P.vivax* **X** *P. falciparum.* Fonte: Sucam/Funasa 2002. Disponível na internet em www.funasa.gov.br

3.1.2 Espécies de Plasmódios (Di Santi, Boulos, 2000)

Existem quatro tipos de plasmódios capazes de transmitir a malária aos seres humanos:

- Plasmodium falciparum: responsável pela febre terçã maligna, malária grave e malária cerebral. É o agente responsável pela maioria das mortes relacionadas à malária.
- Plasmodium vivax: responsável pela febre terçã benigna. Encontra-se em todas as regiões onde a malária é endêmica. Pode aparecer na forma mista com a malária causada pelo P. falciparum.
- Plasmodium malariae: parece ser o tipo mais antigo de plasmódio das quatro espécies causadoras da malária. É responsável pela febre quartã.
- Plasmodium ovale: é o mais raro dos quatro tipos de plasmódios, sendo encontrado na África tropical. Apresenta um tipo diferente de febre terçã

benigna, similar à apresentada pelo *P. vivax,* porém com sintomas mais brandos e de mais fácil tratamento.

Deve-se ressaltar que esta classificação terçã e quartã é relativa aos períodos de 48 e 72 horas, que correspondem ao momento em que o plasmódio promove a lise dos eritrócitos. No entanto, esta classificação é meramente didática, uma vez que o número de infestações e de gerações pode promover febre contínua no paciente.

3.1.3 Ciclo biológico do parasito

O parasito da malária desenvolve-se no homem, hospedeiro invertebrado, no qual ocorre a fase assexuada do ciclo – esquizogonia pré-eritrocítica hepática e esquizogonia eritrocítica –, e no mosquito vetor, em que se desenvolve a fase sexuada – esporogonia (Di Santi, Boulos, 2000).

No homem, o ciclo biológico inicia com a injeção de esporozoítos na corrente sangüínea através da picada do mosquito infectado. Os esporozoítos invadem os hepatócitos pela secreção de enzimas proteolíticas encontradas na porção anterior, denominada taça apical. Tais enzimas facilitam a invasão dos hepatócitos. Nestes, inicia-se a fase de esquizogonia tecidual, com a produção de merozoítos a partir de esquizontes teciduais evoluídos dos esporozoítos, que, após romperem a célula infectada, caem na corrente sangüínea, infectando eritrócitos. Esta fase é conhecida como período pré-eritrocítico da malária.

A fase pré-eritrocítica dura sete dias no *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, nove dias no *P. ovale* e treze a dezesseis dias, no *P. malariae*. O número de merozoítos liberados por esquizonte tecidual hepático é de cerca de 40.000, no *P. falciparum*, 10.000, no *P. vivax*, 15.000, no *P. ovale* e 2.000, no *P. malariae* (Di Santi, Boulos, 2000).

Os merozoítos liberados dos merócitos de células hepáticas após a esquizogonia tecidual invadem eritrócitos, transformando-se em trofozoítos jovens. A seguir, estes se transformam em trofozoítos maduros ou amebóides e, por esquizogonia, se transformam em esquizontes, que darão origem a novos merozoítos, liberados no sangue. Os merozoítos podem parasitar novas hemácias ou se diferenciar em gametócitos: macro e microgametócitos (Di Santi, Boulos, 2000).

A esquizogonia sangüínea ocorre em períodos diferenciados, segundo a espécie do parasito, sendo de 24 horas, nos casos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. falciparum*, e de 72 horas, em se tratando de *P. malariae* (Di Santi, Boulos, 2000).

O ciclo esporogônico tem início com a ingestão de micro e macrogametócitos pela fêmea do mosquito anofelino durante a hematofagia. No estômago do mosquito, o microgametócito gera, por exflagelação, em média, oito microgametas. Estes, em constante agitação, rompem a parede do corpo residual do microgameta ganhando a luz estomacal do inseto à procura de macrogametas. Os macrogametócitos variam estruturalmente: de um a dois corpos polares se desenvolvem, formando os macrogametas (Di Santi, Boulos, 2000).

Após a união com o microgametócito, há fusão dos núcleos, gerando o oocineto, que se move intensamente para se encistar na parede do estômago do inseto; com isto, há formação do oocisto ou zigoto. Os esporozoítos são formados por meiose, a partir dos esporoblastos, e são liberados gradualmente do oocisto por perfurações nas células da parede do mesmo (Di Santi, Boulos, 2000).

Estes ganham a hemolinfa, invadindo as vísceras do inseto, incluindo as glândulas salivares, alcançando logo após o duto salivar, de onde iniciam o ciclo após nova hematofagia (figura 6)

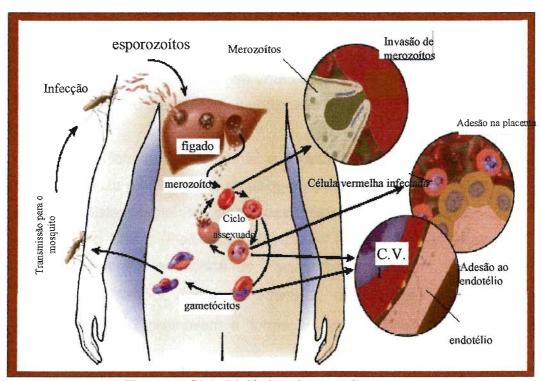


Figura 6: Ciclo biológico do parasita.

Fonte: Adaptado de Miller et al., 2002

O projeto genoma do *Plasmodium falciparum*, desenvolvido através dos esforços de um conjunto internacional de grupos de pesquisadores que têm como participantes The Institute for Genomic Research, The Welcome Trust Sanger Institute, Stanford Genome Technology Center, Liverpool School of Tropical Medicine, entre outros, trouxe informações importantes a respeito do ciclo biológico do agente causador e patogenia da malária (Miller *et al.*,2000).

Uma das constatações mais importantes diz respeito à fase sangüínea do ciclo do *P. falciparum*, mais especificamente a fase intra-eritrocitária. No interior do eritrócito, o plasmódio, por meio dos genes das famílias VAR (Variant antigen), RIF (Repeat Interspeed Family), STEVOR (Subtelomeric Variant Open Reading

Frame) e CLAG (Citoadhesive Linked Asexual Stage Gene), produz proteínas que modificam a membrana do eritrócito infectado, promovendo o fenômeno da citoaderência, em que ocorre a adesão do eritrócito infectado à parede do vaso sangüíneo (Miller *et al.*, 2002; Nogueira, Wunderlich, Silva 2001; Craig, Scherf, 2001; Bowman, Horrocks, 2000). Este processo é importante para o ciclo de vida do plasmódio, pois evita que o eritrócito infectado sofra degradação pelo baço e sistema imune. Esta adesão ainda tem uma segunda função, a de dar tempo para que ocorra a maturação e liberação do trofozoítos.

Como mencionado anteriormente, é necessário que o plasmódio no interior do eritrócito produza proteínas que modifiquem a membrana dessa célula e ocorra a citoadesão. Estas proteínas produzidas pelos genes da família VAR são conhecidas como *Pfemp* (*Plasmodium falciparum erithrocyte membrane protein* - Proteína de membrana eritrocítica do *Plasmodium falciparum*). As *Pfemp* são diferenciadas em *Pfemp-1*, *Pfemp-2* e *Pfemp-3*, com funções diferenciadas. A *Pfemp-2* e a *Pfemp-3* promovem a formação de estruturas conhecidas como *knobs* (figura 7) (Miller et al.,2000).

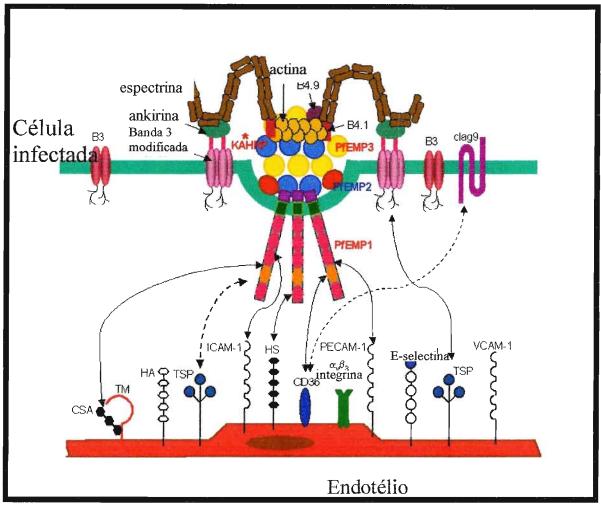


Figura 7: Proteínas de membrana responsáveis pela adesão e seus respectivos receptores.

Fonte: Adaptado de: Malaria parasite metabolic pathways <u>sites.huji.ac.il/malaria/</u>
<u>maps/PfEMP1.html.</u> [acessado em agosto de 2002]

Estas estruturas atuam como suporte para a *Pfemp-1*, proteína diretamente responsável pela citoadesão. A *Clag 9*, proteína expressa pelos genes da família *clag* e localizados na porção subtelomérica do cromossomo 9 do plasmódio, também exerce função semelhante no fenômeno de citoadesão (Miller *et al.*, 2002; Craig, Scherf, 2001; Bowman, Horrocks, 2000).

Tanto a *Pfemp-1* como a *Clag* 9 realizam a fixação do eritrócito infectado ao endotélio, ligando-se a receptores específicos. Entre estes receptores o CD36 realiza papel fundamental, sendo o principal ponto de interação entre o endotélio e as proteínas de adesão. No cérebro os receptores do tipo KHARP (*Knob Associated Hystidine Rich Protein*) exercem igual papel, agravando os casos de malária cerebral. Em contrapartida, a fixação na placenta ocorre através dos receptores CSA e do ácido hialurônico. A Figura 6 mostra as proteínas de membrana e seus respectivos receptores.

Outro fenômeno desvendado pelo seqüenciamento do genoma do plasmódio foi a formação de rosetas. As rosetas, agregados de células sangüíneas infectadas semelhantes a pequenos trombos, são formadas através da expressão dos genes das famílias RIF e STEVOR, juntamente com a família VAR. De maneira similar à citoadesão, as rosetas formam-se através da ligação das proteínas *rifins e stevor*, juntamente com a *Pfemp-1*, a diversos tipos de receptores.

3.1.4 Patogenia

Entre as espécies de *Plasmodium*, somente o *P. falciparum* leva o paciente a quadro fatal, além de envolver cepas extremamente resistentes aos fármacos usuais.

Para a caracterização da patologia malárica, devem ser destacados três elementos principais: febre, acesso malárico e anemia. O acesso malárico, que corresponde à fase de esquizogonia sangüínea, é caracterizado por febre intensa, que se prolonga por períodos de tempo característicos (dias), dependendo da espécie do parasito, culminando com calafrio, calor e suor. O paciente, apesar da febre, sente calafrios por trinta minutos e começa, então, a sensação de calor intenso e a febre pode alcançar 41 °C, assim permanecendo por duas horas,

quando começa a ceder. A periodicidade dos acessos é intimamente determinada pela espécie do parasito, sendo de 48 horas, em *P. vivax* e *P. falciparum*, e 72 horas, no *P. malariae* (Di Santi, Boulos, 2000; Miller *et al.*,2000).

A anemia é provocada por três fatores principais: destruição das hemácias após as esquizogonias, e destruição de hemácias infectadas e sadias no baço, devido à formação de auto-anticorpos por antígenos aderidos à superfície das hemáceas, que não são reconhecidas pelo organismo. Além da anóxia visceral provocada pela anemia, os complexos antígeno-anticorpo dificultam o fluxo sangüíneo, pela aderência dos mesmos na parede vascular. É o que se conhece por marginação eritrocitária, que pode culminar com o edema, anóxia, necrose e morte do paciente, principalmente em infecções de *P. falciparum* (Di Santi, Boulos, 2000; Miller *et al.*,2000).

Nas infecções por *P. falciparum*, alguns fatores indicam prognóstico desfavorável ao paciente, entre eles: alta parasitemia, febre prolongada, icterícia, redução do volume urinário, desorientação e hemorragia.

A evolução da infecção, em geral, depende da cepa do *Plasmodium*, da existência de parasitos resistentes e se o paciente já foi infectado anteriormente ou não. Há casos em que a evolução conduz a quadro de malária grave, tais como hemorragia, edema cerebral e pulmonar, insuficiência renal aguda, entre outros.

3.1.5 Quimioterapia da Malária

3.1.5.1 Histórico

A droga chinesa *Ch'ang Shang*, descrita no "Livro das Ervas",foi o primeiro indício da terapia da malária. Esta droga consistia na raiz pulverizada da planta *Dichroa febrifuga*, utilizada para atenuar os sintomas da malária e febres análogas. Posteriormente, verificou-se a presença do alcalóide febrifugina (Ferreira, 1982).

Um passo de extrema importância para a terapêutica da malária foi o isolamento da quinina no início do século 19. Costuma-se dizer que este alcalóide da *Cinchona* é a substância que mais contribuiu para amenizar o sofrimento da humanidade, sendo largamente aplicada na terapêutica da malária, inclusive na forma de chá de quina. Devido à dificuldade em sintetizar esta substância e ao seu alto custo, este chá de quina foi empregado durante várias décadas (Casteel, 1997).

Em 1891, Ehrlich e Guttmann atribuíram a atividade antimalárica ao cloreto de metíltionínio. Esta descoberta teve grande importância na terapêutica da malária, pois esta estrutura serviu de precursor para o primeiro antimalárico sintético, a pamaquina, obtido em 1924. Posteriormente, Mietzch e Mauss sintetizaram a mepacrina, igualmente potente (Ferreira, 1982).

Durante a segunda guerra mundial houve intenso programa de desenvolvimento de antimaláricos, resultando na síntese de 130.000 a 140.000 novas entidades químicas, algumas delas utilizadas até os dias de hoje. Pode-se citar como exemplo primaquina e a mais utilizada de todas, a cloroquina (Casteel, 1997).

Novamente devido a uma guerra foi criado outro programa de desenvolvimento de antimaláricos. Desta vez os responsáveis foram os americanos, que investiram intensamente na pesquisa de novas substâncias com atividade antimalárica. Foram analisadas aproximadamente 250.000 moléculas afim de proteger os soldados na campanha do Vietnã. Resultado positivo foi a descoberta da mefloquina, fármaco promissor na luta antimalárica (Ferreira, 1982).

Na década de 70 pesquisadores chineses isolaram a artemisinina da Artemisia annua. Esta molécula apresenta alta atividade antimalárica inclusive contra cepas cloroquina-resistentes de *P. falciparum* (Ferreira, 2002).

Mais recentemente, no final da década de 1980, foram, ainda, introduzidas halofantrina e atovaquona (Ferreira, 2002).

Embora exista número grande de moléculas ainda se buscam fármacos que combinem eficácia e segurança na terapêutica da malária e que, também, combatam cepas resistentes do plasmódio (Ferreira, 2002).

3.1.5.2 Classificação da Terapêutica (Williams, Lemke, 2002; Ferreira, 1982)

Os quimioterápicos antimaláricos podem ser classificados quanto à ação no ciclo biológico e quanto à classe química (Williams, Lemke, 2002; Ferreira, 1982).

3.1.5.2.1 Classificação quanto à ação no ciclo biológico

Esta classificação baseia-se na ação em diferentes estágios de desenvolvimento do plasmódio. Segundo ela, os antimaláricos podem ser:

- Esquizonticidas sangüíneos: são fármacos que atuam sobre a fase eritrocítica do plasmódio. Nesta fase encontra-se a maior parte dos antimaláricos, uma vez que é mais fácil o tratamento no sangue. Os esquizonticidas sangüíneos podem ser divididos segundo o tempo necessário para exercerem a sua ação. Antimaláricos como cloroquina, quinina e mefloquina e outros com natureza alcaloídica, como também os derivados endoperóxidos, apresentam ação rápida. Já os fármacos das classes dos antifolatos, pirimetamina e trimetroprima, e antibióticos, como a tetraciclina, necessitam de maior tempo para exercer sua ação e, por isso, devem ser administrados em associação aos primeiros.

- Esquizonticidas teciduais: atuam sobre as formas teciduais primárias do plasmódio existentes no hepatócito, evitando a ocorrência do estágio eritrocítico e posterior transmissão da parasitemia. Esta classe de fármacos tem como exemplo a primaquina e o proguanil. Devido à sua alta toxicidade, a primaquina tem seu uso restrito.
- Gametociticidas: fámacos que atuam sobre a forma sexuada do plasmódio. Estes antimaláricos destroem os gametócitos, impedindo a transmissão para o hospedeiro invertebrado, o mosquito anofelino. São exemplos cloroquina primaquina e quinocida.
- Esporonticidas: atuam sobre a forma infectante do parasita, impedindo a esporogonia no hospedeiro vertebrado. Clorguanil e pirimetamina são exemplos de esporonticidas.

Quanto ao efeito provocado, os antimaláricos podem apresentar três efeitos: cura clínica: alívio dos sintomas sem a eliminação total dos parasitas; cura radical: eliminação completa do parasita, tanto na fase eritrocítica como na fase hepática; efeito quimioprofilático: destruição dos esquizontes teciduais primários ou dos esquizontes à medida que são liberados do tecido para a corrente sangüínea.

3.1.5.2.2 Classificação Química (Woster, 2003; Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Casteel, 1993; Gilles, 1987; Ferreira, 1982)

De acordo com a estrutura química, os antimaláricos, podem ser divididos em:

4-quinolinometanóis

Os principais representantes dos 4-quinolinometanóis são os alcalóides da quina. Estes alcalóides já eram utilizados pelos peruanos, sob a forma de chá da planta, muito antes da chegada dos europeus na América. A quinina, principal alcalóide encontrado na *Cinchona sp,* apresenta alta dificuldade e alto custo em ser sintetizada. Portanto, até os dias de hoje, em regiões de extrema pobreza ainda se toma o chá da planta, ou se realiza-se a extração do alcalóide (Woster, 2003; Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Ferreira, 1982).

Os compostos desta classe apresentam estruturalmente um anel quinolínico substituído na posição 4 por um grupo carbinólico. Estes compostos apresentam na sua cadeia lateral núcleos quínuclidínico ou piperidínico (Williams, Lemke, 2002; Casteel, 1993; Ferreira, 1982).

A principal representante desta classe é a quinina. Esta molécula apresenta na sua cadeia lateral quatro centros quirais, sendo que os encontrados nas posições 8 e 9 são responsáveis pelo aumento ou diminuição da atividade antimalárica de acordo com sua configuração. A quinina apresenta configuração (-)-8S e 9R e a quinidina é o isômero (-)-8R e 9S, duas a três vezes mais ativo que a quinina. A cinchonina e a cinchonidina apresentam a configuração (+)-8R e 9S e (+)-8S e 9R, respectivamente, sendo a cinchonina mais ativa que a cinchonidina.

A figura 8 mostra as estruturas dos quinolinometanóis derivados da quinina.

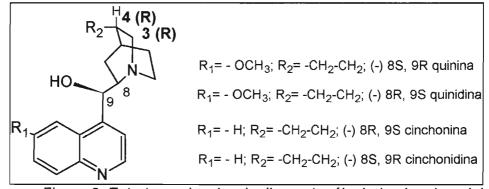


Figura 8: Estruturas dos 4-quinolinometanóis derivados da quinina.

Quanto à relação estrutura-atividade dos 4-quinolinometanóis, deve-se destacar que nas posições 2 e 8 o grupamento trifluormetílico promove aumento da meia-vida. A hidroxila na posição 9 deve ser mantida, pois a oxidação desta leva à perda de atividade. Na posição 6 do anel quinolínico (R₁), há aumento de atividade quando se mantém o grupamento metoxila (Casteel, 1993; Korolkovas, 1982).

Acredita-se que o mecanismo de ação da quinina esteja relacionado com a inibição da formação de hemozoína, resultado da destoxificação do parasita.

Embora estes fármacos tenham sido largamente empregados na terapêutica, com o surgimento de novos agentes quimioterápicos mais potentes, juntamente com o fato de que a dose terapêutica é muito próxima da tóxica, a quinina e seus derivados tiveram o seu uso restringido para cepas resistentes à cloroquina, quando em associação com as tetraciclinas.

4-aminoquinolinas

As 4-aminoquinolinas foram introduzidas durante a segunda guerra mundial. A principal molécula representante desta classe é a cloroquina. Devido à sua alta eficácia e baixa toxicidade a cloroquina foi largamente empregada na terapêutica da malária. Durante a década de 1950, no Brasil, o sal de cloroquina passou a ser incorporado ao sal de cozinha, a fim de promover a profilaxia da parasitose. Esta prática promoveu o surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Williams, Lemke, 2002; Casteel, 1993; Ferreira, 1982; Korolkovas, 1982).

A cloroquina apresenta atividade como esquizonticida sangüíneo e, em casos de cepas sensíveis, promove cura radical.

Quanto às suas características estruturais, as 4-aminoquinolinas clássicas apresentam anel quinolínico, substituído na posição 4 por nitrogênio amínico secundário, ligado a cadeia lateral que mantenha distância de 4 carbonos entre o nitrogênio secundário e o nitrogênio terciário terminal. Substituições nas posições 2 e 8 do anel quinolínico promovem a diminuição da atividade antimalárica. A diminuição da flexibilidade da cadeia lateral através da introdução de anel aromático promove o aumento da atividade e da toxicidade. No nitrogênio terciário, a substituição de um dos grupos etila por hidroximetil leva à molécula da hidroxicloroquina, com potência semelhante à da cloroquina e com atividade antireumática. A figura 9 mostra a estrutura da cloroquina.

Figura 9: Estrutura da cloroquina.

O mecanismo de ação das 4-aminoquinolinas ainda não foi bem elucidado, porém existem três hipóteses: intercalação entre as bases de DNA; inibição da formação da hemozoína e alcalinização do vacúolo digestivo (Casteel, 1993; Korolkovas; 1982.)

Na hipótese da intercalação entre as bases de DNA a cloroquina se intercala entre as bases nitrogeadas, impedindo a transcrição de ácidos nucléicos.

O segundo mecanismo proposto consiste na inibição da formação da hemozoína e é o mecanismo mais aceito. A hemozoína, também conhecida como pigmento malárico, é produto da digestão das hemácias consumidas pelo parasitas. Este pigmento é responsável pela destoxificação do ferro do grupo heme na forma de ferriprotoporfirina. No processo de formação do pigmento, a ferriprotoporfirina é convertida em hemozoína, a qual não apresenta toxicidade

para o parasita. No mecanismo de ação proposto, a cloroquina liga-se à ferriprotoporfirina, formando complexo tóxico ao parasita e também impedindo a polimerização do grupo heme, que geraria a hemozoína (Casteel 1993; Korolkovas, 1982 Ferreira 1982).

O terceiro mecanismo proposto, o da alcalinização do vacúolo digestivo, sugere que o caráter dibásico da cloroquina altere o pH, de 5,2, no interior dessa organela, impedindo, assim, que as enzimas envolvidas na digestão da hemácia exerçam sua atividade (Casteel, 1993; Korolkovas 1982, Ferreira 1982).

Fenantrenometanóis

A classe dos fenantrenometanóis foi descoberta também durante a segunda guerra mundial. Inicialmente, dois fármacos foram os iniciais para esta classe: WR 33,063 e WR 122,455, sendo que ambos apresentavam boa atividade para cepas resistentes à cloroquina. O terceiro a ser sintetizado e principal representante desta classe foi a halofantrina. Este fármaco apresenta-se como esquizonticida sangüíneo, especialmente nos estágios mais maduros do plasmódio (Williams, Lemke, 2002; Casteel, 1993).

A estrutura da halofantrina é composta por um sistema 9-fenantreno substituído com cadeia lateral contendo o grupo dibutilaminopropanol, o qual parece ser o substituinte ideal para a melhor atividade biológica (Casteel, 1993).

A figura 10 mostra a estrutura dos fenantrenometanóis.

Figura 10: 9-Fenantrenometanóis.

No início da década de 1980, pesquisadores da Academia de Ciências Médicas da China introduziram na terapêutica a combinação da lumefantrina, um análogo dos fenantrenometanóis, com o artemeter. Esta associação foi aproveitada pela empresa Novartis, a qual introduziu no mercado a associação sob a marca Coartem ®. A figura 11 mostra a estrutura da lumefantrina.

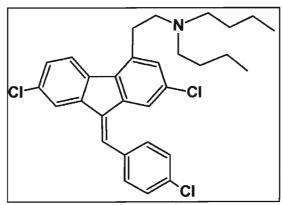


Figura 11: Lumefantrina.

Quanto ao mecanismo de ação desta classe de compostos, este assemelha-se ao das 4-aminoquinolinas, interagindo com a ferriprotoporfirina IX, impedindo a formação da hemozoína (Casteel, 1993).

Sulfonas e sulfonamidas

Com a descoberta da atividade antimalárica da sulfanilamida, diversos derivados foram testados com a finalidade de encontrar novos antimaláricos destas classes.

Entre estes analisados, dois destacaram-se: a sulfadoxina e o sulfametoxipiridazina. Estudos baseados nestes compostos levaram à utilização da dapsona como antimalárico. Também, podem-se citar como exemplos desta classe sulfametoxazol e sulfizoxazol (Williams, Lemke 2002; Casteel, 1993).

Estes compostos apresentam atividade antimalárica devido à sua capacidade de inibir a diidropteroato sintase parasitária, enzima envolvida em uma das etapas de biossíntese de ácido fólico, essencial para o parasita. Estes compostos concorrem com o ácido *p*-aminobenzóico – PABA -- pelo sítio ativo da enzima. Esta classe de compostos apresenta melhor desempenho no combate da malária, quando combinada com outros antifolatos que atuam em outra enzima da

biossíntese de ácido fólico, ou seja, inibindo a diidrofolato redutase (Korolkovas 1982).

Atualmente, estes compostos são recomendados apenas em regiões onde há resistência do *P. falciparum* à cloroquina (Williams, Lemke 2002).

A figura 12 mostra as estruturas das sulfonas e sulfonamidas.

Figura 12: Estruturas das sulfonamidas e sulfonas antimaláricas.

Biguanidas e Triazinas

O principal representante desta classe é o proguanil. Este composto, introduzido na década de 1940, apresenta atividade esporonticida e também esquizonticida tecidual, podendo ser utilizado como agente profilático (Ferreira, 1982).

Após 20 anos da descoberta da atividade antimalárica do proguanil, descobriu-se que a forma ativa deste composto é a sua forma cíclica, o cicloguanil (Ferreira, 1982).

Estudos de relação estrutura-atividade mostram que a adição de átomos de cloro no anel aromático melhora a atividade antimalárica. A figura 13 mostra as estruturas das biguanidas e triazinas.

Figura 13: Biguanidas e triazinas.

O mecanismo de ação destes compostos consiste na inibição da enzima diidrofolato redutase, bloqueando a biossíntese de pirimidinas.

2,4-diaminopirimidinas

A pirimetamina e a trimetoprima são os dois principais fármacos da classe das 2,4-diaminopirirmidinas. A pirimetamina foi desenvolvida em 1950, como antagonista do ácido fólico para emprego como agente antitumoral (Ferreira, 1982).

Esta classe apresenta alta similaridade estrutural com cicloguanil e igual mecanismo de ação. Sua potência é maior que a do proguanil, provavelmente por não necessitar biotransformação (Korolkovas, 1982).

A figura 14 apresenta as estruturas de trimetoprima e pirimetamina.

Figura 14: Estruturas da pirimetamina e trimetroprima.

Acridinas

As acridinas foram introduzidas na terapêutica nos anos 1930, com o desenvolvimento de mepacrina. Este fármaco foi largamente utilizado na segunda guerra mundial, porém atualmente é considerado obsoleto na terapêutica da malária. Esta molécula apresenta atividade de esquizonticida sanguínea de ação rápida, além de ser gametociticida (Williams, Lemke, 1982; Casteel, 1993).

A associação da floxacrina e da pironaridina vem sendo utilizada como esquizonticida sangüíneo. A figura 15 mostra as estruturas das acridinas.

Figura 15: Estruturas das acridinas e derivados.

Naftoquinonas

A atovaquona é o protótipo das 1,4-naftoquinonas. Esta molécula é comercializada sob a marca MALARONE [®], pela empresa GLAXO-SMITHKLINE, em associação com o proguanil (Williams, Lemke, 2002).

Quando administrada na forma de monoterapia, a atovaquona apresenta alto índice de resistência -- 1 em 3 pacientes apresentam formas resistentes do parasita. Em compensação, quando administrada combinada com o proguanil, a cura passa a ser total (Olliaro, 2001).

Acredita-se que este alto índice de resistência esteja relacionado com a alta lipofilicidade da molécula, a qual expõe o parasita a baixas concentrações do fármaco por longo tempo.

A figura 16 mostra a estrutura da atovaquona.

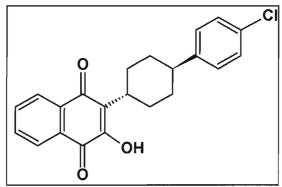


Figura 16: Atovaquona.

A atovaquona atua sobre a cadeia de transporte de elétrons, inibindo, assim, a coenzima Q e, com isto, a biossíntese de timidina é bloqueada (Williams, Lemke, 2002; Olliaro, 2001).

Antibióticos e Outros Antibacterianos

Alguns antibióticos podem ser utilizados na terapêutica da malária. Embora estes compostos não sejam os mais eficazes antimaláricos, seu uso vem sendo reconsiderado, devido ao surgimento das cepas resistentes.

Entre os antibióticos mais utilizados na terapêutica da malária podem-se citar a tetraciclina, a doxiciclina, a clindamicina e a azitromicina. Estes antibióticos são utilizados em associação com outros antimaláricos como a artemisinina e derivados quinolínicos.

Estudos mais recentes têm mostrado que fluorquinolonas como o ciprofloxacino e o norfloxacino podem apresentar atividade antimalárica, porém são necessários estudos mais detalhados.

Artemisinina e derivados contendo "ponte endoperóxido" (Meshinick, 2002; Robert; Benoit-vical, Dechy-Cabaret, 2001)

Os chineses vêm, há muito tempo, utilizando o chá da planta *Artemisia* annua para o tratamento de febre. Na década de 1970, foi isolada da planta a artemisinina (figura 17).

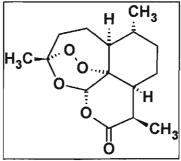


Figura 17: Artemisinina.

A artemisinina apresenta alta atividade antimalárica, inclusive contra cepas resistentes do plasmódio.

Estruturalmente a artemisinina e seus derivados são lactonas sesquiterpênicas apresentando uma ponte endoperóxido, à qual se credita sua atividade antimalárica.

Estudos mostram que esta ponte endoperóxido liga-se ao ferro proveniente do grupo heme, levando à formação de radicais livres, promovendo lesões nos lipídios de membrana e impedindo a formação de proteínas essenciais ao parasita.

O estudo realizado por Robert e colaboradores, em 2001, utilizou manganês para averiguar o provável mecanismo de ação da artemisinina. A figura

18 mostra o modelo para o mecanismo de ação da atemisinina e seus derivados resultante desse estudo.

Figura 18: Mecanismo de ação da artemisinina, Por-porfirina; TPP --. Fonte: Robert; Benoit-vical, Dechy-Cabaret, 2001

Desde a descoberta da artemisinina muitos análogos foram desenvolvidos, muitas vezes visando a simplificações moleculares e muitas vezes ao equilíbrio de sua lipofilicidade.

Uma característica apresentada pela artemisinina é a sua alta lipofilicidade, o que prejudica sua absorção. Diversos pró-fármacos foram sintetizados buscando-se diminuir a lipofilicidade destes compostos. Os principais pró-fármacos sintetizados encontram-se na figura 19:

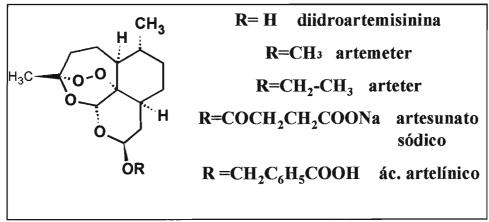


Figura 19: Artemisinina e seus pró-fármacos.

Entre os exemplos de análogos que visam à simplificação molecular da artemisinina, pode-se citar o artefleno. Este derivado encontra-se em fase clínica de testes (Figura 20).

Figura 20: Artefleno.

8-aminoquinolinas (Augusto, Schereiber, Mason, 1988; Mihaly et al., 1984)

As 8-aminoquinolinas foram introduzidas na terapêutica, em 1925, com o desenvolvimento da pamaquina, o protótipo da classe. Seu maior representante é a primaquina. A primaquina apresenta sua maior atividade voltada para o *P. vivax,* atuando principalmente na fase hepática do parasita, sendo o único fármaco ativo contra os hipnozoítos, formas latentes do parasita, evitando recaídas da malária.

Esta classe de antimaláricos apresenta anel quinolínico substituído na posição 8 por um grupo amino ligado a cadeia alquílica lateral. Esta cadeia lateral deve conter o grupo metilbutilamino, obedecendo a distância de 4 carbonos entre os dois nitrogênios. Outra substituição importante para a atividade é a metoxila na posição 6 do anel quinolínico.

Um impedimento para o uso da primaquina como antimalárico corrente na terapêutica é a sua alta toxicidade. O efeito adverso mais grave causado pela primaquina é a anemia hemolítca.

Diversas modificações foram realizadas em sua estrutura visando à diminuição da toxicidade e melhoria de sua atividade. As modificações mais importantes estão relacionadas ao aumento de lipofilicidade. Grupos alquílicos e anéis aromáticos são as principais substituições. Também são encontrados grupos trifluormetílicos.

O composto WR 225448 vem apresentando boa atividade no estágio exoeritrocítico do parasita, em dose eficaz muito menor que a da primaquina. Já o derivado WR 238605 é ativo no estágio pré-eritrocítico, inclusive em cepas cloroquina-resistentes. Este composto também mostra atividade contra hipnozoítos e gametócitos.

A bulaquina vem sendo utilizada na Índia, em associação com a cloroquina e comercializada sob o nome Aabalquin. A figura 21 mostra as principais 8-aminoquinolinas.

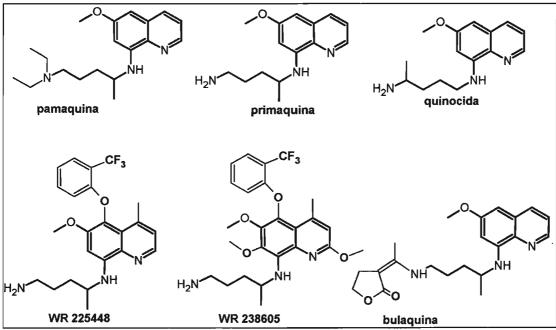


Figura 21: 8-Aminoquinolinas.

3.1.5.2.3 Primaguina

Como anteriormente mencionado, a primaquina foi um dos fármacos desenvolvidos durante a segunda guerra mundial. Estudos posteriores mostram que este fármaco também apresenta atividade antimalárica.

Esta 8-aminoquinolina apresenta atividade principal como esquizonticida hepático, porém pode apresentar atividade como esquizonticida sangüíneo. Uma característica importante da atividade da primaquina é a sua atividade contra hipnozoítos, o que evita a recrudescência. (Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Olliaro 2001; Casteel, 1993; Augusto, Schereiber, Mason, 1988; Mihaly *et al*, 1984).

Devido à sua alta toxicidade, a primaquina não pode ser utilizada por longos períodos, o que dificulta seu emprego na terapêutica. O principal efeito

adverso é a hemólise intravascular. Acredita-se que a primaquina, quando oxidada, leva à formação de radicais livres, os quais promovem a lise celular. Esta hipótese dos radicais livres também está relacionada com seu mecanismo de ação. Por esta hipótese, a primaquina apresenta sua atividade devido à formação de espécies reativas que atuam como radicais livres causando estresse oxidativo . (Dua et al, 2002; Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Casteel, 1993; Vásquez-Vivar, Augusto, 1992; Augusto, Schereiber, Mason, 1988; Mihaly et al, 1984; Ferreira, 1982)

O estresse oxidativo causado pela primaquina está, provavelmente, relacionado com o surgimento de metabólitos fenólicos, como a 6-hidroxiprimaquina e a 5,6-diidroxiprimaquina, os quais posteriormente podem ser oxidados a quinona-imina. Este derivado pode, através de redox-ciclização, gerar espécies reativas de oxigênio. Estas espécies podem se ligar a biomoléculas, o que, possivelmente, é responsável pela atividade antimalárica e pelos efeitos adversos correspondentes (Vásquez-Vivar, Augusto, 1992; Augusto, Schereiber, Mason, 1988)

Pessoas que são deficientes na enzima glicose-fosfato-desidrogenase (G6PD) apresentam maior suscetibilidade à hemólise causada pela primaquina. A G6PD apresenta importante papel no processo redox eritrocitário. A G6PD converte glicose-6-fosfato em 6-fosfoglico-σ-lactona, o que leva à conversão de NADPH em NADPH⁺. O NADPH é utilizado pelo eritrócito para reduzir a forma oxidada da glutationa. A glutationa reduzida atua como um tampão mantendo os resíduos de cisteína da hemoglobina e de outras proteínas no estado reduzido. Níveis reduzidos de G6PD resultam no excesso de NADPH, tornando os ertirócitos especialmente suscetíveis a danos por oxidantes (Williams, Lemke, 2002; Ferreira 2002; Casteel, 1993; Vásquez-Vivar, Augusto, 1992; Augusto, Schereiber, Mason, 1988; Mihaly *et al*, 1984; Ferreira, 1982).

Mihaly e colaboradores (1988) demonstraram que a primaquina sofre alta biotransformação, sendo rapidamente convertida em seu principal metabólito, a carboxiprimaquina. Devido à alta polaridade da carboxiprimaquina, a distribuição torna-se restrita ao plasma, fazendo com que seja eliminada rapidamente (Mihaly et al., 1984).

A alta suscetibilidade da primaquina à biotransformação também é responsável por sua alta toxicidade. O estudo da farmacocínética da primaquina mostra que além da formação da carboxiprimaquina também são geradas as espécies reativas responsáveis, de maneira ambígua, pela atividade e toxicidade. A figura 22 mostra os metabólitos da primaquina.

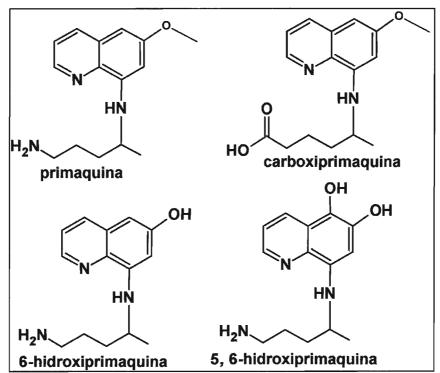


Figura 22: Primaquina e seus principais metabólitos.

A alta taxa de biotransformação da primaquina a torna séria candidata ao uso de pró-fármacos que aumentem sua resistência metabólica e seu tempo de meia-vida, conseqüentemente. Pró-fármacos de primaquina já vêm sendo desenvolvidos e apresentando bom resultados. Vangapandu (2003) e

colaboradores sintetizaram e avaliaram "travas trimetílicas" da primaquina, visando à ação como esquizonticidas sangüíneos.

3.1.5.2.4 Quimioterapia e Resistência

A despeito da existência de agentes antimaláricos úteis e daqueles potencialmente ativos, a prevalência de infecções resistentes e multi-resistentes a fármacos diminui a eficácia de alternativas quimioprofiláticas e quimioterápicas (Ferreira, 2002; Korolkovas, 2002; Greenwood, 1995; Ferreira, 1993; Foster, 1991; Cowman, Foote 1990; Keystone, 1990; Korolkovas, 1988; Gilles, 1987; Bruce-Chwat, 1986; Ferreira, 1982). Ainda que reversores da resistência à cloroquina venham sendo ensaiados (Menezes et al., 1997, 1999, 2002a,b; Srivastava, Pandey, Bhaduri, 1995), a situação é grave, sobretudo no caso de infecções por P. falciparum, nas quais tem-se registrado alta incidência de óbito. Mesmo associações de quimioterápicos, concebidas com o intuito de se diminuir a resistência, têm suscitado o aparecimento de cepas de plasmódios resistentes. Ademais, a mefloquina, alternativa saudada como esperança, sobretudo à malária resistente à cloroquina (Karbwang, 1990), vem suscitando o aparecimento de resistência desde seu lançamento (Olliaro, 1996; Peters, 1995; Panisko, 1990), sobretudo com o uso não racional. Também, a artemisinina (Olliaro, 1996; Panisko, 1990), comercializada em alguns países, como a China, apresenta problemas de biodisponibilidade, provocando recrudescência, especialmente na forma de comprimidos. Pró-fármacos derivados deste antimalárico, entre eles o arteter (Tripathi, 1996), vêm sendo experimentados.

A figura 23 mostra a distribuição mundial de resistência da malária aos quimioterápicos.

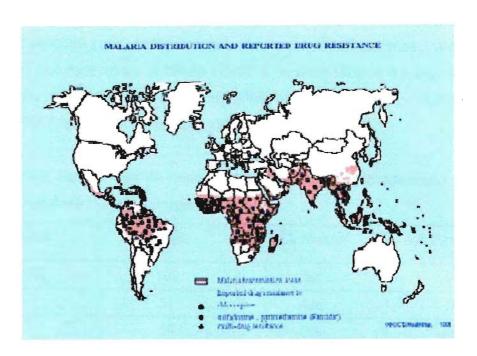


Figura 23: Distribuição mundial da malária resistente Fonte:http://www.who.int

Como mencionado anteriormente, o *P. falciparum* apresenta característica interessante e de extrema importância para o seu combate. A MDR (Multi-Drug Resistance) ou multi-resistência a fármacos foi visualizada primeiramente em células neoplásicas e consiste na capacidade que uma célula apresenta em resistir à ação de diversos antineoplásicos de classes químicas e mecanismos de ação distintos. (Olliaro, 2001).

Muitos são os mecanismos de resistência do plasmódio e tão importante quanto conhecer o mecanismo de ação dos fármacos empregados é conhecer os mecanismos de resistência aos mesmos.

As sulfas, antibacterianos utilizados na quimioterapia da malária, atuam inibindo a enzima diidropteroato sintase (DHPS) e, conseqüentemente, a biossíntese de ácido fólico. Fármacos como as biguanidas e a pirimetamina também impedem a síntese de ácido fólico, porém atuam em outra enzima da

cascata metabólica, a diidrofolato redutase (DHFR). Nos dois casos, o plasmódio promove mutações nos sítios ativos de ambas as enzimas, modificando aminoácidos dos receptores. A tabela I mostra os aminoácidos e suas seqüências nas enzimas normais e nas mutantes (Williams, Lemke, 2002; Olliaro 2001; Casteel, 1993; Gilles. 1987; Ferreira, 1982)

Tabela I: Seqüências de minoácidos das enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase normal e mutante

Enzima	Posição	AA Normal	AA F.resistente
DHFR	108	Ser	Asn
	51	Asn	Ile
	59	Cis	Arg
	164	Ile	Leu
	16	Ala	Val
DHPS	437	Ala	Gli
	540	Lis	Glu
	581	Ala	Gli
	436	Ser	Phe/Ala
	613	Ala	Ser/Tir

Fonte: Olliaro, 2001.

Como mencionado anteriormente, a atovaquona apresenta alto índice de resistência. Quanto ao seu mecanismo de resistência o plasmódio promove alterações no sítio ativo da co-enzima Q responsável pela transferência de elétrons, impedindo a ligação da atovaquona com a co-enzima Q (Woster 2003; Williams, Lemke, 2002; Ferreira, 2002; Olliaro, 2001; Gilles, 1987; Ferreira, 1982)

O mais importante mecanismo de resistência a ser estudado é o mecanismo de resistência às quinolinas, especialmente à cloroquina, uma vez que

este é o principal fármaco empregado na terapêutica da malária. O mecanismo de resistência à cloroquina começa com a super-expressão do gene *Pfmdr-1* (*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance-1). Este gene expressa uma glicoproteína conhecida como glicoproteína P (GPP). Esta glicoproteína pode atuar como canal de transporte ou então como transportador da cloroquina dentro do vacúolo alimentar do plasmódio, promovendo, desta maneira, o efluxo do fármaco. Menezes e colaboradores (1997, 1999, 2001a, 2001b) estudaram a aplicação de fármacos reversores de resistência também conhecidos como quimiosenssibilizantes. Estes podem agir de duas maneiras distintas: promovendo bloqueio físico da GPP e impedindo o efluxo do fármaco, ou inibindo a hidrólise de ATP, necessária para o efluxo.

3.1.6 Novas Tendências na Luta Antimalárica

Diante das dificuldades encontradas na terapêutica da malária, até aqui apresentadas, inúmeros esforços vêm sendo aplicados no desenvolvimento de novas "armas" contra a malária.

Novos alvos vêm sendo pesquisados para o desenvolvimento de antimaláricos, com a cooperação das mais diversas áreas, como a genômica, bioquímica, química e bioinformática (Woster, 2003; Williams, Lemke, 2002; Ferreira, 2002; Ridley, 2002).

A vacina antimalárica vem sendo criada através do esforço multilateral do MustDO (*Multi-Stage DNA-based Malaria Vacine Operation*). Esta vacina pretende atacar a as formas pré-eritrocíticas e eritrocíticas da malária, utilizando como alvos cinco genes que codificam antígenos nas formas pré-eritrocíticas do parasita, desta forma ativando o sistema imune contra o parasita (Woster, 2003; Williams, Lemke, 2002; Ferreira, 2002; Ridley, 2002).

Ainda relacionado com a bioquímica do parasita, Moura e colaboradores (2001) vêm trabalhando na biossíntese de isoprenóides e isoprenilação de proteínas. Tanto os isoprenóides como as proteínas isopreniladas são de grande importância para o parasita. Estes estudos mostram que a mevastatina pode inibir estas etapas do metabolismo do parasita, eliminando-o.

O estudo de quinases, como as CDKs (Cyclin-Dependent Kinases), que controlam a divisão celular, apoptoses, transcrição e diferenciação em células normais e tumorais, vêm sendo alvos promissores para inibidores de crescimento do plasmódio (Woster, 2003).

Mesmo com estes novos alvos e técnicas, a malária ainda é uma doença sem controle e que exige novas armas o mais rápido possível.

3.1.7 O desenvolvimento de pró-fármacos

A latenciação (Chung, Ferreira, 1999; Wermuth, 1996; Wermuth, Gaignault, Marchandeau. 1996; Balant, Doelker, 1995; Bundgaard, 1985, transformação de fármaco em forma de transporte inativa, que, por meio de reações químicas e/ou enzimáticas, libera o fármaco para exercer sua ação, é método bastante promissor de introdução de novos fármacos. Constitui-se em processo de modificação molecular, que visa, sobretudo, a alterações da farmacocinética de fármacos, aumentando-lhes a biodisponibilidade prolongando-lhes a ação. Possibilita, ademais, a resolução de problemas de formulação, que, não raro, se constituem em obstáculo à aplicação terapêutica. Por meio desse processo é possível, também, obter formas latentes de ação seletiva e de toxicidade diminuída. A consecução desses objetivos depende de diversos fatores, ressaltando-se como um dos principais a escolha de transportadores adequados a cada um deles.

De acordo com Wermuth (1996) os pró-fármacos podem ser divididos em :

- Pró-fármacos clássicos
- Bioprecursores
- Pró-fármacos mistos
- Fármacos dirigidos

3.1.7.1 Pró-Fármacos Clássicos

Os pró-fármacos clássicos têm por objetivo promover a melhoria da ação do fármaco através do aumento da biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, aumento da seletividade, aumento do tempo de meia-vida e diminuição da excreção e até mesmo corrigir problemas de formulação. Para promover estas melhorias deve-se escolher o transportador adequado, que apresente as características necessárias para a melhoria pretendida. A característica mais procurada em transportadores é a lipofilicidade, ou pelo menos, grupos que aumentem a lipofilicidade da molécula.

Nos pró-fármacos clássicos os transportadores devem apresentar ligações lábeis, as quais podem ser facilmente cindidas enzimática ou quimicamente. Espera-se que os pró-fármacos sejam inativos ou que possuam menos atividade per se.

Um exemplo de pró-fármaco de *maior biodisponibilidade* é a pivampicilina, em que se obtém maior absorção da ampicilina, através de éster duplo lipofílico. A figura 24 mostra a estrutura da pivampicilina (Friis, Bundgaard, 1996).

Figura 24: Estrutura da pivampicilina.

Takata e colaboradores (1994) corrigem problemas de formulação da vitamina E através da latenciação. Esta vitamina é pouco solúvel em água oque dificulta sua administração parenteral. Através da latenciação pode-se torna-lá mais hidrossolúvel.

A seletividade de um fármaco pode ser aumentada de acordo com seu transportador (figura 25), como é o caso do antibacteriano *N*-acetil-L-γ-glutamilsulfametoxazol, em que ocorre liberação renal do sulfametoxazol, por meio de transportador cuja ligação é especificamente cindida por enzimas, que predominam nos rins (Wilk, Mizoguchi, Orlowski, 1978).

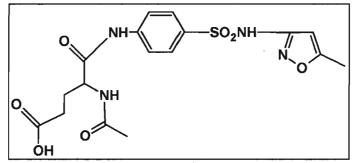


Figura 25: *N*-Acetil-L-γ–glutamilsulfametoxazol.

Os pró-fármacos poliméricos conferem ação prolongada de um fármaco através de sua liberação igualmente prolongada. O pró-fármaco polimérico de

mitomicina C utilizando a succinilquitosana como matriz polimérica apresenta não apenas liberação prolongada, como também, diminuição da toxicidade apresentada pela mitomicina (Song, Onish, Nagai, 1992).

Os *pró-fármacos recíprocos* constituem em estratégia de latenciação em que o transportador também é um fármaco com atividade, porém com mecanismo de ação diferente. A sultamicilina é um exemplo de pró-fármaco recíproco entre a ampicilina, antibiótico β -lactâmico, e o sulbactam, inibidor da β -lactamase. Com isto é possível utilizar a ampicilina em infecções por bactérias resistentes. A figura 26mostra a estrutura da sultamicilina (Singh, Sharma, 1994).

Figura 26: Estrutura da sultamicilina.

3.1.7.2 Bioprecursores

Os bioprecursores não apresentam transportadores como os pró-fármacos clássicos, sendo necessária a biotransformação para originar o fármaco propriamente dito. Os bioprecursores sofrem maiores alterações estruturais que os pró-fármacos clássicos.

O alprazolam, ansiolítico da classe dos benzodiazepínicos, somente é obtido após a ciclização *in vivo* da *N*-alquilaminobenzofenona, sendo um exemplo de bioprecursor (Lahti, Gal, 1976).

A figura 27 mostra a ciclização da *N*-alquilaminobenzofenona em alprazolam.

Figura 27: ciclização da da *N*-alquilaminobenzofenona em alprazolam.

3.1.7.3 Pró-fármacos mistos

Os pró-fármacos mistos consistem na fusão de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores. Neste tipo de pró-fármaco a molécula passa por várias transformações, que permitem a liberação do fármaco em um local específico. Embora a biotransformação ocorra no transportador do pró-fármaco e não no fármaco, o *Chemical Delivery System* (sistema químico de liberação), ou CDS, pode ser enquadrado nessa classe. Neste sistema desenvolvido por Bodor e colaboradores (Prokai, Prokai-Tatrai, Bodor, 2000), o fármaco é ligado ao trigolinato, que corresponde ao ácido nicotínico reduzido. Este complexo confere aumento de lipofilicidade ao fármaco fazendo com que a molécula consiga transpor a barreira hematoencefálica. Uma vez transposta essa barreira, o prófármaco sofre ação do sistema redox, fazendo com que a porção do trigolinato adquira carga e não consiga ultrpassar a barreira. Uma vez "presa", a molécula sofre hidrólise e libera o fármaco. Este tipo de sistema já foi aplicado para a dopamina, fenitoína e vários fármacos antivirais, como a zidovudina. A figura 28 ilustra o mecanismo de liberação do "*Chemical Delivery System*".

Figura 28: Esquema de liberação do Chemical Delivery System.

3.1.7.4 Fármacos dirigidos

Os fármacos dirigidos apresentam transportadores seletivos, que podem interagir com receptores específicos, liberando o fármaco em seu local de ação. Com este planejamento podem-se diminuir efeitos adversos causados pela ação inespecífica de fármacos em outros alvos.

Podem ser utilizados como transportadores para este tipo de latenciação estruturas que interagem com receptores de enzimas ou com sítios presentes na superfície de células-alvo. Entre eles encontram-se peptídeos, polímeros sintéticos, anticorpos monoclonais, eritrócitos e fibroblastos.

O ADEPT (Antibody-Directed Enzime Prodrug Therapy) é um dos mais avançados tipos de fármaco dirigido. Neste tipo de latenciação a terapêutica

ocorre em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a administração de um sistema anticorpo-enzima. Este sistema liga-se ao antígeno alvo encontrado na célula alvo ou ao antígeno presente no fluído extra-celular. Na segunda etapa o pró-fármaco é administrado e sofre hidrólise pela enzima ligada ao anticorpo, liberando o fármaco nos arredores da célula alvo (Takakura, Hashida, 1995).

Anticorpos monoclonais ligados à β -lactamase vêm sendo aplicados no ADEPT. Este sistema apresenta a vantagem de que a β -lactamase é uma enzima bacteriana, não encontrada em seres humanos. Outra vantagem é que se pode latenciar o fármaco com um β -lactâmico, por exemplo uma cefalosporina, que será hidrolisada pela β -lactamase liberando o fármaco (Takakura, Hashida, 1995 . A figura 29 mostra o esquema de liberação do ADEPT.

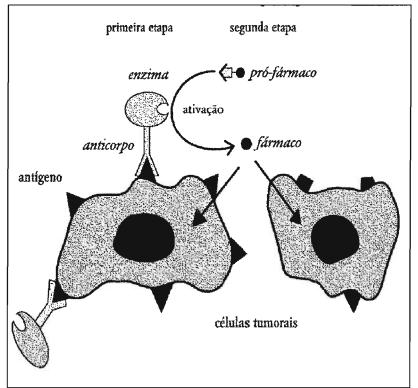


Figura 29: Mecanismo de liberação do ADEPT. Fonte: (Takakura, Hashida, 1995).

Um exemplo de ADEPT que vem sendo estudado com vistas à aplicação na terapêutica antitumoral é aquele que utiliza pró-fármaco cefalosporinadoxorrubicina na segunda etapa. Neste pró-fármaco utilizam-se anticorpos monoclonais antimelanoma.

Sistema baseado no ADEPT que utiliza a genômica como ponto de partida é o GDEPT ou VDEPT(McNeish et al., 1997) estudado com vistas à aplicação em quimioterapia antineoplásica. Este, por meio de técnicas de transfecção ou hibridação no DNA, permite a expressão de determinada enzima em quantidade maior que a encontrada em células normais. Na segunda etapa, administra-se o pró-fármaco ou bioprecursor, especificamente biotransformado pela enzima alvo da expressão.

3.1.7.5 Pró-Fármacos "Triglicerídicos"

Os pró-fármacos "triglicerídicos", também conhecidos como pró-fármacos lipóides, tentam mimetizar triglicerídeos, comportando-se como tal, o que é de grande interesse quando se pretende diminuir efeitos adversos, melhorar a biodisponibilidade e prolongar a ação de um fármaco (Jones, 1980).

O emprego inicial deste tipo de pró-fármaco foi realizado no final da década de 1970, em que foram desenvolvidos pró-fármacos triglicerídicos de AINES – Analgésicos Antiinflamatórios Não-Esteróides --, visando à diminuição da toxicidade gástrica destes compostos (Jones, 1980).

Paris e colaboradores (1979) ligaram o ácido acetilsalicílico diretamente à posição 2 do diglicerídio através de ligação éster. O 1,3-diacil-2-acetilsalicilil diglicerídeo resultante recebeu variações nas cadeias de ácidos graxos, do diglicerídeo, utilizando cadeias mais longas ou cadeias curtas. Estes derivados conseguiam manter a atividade do ácido acetilsalicílico, porém com menos danos

gástricos. Esta estratégia também foi aplicada para outros AINES como a indometacina, o cetoprofeno, ibuprofeno e naproxeno.

Estes pró-fármacos também podem ser utilizados para o direcionamento do fármaco à linfa. Com isto é possível burlar o sistema porta-hepático evitando, assim, a eliminação pré-sistêmica. Como exemplos podem-se citar o GABA e o clorambucil (Jacob, Hesse, Shasoua, 1987; Garzon-Aburpeh *et al.*, 1983) . O clorambucil, quimioterápico utilizado no tratamento de tumores linfáticos, também foi latenciado com diglicerídeo, afim de promover direcionamento para a linfa (Charman, Porter, 1996).

Mais recentemente, Scriba e colaboradores(1993) passaram a desenvolver pró-fármacos "triglicerídicos" de fenitoína com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade, uma vez que o fármaco é pouco lipofílico. Nestes pró-farmacos os diglicerídeos foram ligados ao fármaco através de espaçante succinílico. A figura 30 mostra os diglicerídeos de fenitoína.

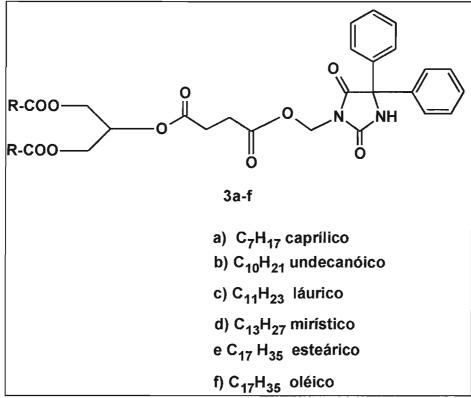


Figura 30: Pró-fármacos diglicerídicos de fenitoína.

Como mencionado anteriormente, os pró-fármacos "triglicerídicos" utilizamse do metabolismo e absorção dos lipídeos para aumentar a absorção do fármaco.

Para a melhor compreensão deste mecanismo, é necessária breve explanação quanto à absorção dos lipídios (figura 31).

Uma vez ingeridos, tanto os lipídios quanto os pró-fármacos "triglicerídicos" iniciam seu processo de "digestão" no intestino delgado. Este processo consiste em três etapas: emulsificação dos glóbulos de gordura, hidrólise enzimática e dispersão dos produtos de digestão em forma absorvível (Charman, Porter 1996).

A lipase pré-duodenal é responsável pelo início do processo de digestão e, juntamente com o suco gástrico, promove a emulsificação inicial conforme mostra a figura 31.

A fase fundamental para os pró-fármacos "triglicerídicos" é a hidrólise enzimática. Os triglicerídeos são, na maior parte, hidrolisados pela lipase pancreática. A lipase pancreática promove a quebra das ligações ésteres dos triglicerídeos com especificidade para as posições 1 e 3, liberando ácidos graxos e o 2-monoglicerídio (Charman, Porter, 1996). Esta é a base para a estratégia dos pró-fármacos lipóides, visto que se o fármaco for ligado à posição 2 do triglicerídio permanecerá intacto até alcançar os vasos sangüíneos (Lambert, 2000; Scriba, Lambert, Poupaert, 1995; Scriba, 1993). A terceira e última fase do processo de digestão compreende a ação dos sais biliares, os quais solubilizam o produto da digestão dos lipídios.

Imediatamente após a fase de digestão inicia-se a absorção. A absorção dos lipídeos ocorre através do sistema linfático, em razão de que os quílomicrons são grandes demais para serem absorvidos pelos capilares, dirigindo-se, portanto, para os vasos linfáticos (Charman, Porter, 1996).

Após a absorção, os ácidos graxos e os 2-monoglicerídeos dão origem à retro-síntese de triglicerídeos. No caso dos pró-fármacos lipóides, esta re-síntese não ocorre, uma vez que o pró-fármaco permanecerá sob a forma de 2-monoglicerídio até alcançar a corrente sangüínea, na qual sofrerá hidrólise por lipases inespecíficas (Charman, Porter, 1996). A figura 31 mostra a absorção dos lipídios e dos pró-fármacos lipóides.

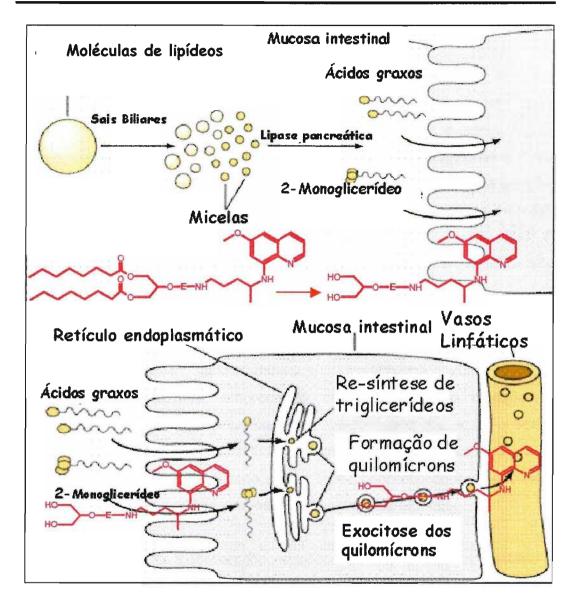


Figura 31: Absorção e digestão dos lipídeos e dos pró-fármacos triglicerídicos.

3.1.8 Planejamento de antimalárico potencial

Infelizmente, o ritmo de desenvolvimento de novos fármacos não acompanhou o agravamento da situação, que se deu com o aumento da incidência de resistência (Olliaro, 1996; White, 1992). Poucos compostos potenciais encontram-se em ensaios na fase clínica. A persistência dessa situação

na próxima década poderá conduzir a situação muito mais grave, com a disseminação de malária completamente não-tratável.

Associações de quimioterápicos antimaláricos. derivados como pirimidínicos e sulfonamidas ou sulfona, como a dapsona e outros, podem ser empregados como alternativa ao tratamento de malária resistente à cloroquina (Korolkovas, 2000; Panisko, 1990; Ferreira, 1982), desde que haja sensibilidade às mesmas: como citado previamente têm sido observadas formas de resistência à associação pirimetamina e sulfadoxina (White, 1991; Panisko, 1990; Payne, 1987). Também, a Organização Mundial da Saúde alerta para os efeitos adversos dessas associações, o que implica busca de derivados de menor toxicidade. Em trabalhos anteriores, Ferreira, Cruz e Korolkovas (1992), Cruz, Ferreira e Korolkovas (1997) sintetizaram formas latentes poliméricas de associações de derivados pirimídicos. pirimetamina е trimetroprima, com sulfonamidas antimaláricas e dapsona, empregando amido e celulose oxidados, como transportadores, com o objetivo de obter pró-fármacos de ação prolongada e menor toxicidade. Alguns dos derivados obtidos mostraram-se ativos em malária experimental por P. berghei (Ohara et al., 1995), utilizando-se o método de ensaio biológico de Osdene e colaboradores (1967), com adaptações.

Por outro lado, a primaquina, esquizonticida tecidual mais utilizado até o presente (Ferreira, 2002; Korolkovas, 2002), têm problemas relacionados à alta toxicidade e à meia-vida curta, em razão da alta taxa de biotransformação à qual é submetida. Derivados menos tóxicos de primaquina vêm sendo sintetizados no sentido de aprimorar a atividade do antimalárico (Ferreira, 1993).

Os pró-fármacos "triglicerídicos" ainda podem diminuir a toxicidade e promover o aumento da absorção de fármacos pouco biodisponíveis.

3.1.8.1 Síntese dos transportadores diglicerídicos

Diglicerídeos vêm sendo empregados nas indústrias alimentícia, cosmética, em síntese orgânicas e como transportadores de fármacos (Bentley, McCrae, 1970)

Diversos são os métodos de obtenção destes diglicerídeos. Estes empregam diversas etapas e reagentes, além do que estes compostos podem apresentar regio-isômeros como os 1,3-diglicerídeos e os 1,2-diglicerídeos, o que dificulta sua obtenção. (Fureby et al, 1977).

Estas sínteses geralmente exigem o emprego de grupos protetores, sendo necessária a posterior desproteção. Estes compostos também podem ser obtidos através de métodos enzimáticos empregando, por exemplo, a lipase pancreática (Fureby et al., 1997). Barry e Craig (1954) iniciaram a metodologia utilizando a 1,3-diidroxi-2-propanona. Esta metodologia foi aprimorada por Bentley e McCrae (1970) e tornou-se a metodologia mais utilizada para a obtenção de diglicerídeos simétricos.

O emprego de protetores requer a posterior clivagem, em seguida à esterificação. Um exemplo de grupo protetor é o β , β -tricloroetoxicarbonil. Este grupo protetor bloqueia a hidroxila secundária mantendo livres as hidroxilas primárias (Windolz, Johnston, 1967). A Figura 32 mostra a obtenção de diglicerídeos utilizando este grupo protetor

Figura 32: Obtenção de diglicerídeo utilizando o grupo protetor β,β -tricloroetoxicarbonil.

A metodologia do éter tritílico consiste na formação de ligação éter na posição 1, seguida da esterificação nas posições 1 e 2. Em seguida ocorre a liberação do grupo tritílico seguido de rearranjo gerando o diglicerídeo simétrico (Hartman, 1958). A figura 33 mostra a obtenção de diglicerídeos utilizando grupo tritil.

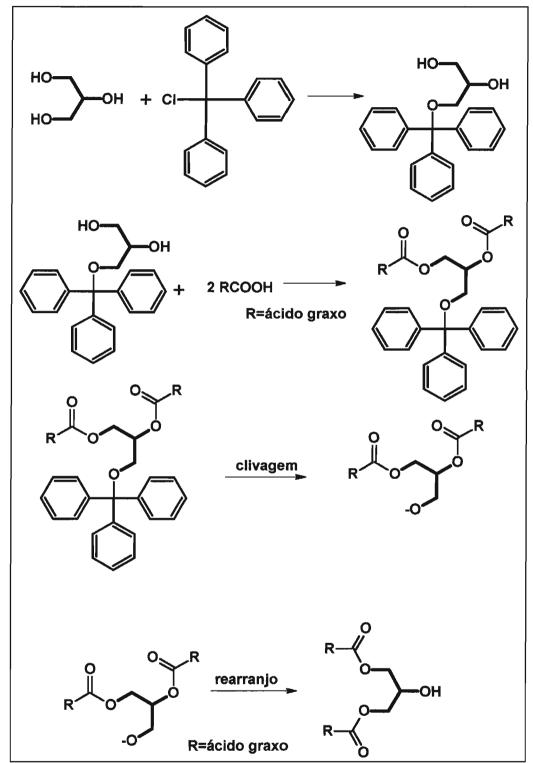


Figura 33: Obtenção de diglicerídeo utilizando o grupo tritílico.

A síntese utilizando a preparação enzimática emprega a lipase pancreática para obtenção do diglicerídeo. Os diglicerídeos são obtidos através da esterificação do glicerol com ácidos graxos como o ácido láurico. Utilizando a enzima extraída do *R. arrhizus* é possível obter rendimento de até 99%. A desvantagem do processo é o tempo de reação de 168 h (Fureby *et al.*, 1997) (figura 34).

Figura 34: obtenção de diglicerídeos por lipase pancreática.

Barry e Craig (1954) desenvolveram a síntese utilizando a 1,3-diidroxipropanona, com o grupo tioéter como grupo protetor. Esta síntese envolve vários passos, o que a torna muito trabalhosa. Em conseqüência, Bentley e McCrae (1970) aperfeiçoaram esta metodologia, originando a metodologia para síntese de dilglicerídeos mais utilizada. Nesta síntese ocorre a esterificação entre cloreto de ácido e a 1,3-diidroxipropanona, com a posterior redução da cetona a álcoól. A figura 35 mostra a síntese desenvolvida por Bentley e McCrae.

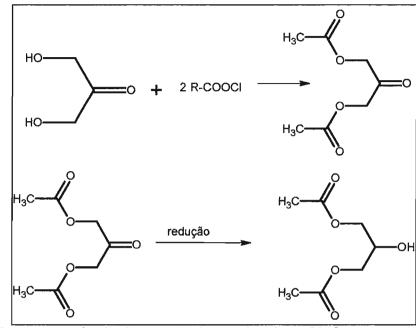


Figura 35: método desenvolvido por Bentley e McCrae (1970)

3.1.8.2 Síntese utilizando a 1,3-dibromo-2-propanol

Uma nova síntese de diglicerídeo foi planejada em nosso laboratório, sendo iniciada por Sanai e Ferreira (2000). Nesta metodologia utilizava-se a 1,3-dicloro-2-propanol. Esta rota sintética inicial conduziu à síntese empregada neste trabalho, utilizando a 1,3-dibromo-2-propanol (dibromidrina).

A substituição da dicloridrina pela dibromidrina é justificada pelo fato de o bromo ser grupo abandonador melhor que o cloro. A esterificação ocorre entre o bromo e o ácido graxo, utilizando o 1,8-diazobiciclo[5,4,0,]undec-7-eno (DBU) como catalisador.

O método de obtenção de ésteres utilizando haletos orgânicos e ácido carboxílico surgiu com o trabalho de Ono e colaboradores (1978), os quais sintetizaram diversos ésteres através deste método, incluindo ésteres de aminoácidos. A grande vantagem desta reação está na sua facilidade de obtenção, relativamente curto tempo de preparação e bom rendimento.

A principal diferença entre este método e os demais processos de obtenção de ésteres está no íon carboxilato formado. Nesta síntese, o par iônico não fica livre como em outras sínteses, surgindo um complexo entre o carboxilato e o DBU(A), formado por ligação de hidrogênio entre o hidrogênio do ácido carboxílico e os nitrogênios do DBU. Carboxilatos podem atacar tanto o hidrogênio como o carbono do haleto, porém este complexo ataca preferencialmente o carbono ligado ao halogênio. Pode-se dizer que este tipo de reação se caracteriza como reação do tipo SN₂ (Furniss *et al.*, 1988).

A figura 36mostra o mecanismo de reação entre haleto e ácido carboxílico, utilizando DBU como catalisador.

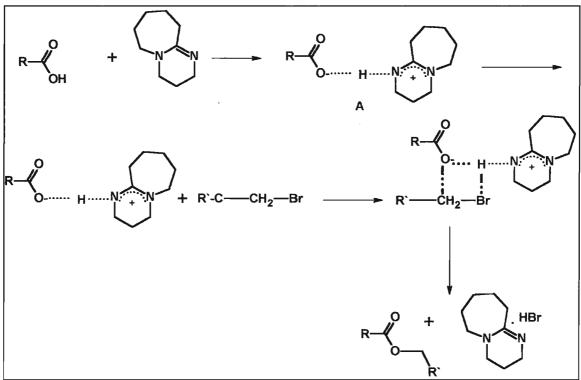


Figura 36: Mecanismo de reação utilizando DBU como catalisador.

Fonte: Ono et al., 1978.

A principal vantagem desta metodologia na síntese de diglicerídeos é que a reação ocorre em apenas uma etapa, sem a necessidade de grupos protetores ou da redução de acetona a álcool.

3.1.8.3 Reações de condensação (Costa, Pinheiro, Vasconcelos, 2003)

As reações de condensação visando à formação de ésteres e amidas podem ocorrer através de diversas metodologias. Estas variam de acordo com a reatividade das moléculas e suas características.

Metodologia importante na obtenção de ésteres e amidas é a utilização de agentes condensantes como as carbodiimidas. Estas carbodiimidas são largamente empregadas na síntese de peptídeos.

A carbodiimida mais utilizada é o DCC (dicicloexilcarbodiimida), um agente desidratante largamente empregado em indústrias e laboratórios, sendo bastante conveniente para a síntese de ésteres e peptídeos.

Este agente condensante apresenta átomo de carbono extremamente eletrofílico, uma vez que se encontra ligado a dois átomos de nitrogênio por ligações duplas e reage com o íon carboxilato, via adição nucleofílica, conduzindo ao intermediário A. Esta primeira etapa necessita ser auxiliada por uma base fraca para a ativação da carbonila. O intermediário A encontra-se em equilíbrio com a O-acil isouréia B, que, combinada com o álcool por adição nucleofílica, conduz à formação de C, que se encontra em equilíbrio com as espécies D e E. A espécie E sofre eliminação rápida de N,N-dicicloexiluréia (DCU), um bom grupo abandonador, que leva à formação do éster.

A figura 37 mostra o mecanismo de reação do DCC.

Figura 37: Mecanismo de obtenção de ésteres utilizando DCC como agente condensante. Fonte: Costa, Pinheiro, Vasconcelos, 2003.

A catálise através do DCC costuma levar à formação de anidridos, muitas vezes, diminuindo o rendimento de reação. Este anidrido pode ser convertido em éster com o auxílio do dimetilaminopiridina (DMAP), o qual pode levar à formação de éster, uma vez que se liga ao anidrido, e formando espécie acetilante, que atuará como bom grupo abandonador, provocando a formação do éster. A figura 38 mostra a formação do éster através do DMAP.

Figura 38: Mecanismo de reação do DMAP.

Fonte: Costa, Pinheiro, Vasconcelos, 2003

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- acetona p.a. (Merck)
- acetato de etila p.a. (Merck)
- ácido esteárico
- ácido palmítico (Aldrich)
- ácido sulfúrico p.a. (Merck)
- anidrido maléico (VETEC)
- anidrido ftálico (VETEC)
- anidrido succínico
- carbonato de potássio
- carbonato de sódio
- clorofórmio p.a.(Merck)
- clorofórmio deuterado (Aldrich)
- decanol
- 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (Sigma)
- 1,3-dibromo-2-propanol (dibromidrina) (Sigma)
- diciclicoexilcarbodiimida (DCC) (Merck)
- diclorometano p.a (Merck)
- dimetilaminopiridina (DMAP)(Sigma)
- etanol p.a (Merck)
- fluoresceína dissódica
- difosfato de primaquina (Itacá SA)
- permanganato de potássio (FCF-USP)
- placa cromatográfica para CCD sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- sílica-gel 60 (100-200 #) grade 634 (Aldrich)
- sílica-gel 60 (70-230 #) grade 634 (Merck)
- trietilamina (Aldrich)
- tetraidrofurano (Merck)

Todos os solventes e reagentes foram tratados e purificados conforme literatura (Perrin, Amarego, Perrin, 1980).

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Síntese

4.2.1.1. Síntese dos transportadores diglicerídicos

Os diésteres do glicerol são sintetizados a partir da reação do 1,3-dibromo-2-propanol (dibromidrina), com ácidos graxos: palmítico e esteárico; ácidos de cadeia longa: enântico e decanóico, com DBU, sob refluxo por período de tempo que depende do ácido utilizado. Obtêm-se os 1,3-diacilgliceróis por tratamento com metanol, para purificação (Furniss *et al.*, 1988). O esquema 1 apresenta a reação geral envolvida.

Esquema 1: Obtenção dos derivados diglicerídicos.

4.2.1.2 Síntese de hemiamidas de primaquina

Após a reação dos anidridos succínico, maléico e ftálico (em excesso) com fosfato de primaquina em meio com trietilamina e sob refluxo de uma hora, são

obtidas as hemiamidas de primaquina. Estas são isoladas de acordo com o espaçante ligado.

A reação geral compreendida encontra-se a seguir (Esquema 2).

Esquema 2: Reação geral das hemiamidas de primaquina.

4.2.1.3. Síntese dos derivados "triglicerídicos" de primaquina

Os derivados triglicerídicos de primaquina são sintetizados a partir da reação das hemiamidas de primaquina com os diésteres do glicerol, juntamente com um agente condensante, como dicicloexilcarbodiimida (DCC), em presença de dimetilaminopiridina (DMAP).

A reação geral encontra-se no esquema que segue (Esquema 3).

Esquema 4: Reação geral de condensação do derivados "triglicerídicos" de primaquina.

4.2.2 Análises

4.2.2.1 Análise cromatográfica

4.2.2.1.1 POR CCD

Foram efetuadas em placas de camada delgada de sílica-gel G₆₀ da Merck, para o acompanhamento das reações e para avaliação da pureza de alguns

produtos sintetizados. As fases móveis empregadas variaram de acordo com o experimento.

4.2.2.1.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Büchi, capilar, com calibração segundo a Farmacopéia Brasileira IV.

4.2.2.1.3 Análise elementar

A análise de C, H, N realizada em Analisador Perkin-Elmer 2400, na Central Analítica, IQ, USP.

4.2.2.1.4 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de Massas Shimadzu GCMS-QP 5050ª, disponível na FCF, USP.

4.2.2.1.5 Análises espectrométricas

As análises no infravermelho foram efetuadas no espectrofotômetro FTIR Bomem. Já as de ¹H RMN e de ¹³C RMN foram efetuadas em espectrômetro Brücker 300 MHz, na FCF, USP.

5. EXPERIMENTOS

5.1 SÍNTESES

5.1.1 Síntese dos diésteres do glicerol

Os diésteres do glicerol foram sintetizados a partir da reação do 1,3-dibromo-2-propanol (dibromidrina), com ácidos graxos: palmítico, esteárico e decanóico com DBU, sob refluxo por período de tempo que depende do ácido utilizado.

5.1.1.1 Síntese do 1,3-dipalmitoilglicerol

As sínteses dos diésteres do glicerol foram realizadas seguindo procedimento padrão, com modificações na estequiometria dos reagentes, no tempo de reação e nas técnicas de purificação. O procedimento foi realizado da seguinte forma: Em balão de 100 mL de fundo redondo, solubilizou-se o ácido palmítico em 35 mL de THF, adicionando-se o DBU e manteve-se sob agitação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada a dibromidrina, submetendo-se a mistura reacional a refluxo e agitação, havendo formação de precipitado branco. O refluxo foi interrompido e manteve-se a mistura sob agitação até o seu resfriamento. O precipitado foi filtrado e desprezado e o sobrenadante, evaporado sob pressão reduzida, obtendo, assim, um sólido branco amarelado. O sólido

obtido foi então purificado e submetido à secagem sob pressão reduzida. O sólido obtido foi analisado no IV e por RMN.

A tabela II mostra os experimentos e as condições em que foram

Ехр.	purificação	T.	Dibromidrina (mmol)	ác. Palmítico (mmol)	DBU (mmol)	Rend	Obs.	Faixa de fusão
1	Lavagem com etanol	4 h	3,5	7	7		Agitação	
2	Coluna cromatográfica (6:1 dicIrometano acetato de etila)	4h	3,5	7	7		Agitação	
3	Extração clorofórmio água	4h	3,5	7	7		Agitação	
4	Couna cromatográfica (diclorometano: acetato de etila 8:1)	4h	3,5	7	7	10%	Agitação	
5	Purificação com metanol	6h	3,5	7	7		Agitação	
6	Purificação com metanol	4h	3,5	12	12		Agitação	
7	Purificação com metanol	4h	4,25	7	7		Agitação	
8	Purificação com metanol	4h	3,5	7	14	33%	Agitação	62-64 °C
9	Purificação com metanol	4h	3,5	7	14	40%	Aqueci- mento nos primeiros 30 minutos	62-64 °C

realizados:

Tabela II: Experimentos realizados para a obtenção do 1,3-dipalmitoilglicerol

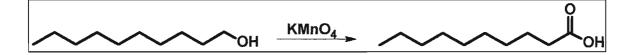
5.1.1.2 Síntese do 1,3-diestearilglicerol

Experimento 10

Em balão de 125 mL de fundo redondo, solubilizaram-se 1,98 g (7 mmol) de ácido esteárico em 30 mL de THF. Adicionaram-se 2,0 mL (14 mmoL) de DBU e manteve sob agitação por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,38 mL (3,5 mmol) de dibromidrina e manteve-se sob refluxo por quatro horas até a formação de precipitado. Em seguida, retirou-se a reação do refluxo, mantendo-se sob forte agitação até o resfriamento. Em seguida, procedeu-se à filtração e à evaporação à pressão reduzida. O sólido branco isolado foi purificado de duas maneiras: em coluna cromatográfica, utilizando como fase móvel diclorometano e acetato de etila (8:1), e através da cristalização com metanol. Os produtos obtidos por meio das duas formas de purificação foram submetidos à análise no IV e de RMN. Faixa de fusão 62-68 °C

5.1.1.3 Síntese do diglicerídeo do ácido decanóico

5.1.1.3.1 Tentativa síntese do ácido decanóico



Experimento 11

Em balão de 500 mL adicionaram-se 11 mL (57 mmol) de decanol em uma solução de 1,22 g (8,8.10⁻³mol) de carbonato de potássio em 12 mL de água. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional outra solução de 12,8 g (74 mmol) de permanganato de potássio em 230 mL de água. Manteve-se a mistura reacional sob agitação magnética, utilizando banho de gelo e água, sob temperatura de 4–6 °C, durante 4 horas. Em seguida, retirou-se o banho de gelo e prosseguiu-se sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, realizou-se a extração com 5 porções de 50 mL de éter. Durante a extração, a fase etérea foi acidificada com solução de ácido sulfúrico 0,1 M. As frações etéreas foram reunidas e submetidas à evaporação rotatória sob pressão reduzida. O concentrado resultante foi submetido à destilação horizontal sob pressão reduzida. Retirou-se a fração entre 240-245 °C.

Experimento 12

Em erlemeyer de 500 mL foram adicionados 11 mL (5,7 mmol) de decanol em solução de 1,22 g (11,5 mmol) de carbonato de sódio em 12 mL de água. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional outra solução de 12,8 g (74.10⁻² mol) de permanganato de potássio em 230 mL de água. Manteve-se a mistura reacional sob agitação mecânica, utilizando-se banho de gelo e água, sob temperatura de 4–6 °C, durante 4 horas. Em seguida, retirou-se o banho de gelo prosseguiu-se com agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período, centrifugou-se a mistura reacional, separando-se a fase líquida da fase sólida. Realizou-se a extração com 5 porções de 50 mL de éter em ambas as fases. A

fase etérea proveniente da fase líquida foi concentrada e o líquido resultante foi submetido à destilação horizontal sob pressão reduzida. A porção proveniente da porção sólida foi suspensa em água e extraída com três porções de 100 mL de éter. A fase etérea resultante foi submetida à agitação com solução de carbonato de sódio por três horas. Em seguida, a fase aquosa foi separada da orgânica e então acidificada com solução 0,1 M de ácido sulfúrico. Após a acidificação a fase aquosa foi extraída com três porções de éter de 100 mL. As frações etéreas foram reunidas e submetidas à evaporação rotatória sob pressão reduzida.

Experimento 13

Em 230 mL de água desionizada solubilizaram-se 11,8 g (74 mmol) de permanganto de potássio, adicionaram-se 11,13 mL (57 mmol) de decanol e manteve-se sob agitação mecânica por oito horas e em banho de gelo. Após as oito horas, interrompeu-se a agitação e transferiu-se o meio reacional para funil de separação de 500 mL. Adicionaram-se 150 mL de éter dietílico e manteve-se a mistura em descanso por duas horas, a fim de promover a separação de fases. Após as duas horas extraiu-se a fase etérea. À fase etérea resultante, adicionaram-se 100 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M e manteve-se sob forte agitação magnética por 3 horas. Após as três horas, a agitação foi interrompida e separou-se a fase aquosa da fase etérea, através de funil de separação. A fase aquosa foi acidificada com solução de ácido sulfúrico 1 M e, então, realizou-se novamente a extração com éter, coletando-se a fase etérea. A porção etérea resultante foi seca com sulfato de sódio e, posteriormente, evaporada sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O sólido obtido foi seco em bomba de alto vácuo e analisado por RMN ¹H.

Experimento 14

Em 230 mL de água desionizada solubilizaram-se 11,8 g (74 mmol) de permanganto de potássio, adicionaram-se 11,13 mL (57 mmol) de decanol e manteve-se sob agitação mecânica por oito horas e em banho de gelo. Após as oito horas, interrompeu-se a reação e manteve-se o meio reacional em repouso por 24 horas. Após as 24 horas, o meio reacional foi filtrado e a fase líquida colocada em funil de separação. Isolou-se a fase aquosa, a qual foi acidificada com solução 1 M de ácido sulfúrico, a qual foi novamente levada ao funil de separação e realizou-se extração com três porções de éter. O éter foi evaporado, obtendo-se então o ácido decanóico. A amostra foi submetida a RMN. Rendimento: 40%. Faixa de fusão 26-28 °C.

Experimento 15

Solubilizou-se 0,382 g (2,22 mmol) de ácido decanóico, juntamente com 0,68 mL (4,4 mmol) de DBU e manteve-se sob agitação e refluxo por 30 minutos. Após os 30 minutos, adicionou-se 0,22 mL (1,1 mmol) de dibromidrina e iniciou-se o refluxo por 4 horas. Filtrou-se, então, a mistura sob pressão reduzida. O filtrado resultante foi submetido à evaporação sob pressão reduzida e o sólido proveniente, submetido à secagem à pressão reduzida. Após a secagem a mistura foi solubilizada em metanol e, então, mantida sob refrigeração por 2 horas. Em seguida, a amostra foi retirada da refrigeração e filtrada. O produto obtido foi analisado por RMN ¹H. Rendimento: 38%; faixa de fusão: 37-41 °C.

5.1.2 Síntese de hemiamidas de primaquina

Após a reação dos anidridos succínico, maléico e ftálico com fosfato de primaquina em meio com trietilamina e sob refluxo de uma hora, obtiveram-se as

hemiamidas de primaquina. Estas foram isoladas de acordo com o espaçante ligado.

5.1.2.1 Síntese da succinilprimaquina

Experimento 16

Em balão de 125 mL, de fundo redondo, foram adicionados 5 g (1,1mmol) de fosfato de primaquina, solubilizados em 50 mL de etanol, juntamente com 3,06 mL (1,5 mmol) de trietilamina. Manteve-se sob agitação e aquecimento até que a mistura começasse a refluxar, quando, então, foram adicionados 1,4 g (1,4 mmol) de anidrido succínico, deixando-se sob refluxo e agitação forte. Após 1 hora, desligou-se o refluxo e manteve-se sob agitação até o resfriamento. Adicionaram-se, aproximadamente, 20 mL de água destilada, retirando-se quase todo etanol, sob pressão reduzida. Em seguida, adicionaram-se, aos poucos, 20 mL de água até a precipitação, filtrando-se sob pressão reduzida. O filtrado foi aquecido e, então, adicionado de acetona para a recristalização. Filtrou-se novamente e adicionou-se água lentamente, até o resfriamento, sempre com agitação manual. Em seguida, retirou-se o excesso de acetona em rotaevaporador, até a precipitação. Isolou-se o precipitado mediante filtração sob pressão reduzida. O sólido amarelado obtido foi analisado no IV.

5.1.2.2 Síntese de maleilprimaquina

Experimento 17

Em balão de 125 mL solubilizaram-se 2,27 g (5mmol) de difosfato de primaquina em 20 mL de etanol, sob agitação magnética. Adicionaram-se 1,4 mL (7 mmol) de trietilamina e iniciou-se o refluxo. Adicionou-se 0,62 g (6,3 mmol) de anidrido maléico e prosseguiu-se com o refluxo por uma hora. Em seguida, extraiu-se o solvente através de rotaevaporação, sob pressão reduzida. Tentou-se solubilizar o composto em acetona e constatou-se o surgimento de sobrenadante turvo, o qual foi extraído e submetido a aquecimento. Durante o aquecimento ocorreu a precipitação de cristais amarelos, os quais foram filtrados sob pressão reduzida e analisados no IV. Os cristais amarelos apresentaram faixa de fusão entre 108 °C e 113 °C.

Experimento 18

Em balão de 125 mL solubilizaram-se 2,27 g (5 mmol) de difosfato de primaquina em 20 mL de etanol, sob agitação magnética. Foram adicionados 2 mL (10 mmol) de trietilamina e deixou-se refluxar por 10 minutos. Após 10 minutos, adicionou-se 0,62 g (6,3 mmol) de anidrido maléico e manteve-se sob refluxo e agitação por 2 horas. Após o refluxo, extraiu-se o solvente através de rotaevaporação, sob pressão reduzida. O sólido obtido foi solubilizado em acetona a quente. Adicionou-se água desionizada aos poucos. Deixou-se a mistura resfriar até o surgimento de cristais amarelos. Os cristais foram isolados por filtração e analisados no IV e por RMN ¹H e ¹³C. O produto obtido apresentou ponto de fusão entre 118 °C e 121 °C.

5.1.2.3 Tentativa de síntese da ftalilprimaquina

Experimento 19

A síntese da ftalilprimaquina seguiu o mesmo procedimento empregado no experimento 18 (síntese da maleilprimaquina), em que foram utilizados 2,27 g (5 mmol) de primaquina, 1,4 mL de trietilamina (7 mmol) e 20 g (6,4 mmol) de anidrido ftálico, devidamente solubilizados em 20 mL de etanol. Para a purificação da ftalilprimaquina foram empregadas 3 técnicas distintas: através de recristalização com acetona, separação por coluna cromatográfica utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol 85:15, em que foram recolhidas as primeiras frações, e, finalmente, através de extração com diclorometano/água. Em todas as tentativas de purificação as amostras foram analisadas no IV.

5.1.3 Síntese dos derivados triglicerídicos de primaquina

Os derivados triglicerídicos de primaquina foram sintetizados a partir da reação das hemiamidas de primaquina com os diésteres do glicerol, juntamente com um agente condensante, como dicicloexilcarbodiimida (DCC), em presença de dimetilaminopiridina (DMAP).

5.1.3.1 Síntese da 1,3-diestearil-2-maleilprimaquina

Experimento 20

Em balão de 50 mL foram solubilizados 0,072 g (0,2 mmol) de maleilprimaquina em 20 mL de tetraidrofurano (THF) juntamente com 0,080 g (0,38 mmol) de DCC, sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,126 g (0,2 mmol) de diestearilglicerol juntamente com 0,015 g (5 mmol) de DMAP e manteve-se a mistura reacional sob forte agitação e banho de gelo por quatro horas. Em seguida, prosseguiu-se com a agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Interrompeu-se a agitação e manteve-se a mistura reacional em geladeira por 24 horas, a fim de facilitar a precipitação dos cristais de dicicloexiluréia (DCU), os quais foram filtrados e desprezados. O filtrado obtido foi submetido à evaporação sob pressão reduzida. Uma vez evaporado o solvente, o sólido obtido foi eluído em coluna cromatográfica utilizando diclorometano/acetato de etila (6:1) como fase móvel e fluoresceína sódica como revelador. Foram coletadas as frações com Rf = 0,7. O produto obtido, de cor amarela clara, foi submetido à análise no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

5.1.3.2 Tentativa de síntese de 1,3-diestearil-2-succinilprimaquina

Experimento 21

O procedimento utilizado para a síntese deste composto foi semelhante ao descrito para a diestearilmaleilprimaquina. Em balão de 50 mL foram solubilizados 0,058 g (0,16 mmol) de succinilprimaquina em 20 mL de tetraidrofurano (THF), juntamente com 0,07 g (0,33 mmol) de DCC, sob agitação magnética por 30 minutos. Após 30 minutos foram adicionados 0,100 g (0,16 mmol) de diestearilglicerol, juntamente com 0,012 g (1,2 mmol) de DMAP e manteve-se a mistura reacional sob forte agitação e banho de gelo por quatro horas. Em seguida, prosseguiu-se com a agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Interrompeu-se a agitação e manteve-se a mistura reacional em geladeira por 24 horas a fim de facilitar a precipitação dos cristais de DCU, os quais foram filtrados e desprezados. O filtrado obtido foi submetido à evaporação sob pressão reduzida. Uma vez evaporado o solvente, o sólido obtido foi eluído em coluna cromatográfica utilizando-se diclorometano:acetato de etila (8:1) como fase móvel e fluoresceína sódica como revelador. Foram coletadas as frações com Rf = 0,8. O produto obtido, de cor amarela clara, foi submetido à análise no IV.

Experimento 22

Nesta repetição do experimento 11 foram realizadas algumas modificações. As quantidades de DCC e DMAP foram reajustadas em relação à succinilprimaquina. No experimento anterior foram utilizados 2 mol de DCC em relação a 1 mol de succinilprimaquina. Neste experimento foram utilizados 3 mol de DCC em relação a 1 mol de succinilprimaquina. A fase móvel da coluna cromatográfica foi modificada para diclorometano:acetato de etila (6:1), coletandose as frações de Rf=0,6. O produto obtido foi analisado no no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

5.1.3.3 Tentativa de síntese de 1,3-dipalmitoil-2-maleilprimaquina

Experimento 23

A tentativa de condensação entre o dipalmitoilglicerol e a maleilprimaquina foi realizada da mesma maneira que as tentativas de condensação anteriormente descritas. Foi utilizado 0,072 g (0,12 mmol) de dipalmitoilglicerol em proporção estequiométrica com 0,045 g (0,12 mmol) de maleilprimaquina. Como agente condensante utilizou-se 0,05 g (0,24 mmol) de DCC, juntamente com 0,005 g (0,04 mmol) de DMAP como catalisador. A fase móvel empregada foi de

diclorometano:acetato de etila (6:1). Foram coletadas as frações de Rf 0,6. O produto obtido foi analisado no IV.

Experimento 24

Foram empregadas as mesmas quantidades de reagentes e o mesmo método de condensação que o anterior, porém o derivado diglicerídico foi repurificado, a fim de melhorar o rendimento da reação. O produto obtido foi analisado no no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

5.1.3.4 Tentativa de síntese do 1,3-dipalmitoil-succinilprimaquina

Experimento 25

A síntese da dipalmitoilsuccinilprimaquina ocorreu conforme o método geral de condensação dos derivados diglicerídicos. Foram empregados 0,24 g (4,4 mmol) de dipalmitoilglicerol juntamente com 0,158 g (4,4mmol) de succinilprimaquina utilizando 0,086 g (4,17 mmol) de DCC e 0,10 g (8,3 mmol) de DMAP. A fase móvel empregada foi de diclorometano acetato de etila 8:2. O produto obtido foi analisado no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

5.1.3.5 Tentativa síntese do 1,3-dipalmitoil-2-ftalilprimaquina

Experimento 26

Em balão de 50 mL solubilizaram-se 0,054 g (1,33 mmol) de ftalilprimaquina, juntamente com 0,047 g (2,4 mmol) de DCC em 15 mL de THF. Após 30 minutos de agitação intensa adicionou-se 0,076 g (1,33 mmol) de dipalimtoilglicerol e 0,010 g (1 mmol) de DMAP. Seguiu-se sob forte agitação por 4 horas, em banho de gelo, e por mais 48 horas à temperatura ambiente. Após 48 horas, a agitação foi interrompida e a mistura reacional levada à geladeira por 24 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado e o sólido resultante submetido a análise cromatográfica. A análise por CCD foi realizada utilizando diversas fases móveis. principais foram: diclorometano/acetato etila 6:1: diclorometano/acetato de etila 8:1; clorofórmio/metanol/ácido acético 95:5:3; clorofórmio/metanol 85:15.

Experimento 27

Em balão de 50 mL solubilizou-se 0,054 g (1,3 mmol) de ftalilprimaquina, 0,076 g (1,3 mmol) de dipalmitoilglicerol, 0,047 g (2,4 mmol) de DCC e 0,010 g (1 mmol) de DMAP. A mistura foi mantida sob forte agitação e banho de gelo por

quatro horas. Manteve-se, então, a agitação à temperatura ambiente por mais 48 horas. Utilizou-se análise cromatográfica da mistura reacional.

5.1.3.6 Síntese do 1,3-diestearil-2-ftalilprimaquina

Experimento 28

Este experimento foi realizado utilizando-se o mesmo procedimento aplicado no experimento 27. Empregaram-se 0,050 g (1,2 mmol) de ftalilprimaquina, 0,076 g (1,2 mmol) de diestearilglicerol, 0,049 g (2,4 mmol) de DCC e 0,006 g (0,7 mmol) de DMAP. Efetuou-se análise por CCD.

Experimento 29

Este experimento ocorreu da mesma maneira que o experimento 8. Empregaram-se 0,080 g (1,28 mmol) de diestearilglicerol, 0,052 g (1,28 mmol) de ftalilprimaquina, 0,049 g (2,5 mmol) de DCC e 0,01 g (0,8 mmol) de DMAP.

5.1.3.7 Síntese do 2-ftalil-1,3-dipalmitoilglicerol

Experimento 30

Em balão de 100 mL foram adicionados 0,506 g (9,0 mmol) de dipalmitoilglicerol, juntamente com 0,131 g (9,0 mmol) de anidrido ftálico, solubilizado em 20 mL de THF. A mistura reacional foi mantida sob refluxo durante 5 horas, utilizando-se 0,05 mL de ácido acético como catalisador. Após o refluxo, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o sólido obtido foi eluído em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel diclorometano e acetato de etila 8:1 As frações que apresentaram Rf 0,6 foram evaporadas. O produto obtido foi submetido a RMN ¹H e ¹³C.

5.1.3.7 Síntese do 1,3-ftalil-diestearilglicerol

Experimento 31

Utilizando a mesma técnica aplicada a para a síntese do ftalildipalmitoilglicerol, foi sintetizado o ftalildiesterilglicerol. Os reagentes foram empregados nas seguintes proporções: 0,5 g (8 mmol) de diestearilglicerol, 0,12 g (8 mmol) de anidrido ftálico e ácido acético 0,5 mL, todos solubilizados em 15 mL de THF.

5.1.3.8 Tentativa de síntese do dipalmitoilftalilprimaquina

Depois de obtido o intermediário ftalildipalmitoilglicerol tentou-se realizar a condensação com a primaquina.

Experimento 32

Em balão de 50 mL solubilizou-se 0,144 g (3,2 mmol) de difosfato de primaquina em 20 mL de etanol. Adicionou-se 0,1 mL (6,4 mmol) de trietilamina e manteve-se sob agitação por 40 minutos. Após os 40 minutos adicionaram-se 0,224 g (3,2 mmol) de ftalildipalmitoilglicerol, 0,098g (4,8 mmol) de DCC e 0,02 g (2,4 mmol) de DMAP, todos devidamente solubilizados em 20 mL de THF. A mistura foi mantida em banho de gelo por 4 horas e, em seguida, sob forte agitação por 48 horas. O solvente foi, então, evaporado e o produto resultante eluído em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase móvel diclorometano e acetato de etila 8:1. Foram retiradas as frações com Rf 0,8. O produto obtido foi analisado por RMN ¹H.

5.1.3.9. Síntese do 1,3-didecanoil-2-succinilprimaquina

Experimento 34

Em balão de 50 mL foram solubilizados 0,079 g (0,22mmol) de succinilprimaquina em 20 mL de tetraidrofurano (THF), juntamente com 0,09 g (0,44 mmol) de DCC, sob agitação magnética por 30 minutos. Após 30 minutos foram adicionados 0,09 g (0,22 mmol) de didecanoilglicerol, juntamente com 0,012 g (1,2 mmol) de DMAP e manteve-se a mistura reacional sob forte agitação e banho de gelo por quatro horas. Em seguida, prosseguiu-se com a agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Interrompeu-se a agitação e manteve-se a mistura reacional em geladeira por 24 horas a fim de facilitar a precipitação dos cristais de DCU, os quais foram filtrados e desprezados. O filtrado obtido foi submetido à evaporação sob pressão reduzida. Uma vez evaporado o solvente, o sólido obtido foi eluído em coluna cromatográfica utilizando-se diclorometano:acetato de etila (8:1) como fase móvel e fluoresceína sódica como revelador. Foram coletadas as frações com Rf = 0,8. O produto obtido, de cor amarela clara, foi submetido à análise no IV.

5.1.3.10 Síntese do 1,3-didecanoil-2-maleilprimaquina

Experimento 35

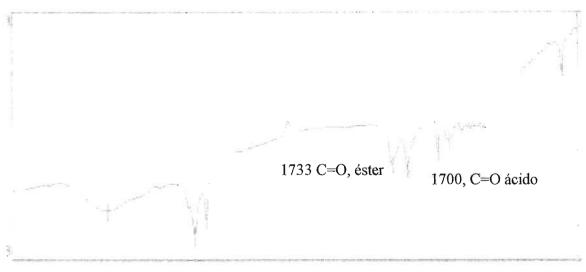
Em balão de 50 mL foram solubilizados 0,072 g (0,20 mmol) de maleilprimaquina em 20 mL de tetraidrofurano (THF) juntamente com 0,080 g (0,38 mmol) de DCC, sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,100 g (0,2 mmol) de didecanoilglicerol juntamente com 0,015 g (5 mmol) de DMAP e manteve-se a mistura reacional sob forte agitação e banho de gelo por quatro horas. Em seguida, prosseguiu-se com a agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Interrompeu-se a agitação e manteve-se a mistura reacional em geladeira por 24 horas, a fim de facilitar a precipitação dos cristais de dicicloexiluréia (DCU), os quais foram filtrados e desprezados. O filtrado obtido foi submetido à evaporação sob pressão reduzida. Uma vez evaporado o solvente, o sólido obtido foi eluído em coluna cromatográfica utilizando diclorometano/acetato de etila (6:1) como fase móvel e fluoresceína sódica como revelador. Foram coletadas as frações com Rf = 0,7. O produto obtido, de cor amarela clara, foi submetido à análise no IV e por RMN ¹H e ¹³C.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE DOS DIGLICERÍDEOS DOS ÁCIDOS PALMÍTICO E ESTEÁRICO

Nesta tentativa (experimento 1), foram realizadas algumas modificações em relação ao método anteriormente descrito (Sanai, Ferreira, 2000). Utilizou-se tetraidrofurano, ao invés de benzeno. Também, foi realizada tentativa de purificação do produto, utilizando etanol, sem efetuar a liofilização. Outra modificação realizada foi o tempo de reação, que aumentou de duas para quatro horas.

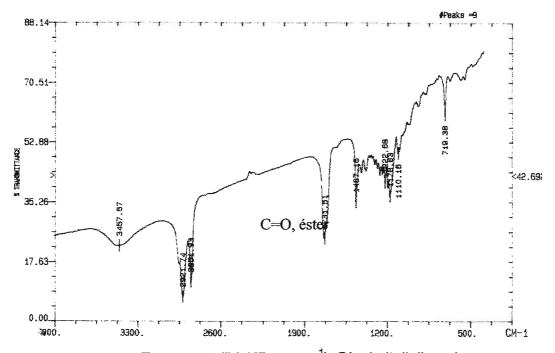
A análise no infravermelho (espectro 1) mostrou que a substituição do benzeno por tetraidrofurano foi eficiente, pois se observou a banda de estiramento de carbonila de éster (1733 cm⁻¹). Já em relação à purificação com etanol, esta se mostrou ineficiente, pois o espectro apresentou banda de carbonila de ácido (1701 cm⁻¹) e contaminação com glicerol (1647 cm⁻¹). De maneira igual, a extração realizada no experimento 3 também se mostrou ineficaz, apresentando as mesmas bandas na análise no infravermelho.



Espectro 1 (IV, KBr, vcm⁻¹): Dipalmitoilglicerol impuro.

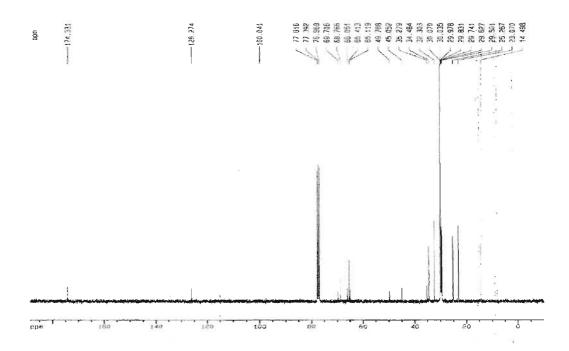
A coluna cromatográfica utilizada no experimento 2 não se mostrou totalmente eficiente para a purificação do produto, mesmo que a análise no

infravermelho (espectro 2) não tenha mostrado as bandas relacionadas às impurezas anteriormente mencionadas. No entanto, a análise por RMN ¹³C mostrou sinais na região de 65 ppm a 70 ppm referentes a carbonos carbinólicos do monoglicerídeo, o que indica a formação do diglicerídeo e o monoglicerídeo do ácido palmítico. Conseqüentemente, por meio de cromatografia em coluna não se conseguiu separar o mono do diglicerídeo. Isto se deve ao fato de que as CCDs utilizadas para acompanhar a coluna cromatográfica inicialmente foram reveladas com iodo re-sublimado, o qual não permitia visualizar a mistura de glicerídeos.



Espectro 2 (IV, KBr, v cm⁻¹): Dipalmitoilglicerol.

Atribuições:IV (KBr, v, cm⁻¹): 3457 (larga, vOH); 2921, 2851 (forte, vC-H alifático); 1731 (forte, vC=O éster); 1178(fraca, vC-O)

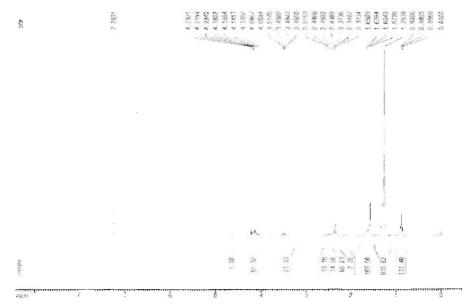


Espectro 3 (RMN 13 C, CDCl $_{3,}$ 75 MHz, δ ppm): Mistura de diglicerídeo com monoglicerídeo.

Para a obtenção do diglicerídeo puro foi necessário utilizar um revelador que pudesse evidenciar a mistura de glicerídeos para, posteriormente, encontrar fase móvel mais adequada para separar a mistura em questão. O revelador utilizado foi a fluoresceína sódica, que apresentou bons resultados para a revelação das placas. A partir daí pesquisaram-se fases móveis com variações nas proporções de diclorometano e acetato de etila. O sistema solvente que apresentou a melhor separação entre os glicerídeos foi a mistura de diclorometano:acetato de etila (8:1), sendo, então, a fase móvel escolhida para realizar a separação entre o di e o monoglicerídeo realizada no experimento 4.

Figura 33: Dipalmitoilglicerol.

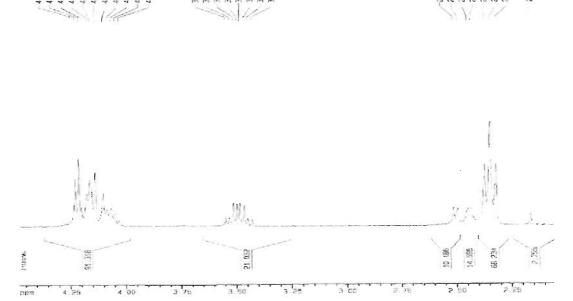
Os três sinais encontrados na região de 65-70 ppm mostram que a separação foi eficiente, apesar do resíduo de monoglicerídeo observado. Outro indício da formação do diglicerídeo e sua purificação é o multipleto na região de 3,5 ppm, observado por RMN ¹H, característico do hidrogênio localizado na posição 2 do diglicerídeo.



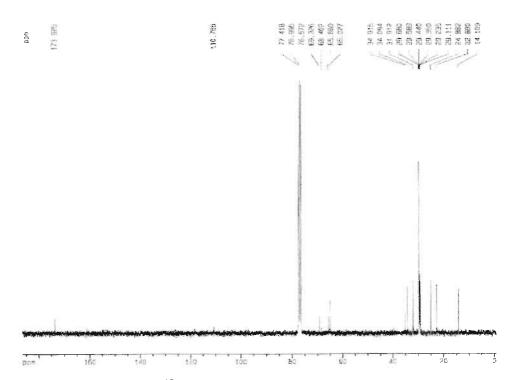
Espectro 4 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Dipalmitoilglicerol puro.

RMN¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,85-0,89(t,CH₃,6H); 1,25-1,40 (m, CH₂, 48H);1,62-1,75 (m, CH₂, 4H); 2,31(t,CH₂,4H); 3,43-3,53(m,CH,1H); 4,06-4,22(m,OCH₂,4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174,31 (C₅; C₁₉), 68,77 (C₂); 65,41(C₃,C₇); 34,48(C₂₈,C₁₁); 32,30(C₄₂, C₂₅); 29,50-30,06(C₁₃₋₂₄,C₃₀₋₄₁); 25,27(C₁₂-C₂₉); 23,06(C₄₃,C₂₆); 14,49(C₂₇,C₄₄)



Espectro 5 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Região ampliada do espectro 4.



Espectro 6 (RMN ¹³C, 75 MHz, CDCl₃, δ ppm): Dipalmitoilglicerol puro.

Uma vez obtido o produto realizou-se a otimização desta síntese. Dessa forma, foi possível não apenas obter maior rendimento da reação, mas também desenvolver metodologia mais fácil, rápida e econômica para a obtenção de derivados diglicerídicos.

Inicialmente, o tempo de reação foi aumentado, mantendo-se a estequiometria original da reação. A análise cromatográfica realizada no acompanhamento da reação, através de CCD, mostrou que à medida que o tempo era aumentado, ocorria a rápida conversão do diglicerídeo em triglicerídeo, resultando, assim, na maior parte de mono e triglicerídeo, o diglicerídeo aparecendo como contaminação (experimento 5). Esta formação de triglicerídeo, além de diminuir a obtenção do diglicerídeo, dificultava significativamente qualquer tentativa de recristalização, devido à proximidade de polaridade com o diglicerídeo.

Posteriormente, foram realizadas variações na estequiometria dos reagentes, mantendo o tempo em quatro horas de reação. As proporções dos reagentes estão na tabela I, a seguir.

Tabela III - Estequiometria dos reagentes utilizados na síntese dos diglicerídeos

Reagente	Método original	Exp. 6	Exp.7	Exp.8
Ác. palmítico	7	10	7	7
(mmol)				
DBU (mmol)	7	10	7	14
Dibromidrina	3,5	3,5	4,25	3,5
(mmol)				

Através da análise por CCD, pode-se observar que o aumento da quantidade de ácido graxo proporcionou a formação do triglicerídeo e não a do diglicerídeo, de maneira similar ao que ocorreu quando o tempo de reação foi aumentado (Experimento 6).

O aumento da proporção de dibromidrina levou à formação de muito monoglicerídeo e não do derivado dissubstituído (Experimento 7).

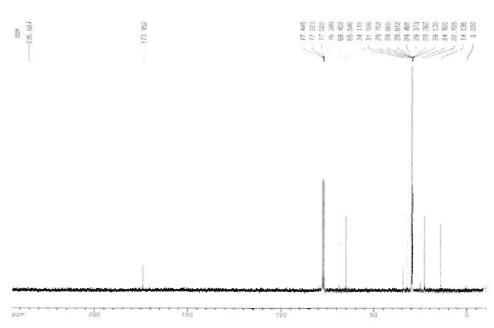
A modificação que apresentou melhor resultado foi o aumento na proporção de DBU em relação ao ácido graxo. Esta modificação confirmou que a reação não apresentava melhor rendimento devido à formação de baixa concentração de carboxilato, com ataque ineficiente do ácido carboxílico à dibromidrina. Notou-se que a proporção de dois mol de DBU para um de ácido carboxílico melhorou o desempenho da reação (Experimento 8), propiciando rendimento de 35%.

Para tentar melhorar, ainda mais, a ativação do ácido carboxílico, adotouse, ainda, nova modificação no procedimento da reação. Na técnica original, mantinha-se o ácido graxo em agitação com DBU, sem aquecimento, a fim de ativar a carbonila. Optou-se, então, pela manutenção da mistura sob refluxo, o que levou a pequena melhora no rendimento, de 35% para 40% (experimento 9).

O aumento no tempo de reação, ultrapassando 4 horas, levou à obtenção do triglicerídeo.

Finalmente, novo método de purificação foi desenvolvido para substituir a coluna cromatográfica. Para realizar a purificação desta reação, foram testados diversos solventes que conseguissem solubilizar o ácido graxo, o monoglicerídeo e que precipitassem o diglicerídeo. A maior dificuldade observada relaciona-se ao fato de que mono e diglicerídeo apresentam polaridades muito próximas.

Entre os diversos solventes testados, o metanol foi eficiente em purificar a mistura reacional, deixando apenas o diglicerídeo. A análise por RMN C¹³ mostra na região de 60 a 70 ppm apenas dois sinais, um referente aos carbonos 1 e 3 do glicerol e outro ao carbono ligado à hidroxila em 2. Este espectro (espectro 7) mostra que o produto se encontra mais puro que aquele obtido pelo método por coluna cromatográfica, em que se observavam sinais referentes ao monoglicerídeo.



Espectro 7: Dipalmitoilglicerol purificado com metanol.

6.1.1 Síntese do diestearilglicerol

Após a obtenção do dipalmitoilglicerol (experimento 5) foi realizada a síntese do diestearilglicerol (experimento 10), a qual apresentou os mesmos problemas na purificação através da coluna cromatográfica. Foram realizadas análises cromatográficas em colunas com sistemas solvente diclorometano: acetato de etila nas proporções de 6:1 e de 8:1, sendo este último o sistema solvente mais indicado para a separação de di e monoglicerídeos. A análise no infravermelho (espectro 8) mostrou a presença da hidroxila do glicerol (3459 cm⁻¹) e de carbonila do éster (1729 cm⁻¹), sem apresentar a carbonila de ácido. Também foi realizada a purificação com metanol, que se mostrou mais eficiente no caso do diestearilglicerol.

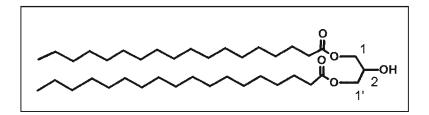
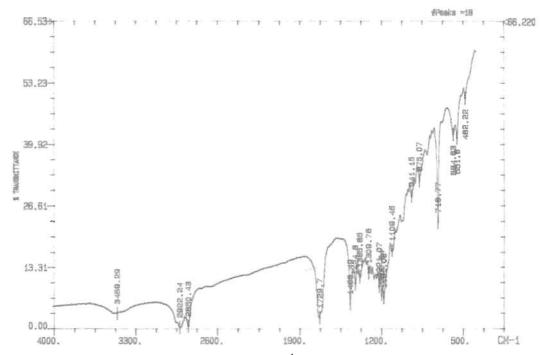


Figura 36 : Diestearilglicerol.

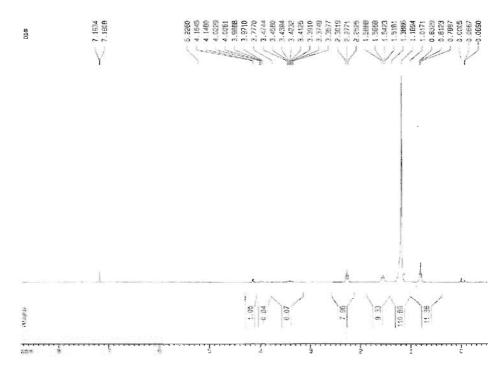


Espectro 8 (IV, KBr, vcm⁻¹): Diestearilglicerol.

Atribuições: IV (KBr, v cm⁻¹): 3459 (larga, vOH) ; 2922,2850 (intensa, vC-H); 1729 (forte, vC=O éster)

RMN¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,85-0,89(t,CH₃,6H); 1,25-1,40 (m, CH₂, 48H);1,62-1,75 (m, CH₂, 4H); 2,31(t,CH₂,4H); 3,43-3,53(m,CH,1H); 4,06-4,22(m,OCH₂,4H).

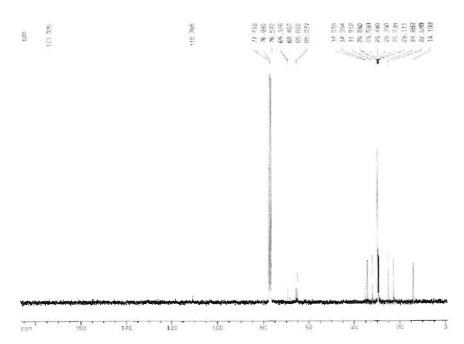
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174,31 (C₅, C₁₉), 68,77 (C₂); 65,41(C₃,C₇); 34,48(C₂₈,C₁₁); 32,30(C₄₂, C₂₅); 29,50-30,06(C₁₃₋₂₄,C₃₀₋₄₁); 25,27(C₁₂-C₂₉); 23,06(C₄₃,C₂₆); 14,49(C₂₇,C₄₄)



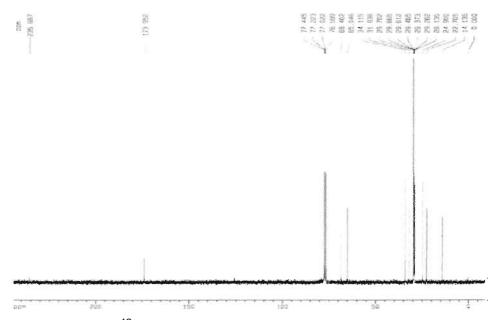
Espectro 9 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃ δ ppm): Diestearilglicerol.

A análise de RMN C¹³(espectro 10) também mostra a carbonila de éster em 174,31 ppm, apresentando quatro sinais na região de 65-70 ppm, indicando apenas a contaminação por acetato de etila, solvente utilizado na coluna cromatográfica.

O espectro 11 mostra o dois sinais na região de 65-70 ppm referentes aos carbonos 1 e 3 do diglicerídeo, comprovando o sucesso da purificação.



Espectro 10 (RMN 13 C, 75 MHz, CDCl₃, $_{,}$ $_{,}$ $_{,}$ $_{,}$ ppm): Diestearilglicerol purificado com coluna diclorometano/acetoto 8:1.



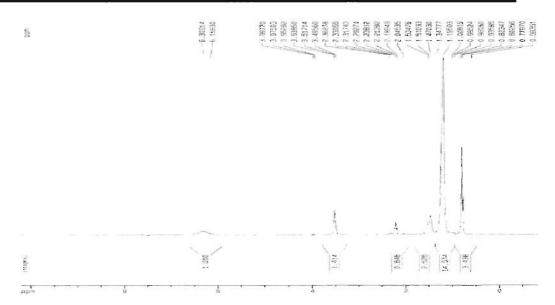
Espectro 11(RMN 13 C, 75 MHz, CDCl $_3$, $_5$ ppm): Diestearilglicerol purificado com metanol.

6.1.2 Síntese do didecanoilglicerol

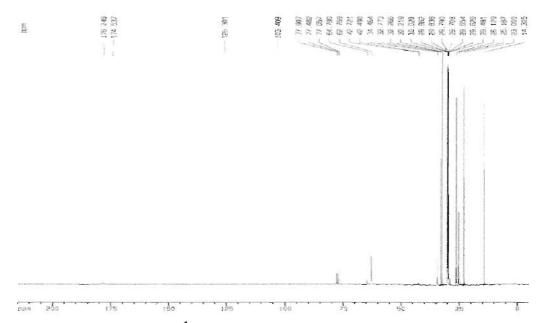
6.1.2.1 Síntese do ácido decanóico

A síntese do ácido decanóico consistiu na oxidação do decanol a ácido, utilizando permanganato de potássio como agente oxidante.

No experimento 11 foram encontradas diversas dificuldades. Durante o processo reacional, foi utilizada agitação magnética, o que não foi adequado, visto que o meio reacional tornou-se muito espesso. Outra dificuldade encontrada, também relacionada com a viscosidade do produto, foi o processo de filtração. Após a agitação, o ideal seria que o meio reacional fosse submetido à filtração, o que não foi possível devido à alta viscosidade do sistema. Por fim, o processo de destilação horizontal sob pressão reduzida promoveu a esterificação entre o decanol e o ácido decanóico, dificultando a purificação do produto. A análise do espectro de RMN ¹H (espectro 39) mostrou a presença dos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos pertencentes ao decanol, assim como o sinal em 6,3 ppm referente à hidroxila. A análise de RMN ¹³C (espectro 13) mostrou sinais de carbono carbonílico de ácido e éster localizadas em 178 e 174 ppm, respectivamente.



Espectro 12 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Tentativa de síntese do ácido decanóico (experimento 11).



Espectro 13(RMN ¹H, 75 MHz, CDCl₃, δ ppm): Tentativa de síntese do ácido decanóico (experimento 11).

Nos experimentos 12 e 13 foram realizadas modificações visando corrigir os problemas encontrados no experimento 11.

A agitação magnética foi substituída pela agitação mecânica e ao invés de se tentar a filtração foi realizada centrifugação. A modificação de maior impacto foi a tentativa da formação de sal sódico do ácido, com isto evitando a destilação horizontal. A análise de RMN ¹H (espectro 14) mostrou a ausência dos sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos. A análise de RMN ¹³C (espectro 15) mostrou o sinal em 180 ppm referente à carbonila do ácido e à ausência de sinais de carbonos carbinólicos.

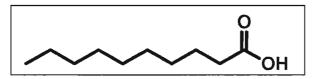
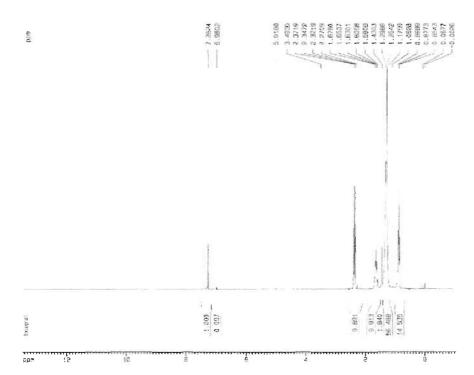


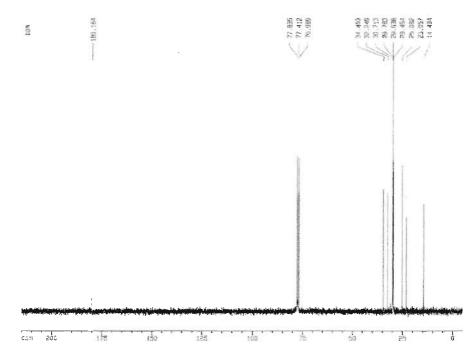
Figura 37: Ácido decanóico.



Espectro 14 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Ácido decanóico.

Atribuições **RMN** ¹**H:** (300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,87 (t, CH₃, H12); 1,26 (m, 12 CH₂); 1,65 (m, CH₂ H5); 2,34 (t, CH₂, H4)

Durante o processo de síntese observou-se a formação do sal potássico do ácido decanóico, dispensando, assim, a etapa de formação do sal sódico. Com isto realizou-se o experimento 14, no qual se trabalhou com a fase aquosa, a qual foi acidificada obtendo-se então 40% de rendimento do ácido decanóico.



Espectro 15 (RMN ¹H, 75 MHz, CDCl₃, δ ppm): Ácido decanóico.

Atribuições RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) 180,16 (C₂); 34,40 (C₄); 32,24 (C₁₀); 29,78 (C₈); 29,63 e 29, 45 (C₆, C₇ e C₉); 25,08 (C₅); 23,05 (C₁₁) 14,49 (C₁₂).

6.1.2.2 Síntese do diglicerídio do ácido decanóico

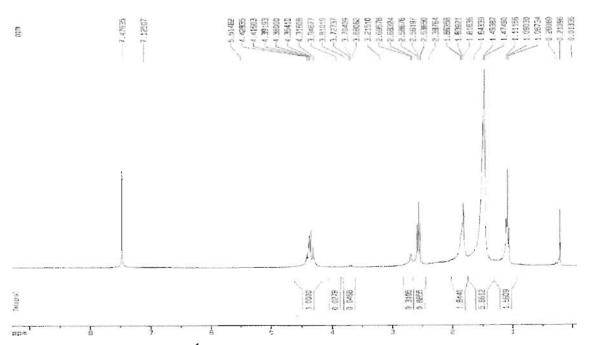
Uma vez obtido o ácido decanóico, iniciou-se a síntese do seu diglicerídeo, descrita no experimento 15. Esta síntese seguiu conforme o método otimizado de obtenção de diglicerídeos, previamente descrito. Encontrou-se apenas pequena dificuldade na purificação com metanol. Devido à cadeia alquílica deste diglicerídeo ser menor que a do dipalmitoil e diestearilglicerol e,

consequentemente, ser menos lipofílico, foi necessário utilizar banho de gelo para a recristalização do didecanoilglicerol.

A análise por H¹ RMN mostrou o multipleto em 3,43-3,53 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao cabono carbinólico encontrado na posição 2 do glicerol, característico em derivados diglicerídicos. O espectro 16 mostra o produto obtido.

Igualmente característico de diglicerídeos, o sinal em 1,49 ppm, referente às cadeias alquílicas, pode ser observado.

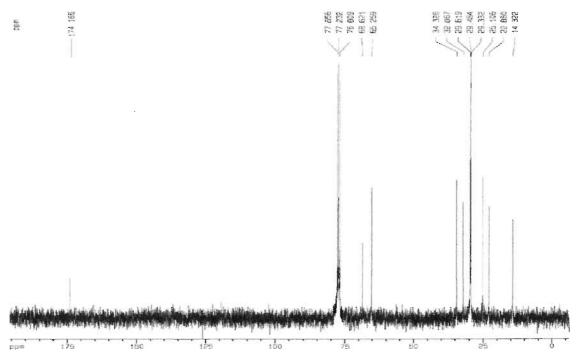
Figura 37: Didecanoilglicerol.



Espectro 16: RMN 1 H(300 MHz, CDC $|_3$, δ ppm): Didecanoilglicerol.

Atribuições: **RMN**¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,85-0,89(t,CH₃,6H); 1,25-1,40 (m, CH2, 24H);1,62-1,75 (m, CH2, 4H); 2,31(t,CH2,4H); 3,43-3,53(m,CH,1H); 4,06-4,22 (m,OCH2,4H).

A análise de RMN C¹³ mostrou o sinal em 174 ppm, referente aos carbonos de carbonila de éster. Também, podem-se observar apenas dois sinais em 62 e 70 ppm, correspondentes aos carbonos do esqueleto do glicerol nas posições 1 e 3 e a posição 2, respectivamente. O espectro 17 de RMN C¹³ confirma ter-se obtido o produto esperado.



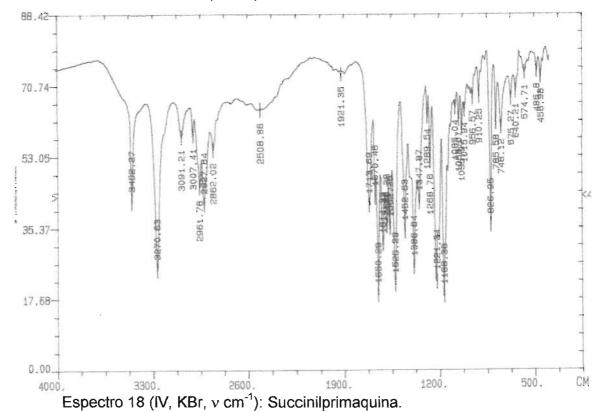
Espectro 17 RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): Didecanoilglicerol.

Atribuições RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 174,16 (C₅; C₁₉), 68,62 (C₂); 65,25(C₃,C₇); 34,32(C₂₀,C₁₁); 32,06(C₁₇, C₂₆); 29,33-29,61 (C₁₃₋₁₅,C₂₂₋₂₅); 25,10(C₁₂-C₂₁); 23,06(C₂₇,C₁₈); 14,49(C₁₉,C₂₈)

6.2 SÍNTESE DAS HEMIAMIDAS DE PRIMAQUINA

Obteve-se a succinilprimaquina por meio do método padronizado em nosso laboratório, descrito no experimento 16.

A análise do espectro no infravermelho (espectro 18) mostra bandas de estiramento localizadas em 1670 cm⁻¹ e 1648 cm⁻¹, indicando a presença da carbonila de amida, e banda de estiramento em 1715 cm⁻¹, indicando a presença da carbonila ácida. Estas bandas levam à constatação de que houve a ligação entre o anidrido succínico e a primaquina.

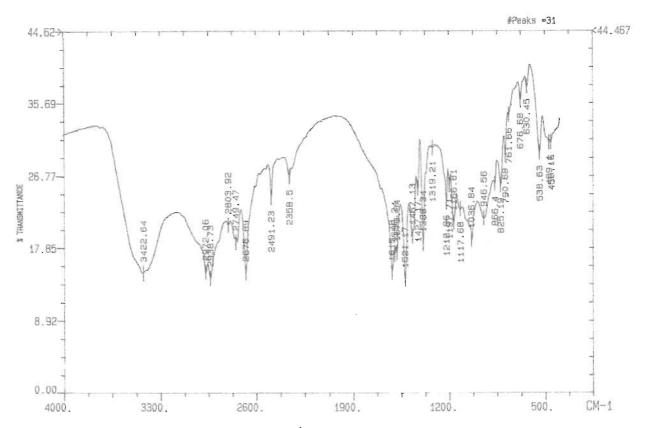


Atribuições IV (KBr, v cm⁻¹): 3451 (forte, yOH), 3266 (forte, N-H) 3088,3006 (fraca, yC-H aromático) 2958,2926,2863 (fracas, vC-H alifático),1715 (forte, y C=O ácido) 1670, 1648 (forte, yC=O amida).

A síntese da maleilprimaquina foi um pouco mais trabalhosa, sendo necessárias algumas modificações.

No experimento 17 obteve-se um produto com características semelhantes às da succinilprimaquina: cor amarelada, ponto de fusão entre 108 °C e 111 °C. Realizada a análise no infravermelho constatou-se que não havia as bandas de amida (1625-1640 cm⁻¹) e de ácido (1710 cm⁻¹), mostrando que o produto não havia se formado (espectro 11).

Atribuições IV (KBr, v cm⁻¹): 3422 (larga vOH e vNH), 2972, 2938(intensa, vC-H alifático) 2803, 2749, 2491 (fraca, vN-H sal amínico); 1615(intensa, v C-N)



Espectro 19 (IV, KBr, v cm⁻¹): Produto da reação (experimento 17).

Acredita-se que o produto amarelo descrito seja a primaquina na forma de monofosfato. Outro indicador da formação do sal é o fato de que o composto

precipitou em acetona a quente, o que é característico de alguns sais. A análise por CCD indicou que o composto obtido apresenta Rf semelhante ao do difosfato de primaquina.

Vários fatores podem ter contribuído para que não se tenha formado o produto e sim o sal. O tempo de reação, o volume de trietilamina e a qualidade do anidrido empregado são alguns parâmetros que podem ser modificados facilmente.

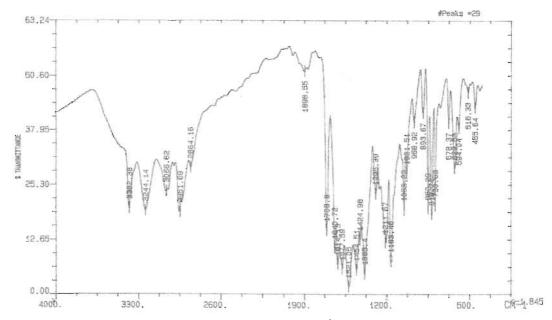
Como correção, o volume de trietilamina foi aumentado de 1,4 mL para 2 mL e a mistura foi mantida sob refluxo por 15 minutos, antes de se adicionar o anidrido maléico, a fim de evitar a formação do sal.

O tempo de reação foi aumentado de uma para duas horas. Quanto ao anidrido, este foi re-sublimado, a fim de eliminar impurezas com o ácido maléico (experimento 18).

O produto isolado apresentou cor amarela e ponto de fusão entre 118 °C e 123 °C .

A análise no infravermelho mostrou as bandas de amida (1640 cm⁻¹) e de ácido (1708 cm⁻¹), caracterizando a hemiamida de primaquina.

Atribuições: IV (KBr, v cm⁻¹): 3382 (intensa, vN-H); 3244 (intensa, v O-H), 3066 (fraca, vC-H aromático), 2951 (intensa, vC-H alifático); 1898 (*umbrella*, vC-H de aromático substituído), 1708 (forte, vC=O ácido), 1640 (forte, vC=O amida), 1614(forte, deformação N-H de amina); 1605 (deformação C=C aromático)

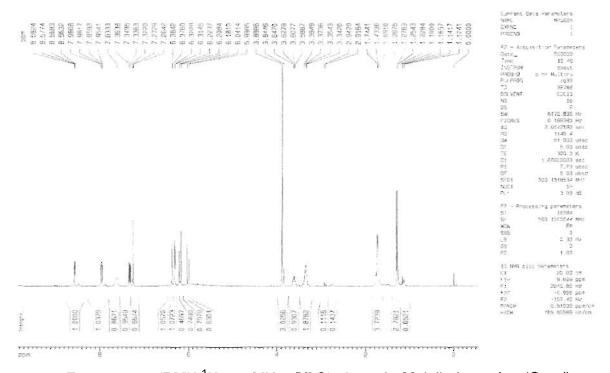


Espectro 20 (IV, KBr, v cm⁻¹): Maleilprimaquina.

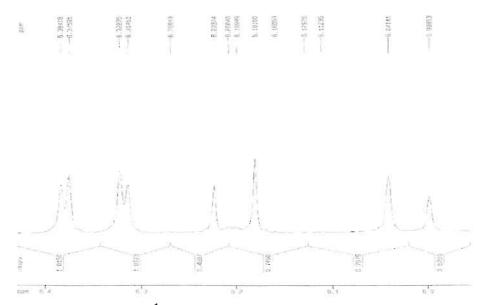
A estrutura foi submetida à RMN ¹H e de ¹³C. Através da análise do espectro de RMN ¹H (espectro 22), foi possível observar os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao C=C do ácido maléico com primaquina.

*Atribuiç*ões: **RMN** 1 H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,56-8,53 (dd, CH, H2); 7,95-7,96 (dd, CH, H4); 7,63 (s, NH, H16), 7,32-7,36 (dd, CH, H3); 6,37-6,38 (d, CH, H8); 6,31-6,32 (d, CH, H10); 6,19-6,22 (d, CH, H23); 5,99-6,04 (d, CH, H22); 3,88 (s, CH3, H20);3,58-3,64 (q, CH, H12); 3,29-3,41 (m, CH2, H15); 1,69-1,74 (d, CH2, H13, 14); 1,27-1,29 (d, CH2, 21).

Figura 38: Maleilprimaquina.



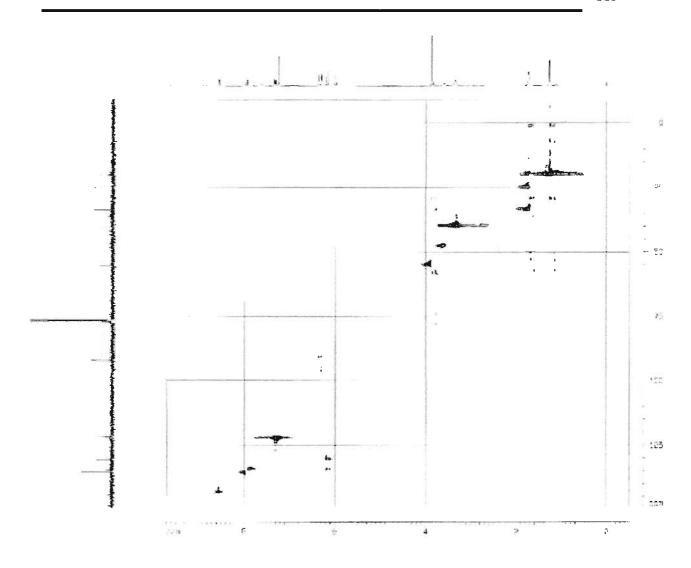
Espectro 21 (RMN ¹H,300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Maleilprimaquina (Geral).



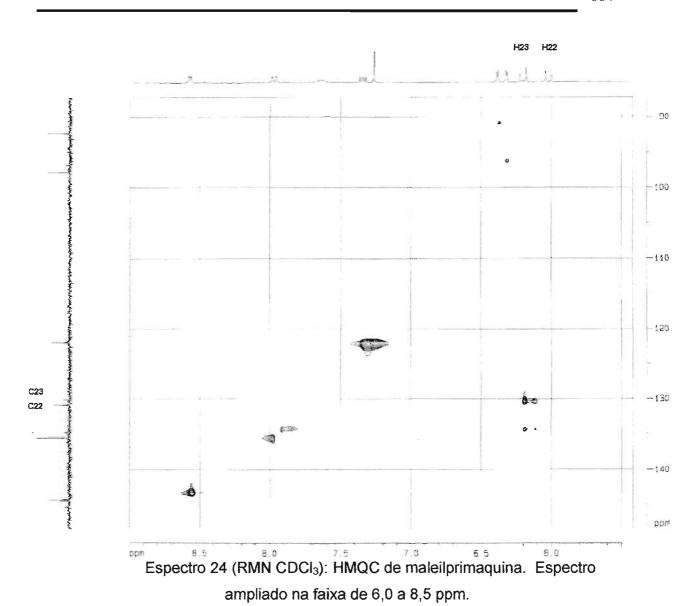
Espectro 22 (RMN ¹H,300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Maleilprimaquina. Regiões ampliadas do espectro 21, correspondente à faixa de 6,0 ppm até 6,4 ppm. (Os dois dubletos localizados em campo mais alto são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 22 e 23).

Quanto à análise por RMN ¹³C, o espectro não foi esclarecedor, portanto, foi necessário que se utilizasse a técnica bidimensional HMQC (espectro 23).

Nesta técnica ocorre a correlação entre o ¹³C e seu respectivo ¹H e com ela foi possível a determinação dos carbonos com maior precisão.

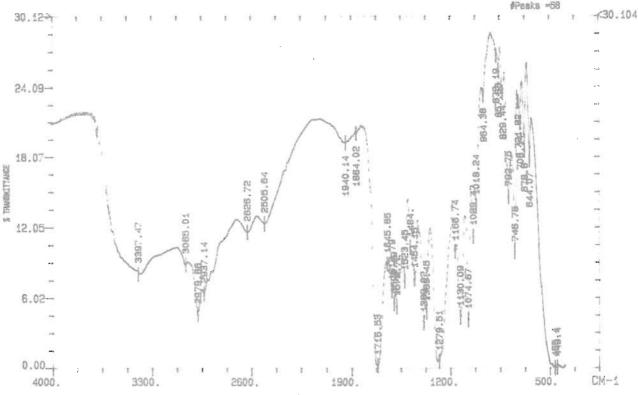


Espectro 23(RMN, CDCl₃): HMQC de maleilprimaquina.



O espectro 24 mostra a correlação entre os hidrogênios H22 e H23 com os seus respectivos carbonos, confirmando a estrutura da maleilprimaquina.

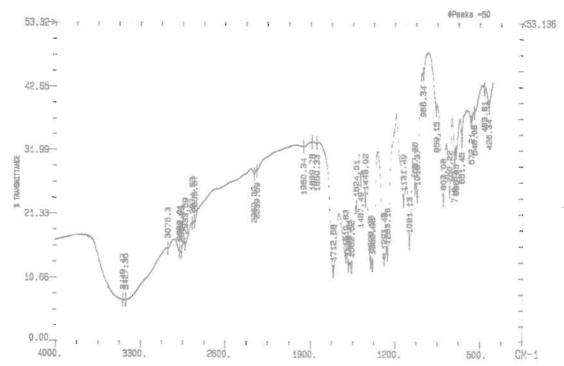
Quanto à síntese da ftalilprimaquina (experimento 19), encontraram-se dificuldades referentes à sua purificação e cristalização. A análise no infravermelho do produto bruto (espectro 25) indica que houve a formação do composto desejado, uma vez que se puderam visualizar as bandas de carbonila de ácido (1715 cm⁻¹) e de carbonila de amida (1645 cm⁻¹).



Espectro 25 (IV, NaÇlv cm⁻¹): Ftalilprimaquina bruta.

Na tentativa de recristalização ocorreu a formação de precipitado amarelo e muito fino, o qual não foi possível isolar, mesmo concentrando a amostra ao máximo. Provavelmente, o método de recristalização utilizado não foi eficaz.

A análise no infravermelho permitiu concluir que a purificação por meio de coluna cromatográfica não foi eficaz, pois apesar de se observar a presença do ácido (1712 cm⁻¹), não foi possível encontrar a banda de amida (espectro 26).



Espectro 26 (IV, NaCl, v cm⁻¹): Ftalilprimaquina eluída em coluna cromatográfica.

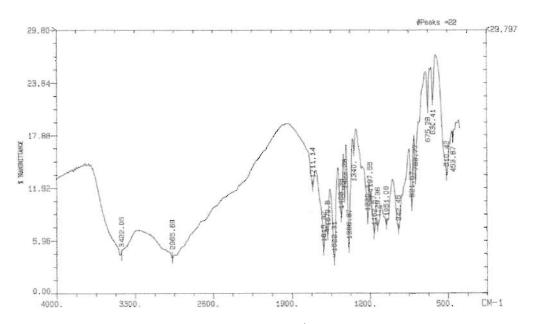
A eluição pela coluna cromatográfica também se mostrou ineficaz, pois foi obtida uma substância de aspecto viscoso, que a análise no infravermelho indicou não se tratar do grupo ftalil ligado à primaquina: observou-se a banda da carbonila de ácido, porém não a carbonila de amida.

O terceiro método empregado na purificação da ftalilprimaquina consistiu na extração do composto com diclorometano e água com a posterior recristalização de acetona. No processo de extração, era esperado que a ftalilprimaquina migrasse para a fase orgânica, no caso o diclorometano. Surpreendentemente, o composto migrou para a fase aquosa, que, posteriormente, foi evaporada, obtendo-se precipitado amarelo escuro e amorfo, através da recristalização de acetona. Uma hipótese para esta afinidade para a fase aquosa seria o fato de que o nitrogênio do anel quinolínico estivesse

protonado (Figura 39), portanto o composto estaria na forma de monofosfato de ftalilprimaquina.

Figura 39: Composto com nitrogênio quinolínico protonado.

A análise no infravermelho mostrou que o composto obtido realmente é a ftalilprimaquina, pois podem ser observadas as bandas de ácido a 1711 cm⁻¹ e de amida a 1618 cm⁻¹.



Espectro 27 (IV, KBr, v cm $^{-1}$): Ftalilprimaquina provavelmente protonada.

Atribuições IV (KBṛ, v cm⁻¹): 3422 (larga, vN-H amínico, vO-H, vC-H aromático); 2966 (larga, vC-H alifático); 1711 (fraca, vC=O ácido); 1615 (intensa, vC=O amida).

6.3 Síntese dos derivados "triglicerídicos" de primaquina

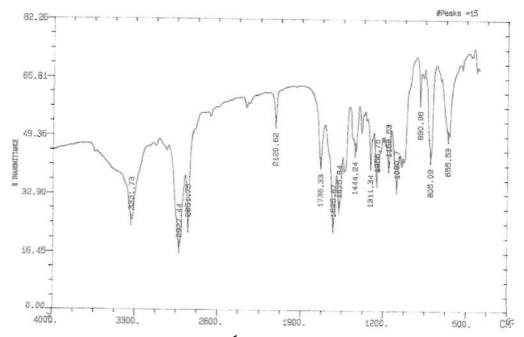
As sínteses dos derivados diglicerídicos foram realizadas utilizando THF como solvente. A escolha deste solvente deve-se ao fato de que a dicicloexiluréia (DCU), subproduto obtido nas sínteses que empregam DCC, é insolúvel em THF, facilitando, assim, sua retirada. Este procedimento é de grande valia, uma vez que DCU sempre é difícil de ser retirado.

As condições reacionais para a síntese da diestearilmaleilprimaquina (experimento 20) mostraram-se adequadas. Como citado anteriormente, o emprego da fluoresceína como revelador para glicerídios permitiu melhor visualização das placas de CCD, para acompanhamento da coluna cromatográfica, porém ainda assim, devido aos Rf muito próximos, pode-se concluir que o composto apresenta pequena contaminação do diglicerídeo de partida.

A análise no infravermelho (espectro 28) mostrou a presença das bandas de carbonilas de éster a 1736 cm⁻¹ e de amida a 1625 cm⁻¹, comprovando a formação do composto pretendido.

Atribuições: IV (KBr, vcm⁻¹): 3331 (intensa, vN-H, amínico); 2927, 2851 (fortes, vC-H alifático); 1736 (forte, vC=O éster); 1625 (intensa vC=O amida); 1575 (fraca, vC=C aromático).

RMN 1 H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,46-8,47 (dd, CH, H2); 7,85 -7,88 (dd, CH, H4); 7,23-7,27 (dd, CH, H3); 6,78-6,83 (d, CH, H8); 6,70-6,75 (d, CH, H10); 6,29-6,28 (d, CH, H23); 6,22-6,21 (d, CH, H22); 5,23, (m,CH,H27); 4,28(dd, CH2, H32); 4,24 (dd, CH2, H28); 3,82 (s, CH3, H20);3,57-3,64 (q, CH, H12); 3,31-3,52 (m, CH2, H15); 2,30 (t, 2 CH2, H53 e H36); 1,64-166 (d, CH3, H21); 1,58 (m, 2.CH2, H54 eH37) 1,26-1,27 (d, CH2, H13, H14); 1,18 (m,CH2,56 H do ácido graxo); 0,88 (t, CH3, 6 H, H69 e H52) (espectro 21).



Espectro 28 (IV, KBr, vcm⁻¹): Diestearilmaleilprimaguina.

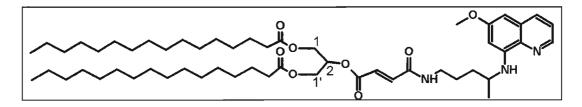
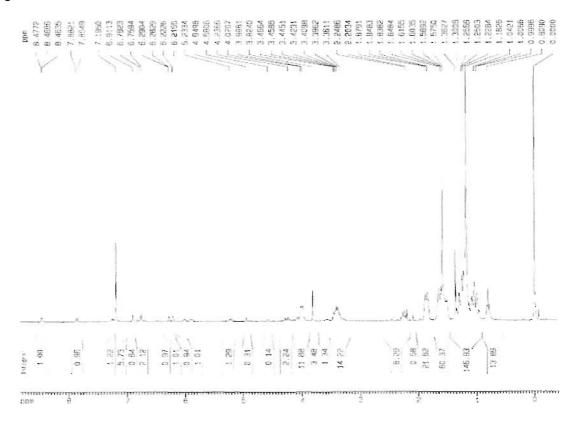


Figura 40: Diestearilmaleilprimaquina.

A análise por RMN ¹H (espectro 30) mostra o multipleto em 5,3 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do diglicerídio, antes localizado em 3,5 ppm. Este deslocamento para campo mais baixo mostra que houve a reação

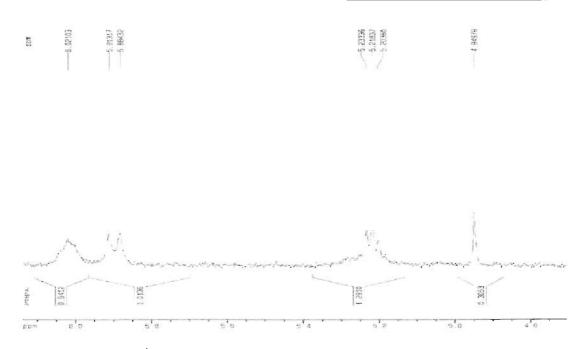
na hidroxila em 2, formando ligação éster entre a maleilprimaquina e o diglicerídeo.



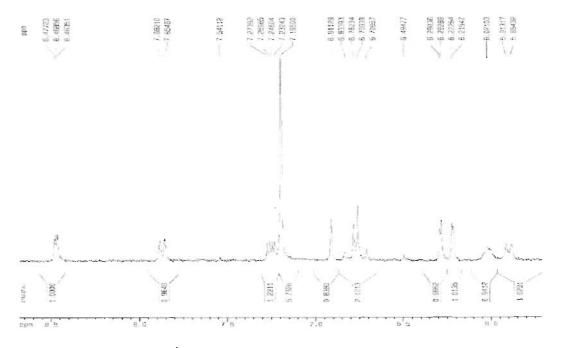
Espectro 29 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Diestearilmaleilprimaquina.

Outra informação importante obtida no espectro de RMN 1 H (espectro 30) é a presença dos sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos do anidrido maléico. Estes sinais estão na forma de dois dubletos presentes na região de 6,0-6,5 ppm.

Juntamente com os sinais supracitados, deve-se ressaltar a presença dos sinais referentes aos hidrogênios quinolínicos da primaquina, os quais podem ser observados na região de 7,0 - 8,5 ppm (espectro 31).

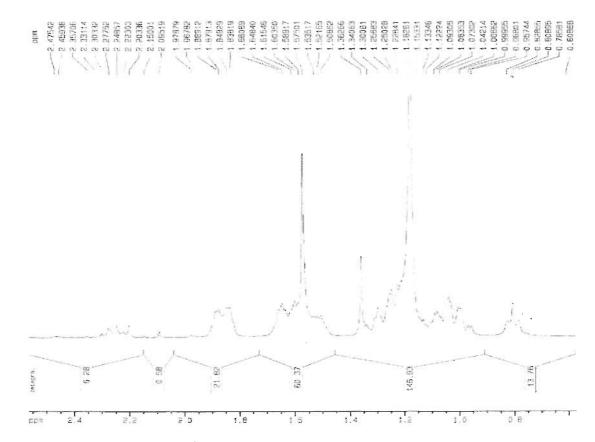


Espectro 30 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Região de 4,8-6,0 ppm , da diestearilmaleilprimaquina mostrando o multipleto em 5,3 ppm referente ao H2.



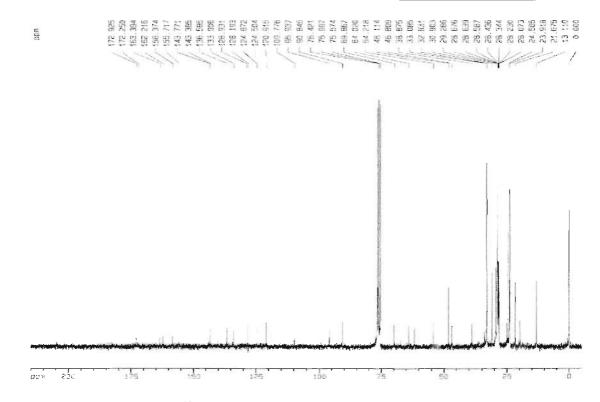
Espectro 31 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCI $_3$, δ ppm): Região ampliada de 6,0 a 8,0 ppm, da diestearilmaleilprimaquina mostrando sinais referentes ao anel quinolínico da primaquina.

Outra observação importante para a determinação da estrutura em questão é a presença dos sinais referentes às cadeias alifáticas dos diglicerídeos, localizados na região de 0,8 - 2,0 ppm, especialmente o sinal em 1,2 ppm, correspondente aos CH₂ das cadeias alquílicas (espectro 32).



Espectro 32 (RMN 1 H, 300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Região ampliada de 0,8-2,0 ppm. O sinal em 1,2 ppm é referente à cadeia alquílica do diglicerídeo.

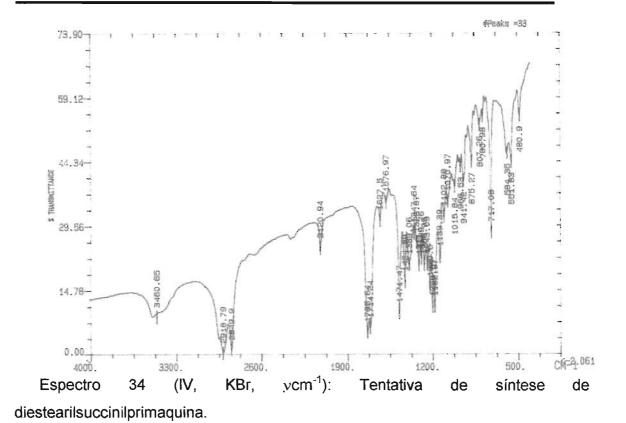
Através da análise de RMN ¹³C (espectro 33), foi possível concluir pela presença dos ésteres das posições 1, 2 e 3 do diglicerídeo ligado ao fármaco, representados pelos sinais dos carbonos carbonílicos, localizados em 172 e 173 ppm. Os sinais na região de 65-70 ppm indicam a presença apenas do triglicerídeo.



Espectro 33 (RMN¹³C, 75 MHz,CDCl₃, δ ppm): Diestearilmaleilprimaquina.

O experimento 21, a síntese do diestearilsuccinilprimaquina, apresentou algumas dificuldades em relação ao experimento 20. O procedimento empregado para realizar a síntese foi o mesmo, porém não ocorreu a condensação do diestearilglicerol com succinilprimaquina. Outro problema encontrado foi a separação por coluna cromatográfica, em que ocorreu a mistura da succinilprimaquina com o diglicerídeo.

A análise no infravermelho (espectro 34) mostra a presença das bandas de estiramento carbonila, referentes aos ésteres do diglicerídeo a 1735 cm⁻¹ e do grupo ácido da succinilprimaquina a 1714 cm⁻¹.



Atribuições: IV (KBr, v cm⁻¹): 3460 (intensa, vN-H, amínico); 2918, 2840 (fortes, vC-H alifático); 1735 (forte, vC=O éster); 1714(forte, vC=O ácido); 1627 (fraca, vC=O amida); 1575 (fraca, vC=C aromático).

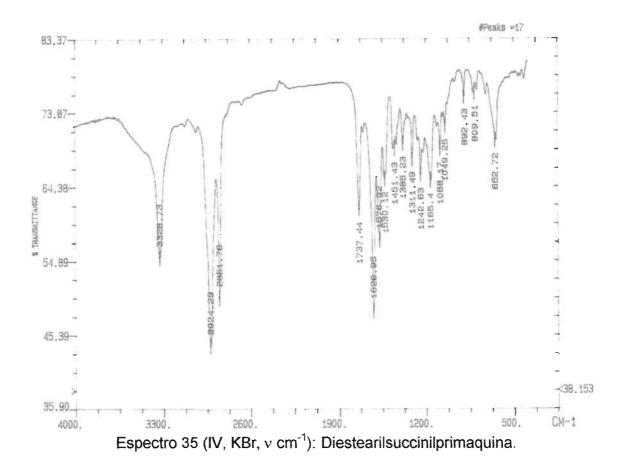
Acredita-se que a condensação não ocorreu devido às proporções de DCC, DMAP e succinilprimaquina. Outro fator pode ter sido a contaminação do diglicerídeo pelo monoglicerídeo.

As devidas alterações foram realizadas no experimento 22, em que as proporções entre DCC, DMAP e succinilprimaquina foram modificadas.

A fase móvel empregada também foi modificada, passando de diclorometano: acetato de etila 8:1 para 6:1.

A análise no infravermelho (espectro 35) mostra que houve a formação do composto, uma vez que podem ser visualizadas as bandas referentes a estiramento carbonila de éster a 1737 cm⁻¹ e a amida a 1626 cm⁻¹. Ainda é possível visualizar a banda em 3328 cm⁻¹, pertencente ao nitrogênio amínico da primaquina, e as bandas 2924 cm⁻¹ e 2861 cm⁻¹, referentes aos CH₂ da cadeia alifática do glicerídeo.

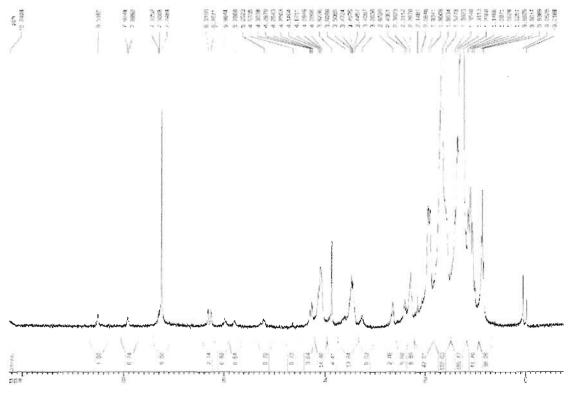
Atribuições: IV (KBr, v cm⁻¹): 3328 (intensa, vN-H, amínico); 2924, 2861 (fortes, vC-H alifático); 1737 (intensa, vC=O éster); 1626 (forte, vC=O amida); 1578 (fraca, vC=C aromático).



A análise por RMN ¹H (espectros 36 e 37) revelou a presença do multipleto em 5,28 ppm, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do diglicerídio.

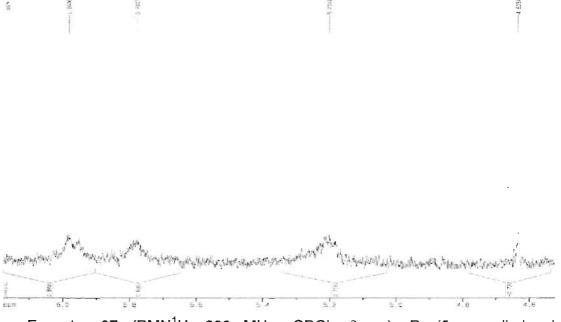
Figura 41: Diestearilsuccinilprimaquina.

Da mesma maneira que a diestearilmaleilprimaquina, o espectro (espectro 36) também mostra as bandas referentes à porção quinolínica da primaquina, localizada na região de 6,0 a 8,5 ppm, juntamente com os dois tripletos localizados em 2,38 ppm e 2,40 ppm, pertencentes ao grupo succinil ligado à primaquina e ao diglicerídeo. Também podem ser observados os sinais das cadeias alifáticas dos diglicerídeos localizados em 1,35 ppm (espectro 38).

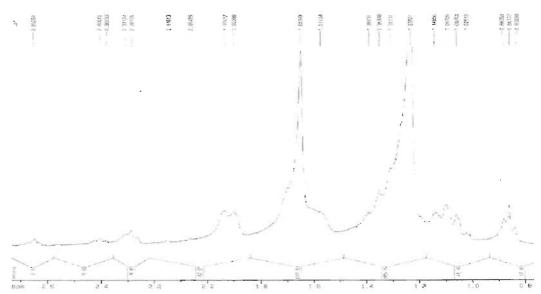


Espectro 36 (RMN¹H,300MHz, CDCl₃, δ ppm): Diestearilsuccinilprimaquina.

*Atribuiç*ões: **RMN** 1 H(300 MHz, CDCl₃δ ppm):): 8,51 (dd, CH, H2); 7,92 - 7,89 (dd, CH, H4); 7,31-7,30 (dd, CH, H3); 6,31 (d, CH, H8); 6,26 (d, CH, H10); 5,20, (m,CH,H27); 4,25-4,26(dd, CH2, H32); 4,14 -4,12 (dd, CH2, H28); 3,87(s, CH3, H20);3,40-3,60 (q, CH, H12); 3,26 (m, CH2, H15); 2,45-2,38 (t, CH2, H22);2,40-2,38 (t, CH2 H23) 2,30 (t, 2 CH2, H53 e H36); 1,65 (d, CH3, H21); 1,57 (m, 2.CH2, H54 eH37) 1,14 (d, CH2, H13, H14); 1,23 (m, CH2, 56 H do ácido graxo); 0,83 -0,88 (t, CH3, 6 H, H69 e H52).

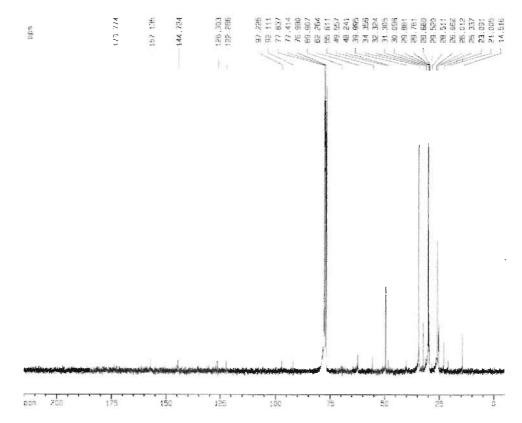


Espectro 37 (RMN¹H, 300 MHz, CDCl_{3, . 8}ppm): Região ampliada de 4,6-6,0 ppm mostrando o o multipleto em 5,2 ppm referente ao hidrogênio ligado no carbono 2 do diglicerídio.



Espectro 38 (RMN 1 H,300 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Regiões ampliadas de 0,8-2,6 ppm, mostrando os dois tripletos referentes ao grupo succinil ligado à primaquina e ao diglicerídeo.

Quanto ao espectro RMN ¹³C (espectro 39), é possível a visualização do sinal de carbonila de éster em 173 e 172 ppm, juntamente com os sinais em 55, 62 e 69 ppm, referentes aos carbonos 1, 2 e 3 do diglicerídeo.

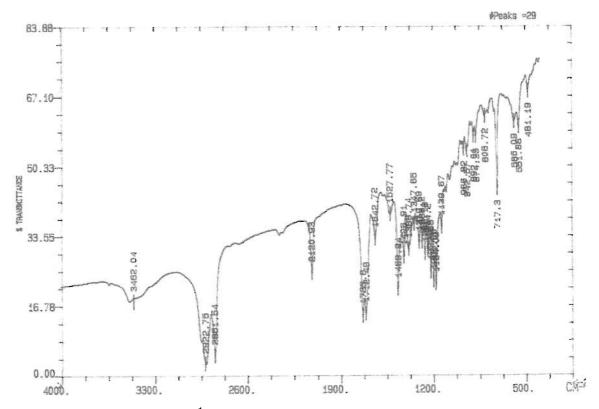


Espectro 39(RMN¹³C,75 MHz, CDCl₃δ ppm): Diestearilsuccinilprimaquina.

A síntese dos derivados do diglicerídeo do ácido palmítico obedeceu ao mesmo procedimento que aquela dos diglicerídeos do ácido esteárico.

O produto da síntese da dipalmitoilmaleilprimaquina (experimento 23) foi analisado no infravermelho (espectro 40), constatando-se que a reação não ocorreu. Pode-se observar a presença da banda de estiramento carbonila de ácido a 1712 cm⁻¹ e de éster a 1735 cm⁻¹, indicando que não houve a ligação do glicerídeo com a hemiamida de primaquina.

Atribuições: IV (KBr, v cm⁻¹): 3462 (fraca, vN-H, amínico); 2922, 2861 (fortes, vC-H alifático); 1735 (forte, vC=O éster); 1715(forte, vC=O ácido); 1642 (fraca, vC=O amida).

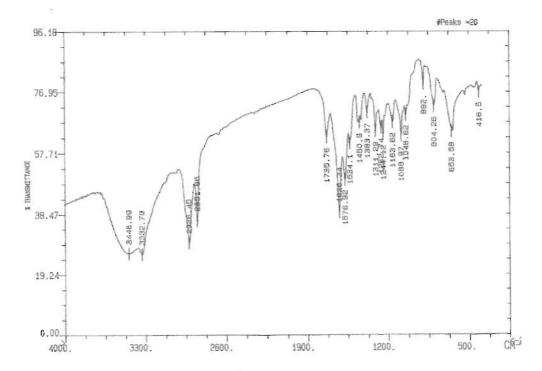


Espectro 40 (IV, KBr, v cm⁻¹): Tentativa de síntese da dipalmitoilmaleilprimaquina.

Acredita-se que o composto pretendido não se formou devido à contaminação do diglicerídeo pelo monoglicerídeo. Portanto, no experimento 24 o diglicerídeo foi repurificado.

O composto obtido foi analisado no infravermelho (espectro 41) e mostrou as bandas de estiramento carbonila de éster a 1735 cm⁻¹ e de amida a 1626 cm⁻¹, assim como se observaram as bandas de CH₂ alifático 2926 cm⁻¹ e 2801 cm⁻¹. Também puderam ser observadas as bandas referentes ao nitrogênio amínico e ao anel quinolíco, localizadas em 3346 cm⁻¹ e 3332 cm⁻¹, respectivamente.

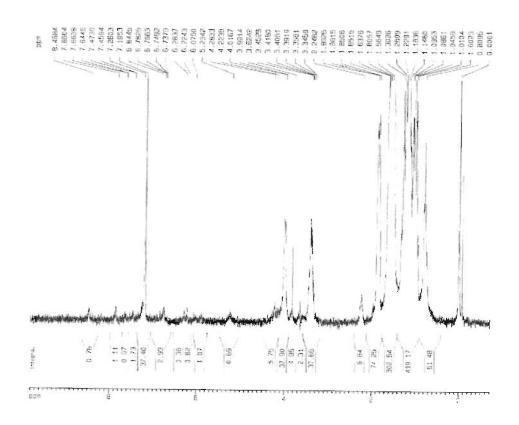
Atribuições IV (KBr, v cm⁻¹): 3346 (intensa, vN-H, amínico); 3332 (larga, vO-H) 2926, 2801 (fortes, vC-H alifático); 1735 (fraca, vC=O éster); 1626 (fraca, vC=O amida); 1576 (fraca, vC=C aromático).



Espectro 41 (IV, KBr, vcm⁻¹): Dipalmitoilmaleilprimaquina.

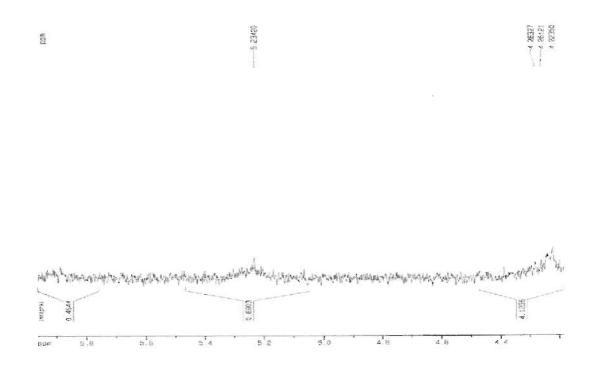
Figura 42: Dipalmitoilmaleilprimaquina.

De maneira análoga aos outros derivados diglicerídicos, a dipalmitoilmaleilprimaquina apresentou multipleto na região de 5,23 ppm na análise de RMN ¹H (espectro 42, 43), assim como os sinais da maleilprimaquina na região de 6,0-8,5 ppm.



Espectro 42 (RMN¹H,300 MHz,CDCl₃, δ ppm): Dipalmitoilmaleilprimaquina.

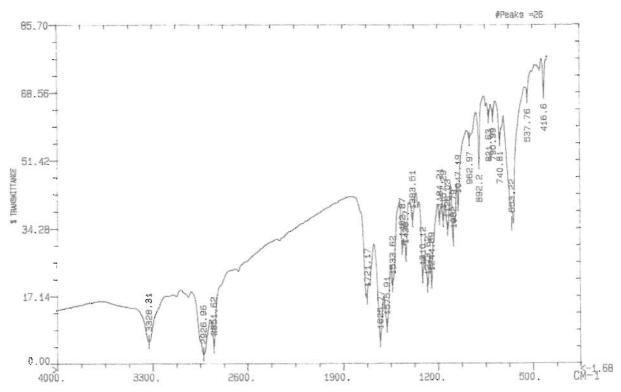
*Atribuiç*ões: **RMN** 1 H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,46-8,47 (dd, CH, H2); 7,85 -7,88 (dd, CH, H4); 7,23-7,27 (dd, CH, H3); 6,78-6,83 (d, CH, H8); 6,74(d, CH, H10); 6,29-6,28 (d, CH, H23); 6,0 (d, CH, H22); 5,29, (m,CH,H27); 4,28(dd, CH2, H32); 4,24 (dd, CH2, H28); 3,82 (s, CH3, H20);3,57-3,64 (q, CH, H12); 3,31-3,52 (m, CH2, H15); 2,30 (t, 2 CH2, H53 e H36); 1,64-166 (d, CH3, H21); 1,58 (m, 2.CH2, H52 eH37) 1,22 (d, CH2, H13, H14); 1,23 (m, CH2, 48 H do ácido graxo); 0,88 (t, CH3, 6 H, H50 e H65).



Espectro 43 (RMN¹H, 300 MHz, CDCl₃, δppm): Região de 5,0-6,0 ppm ampliada, dipalmitoilmaleilprimaquina.

Finalizando as sínteses dos derivados diglicerídicos de primaquina, foi realizada a síntese da dipalmitoilsuccinilprimaquina (experimento 25). Neste experimento a análise no infravermelho (espectro 44) mostra as bandas de estiramento carbonila de éster a 1721 cm⁻¹, porém pode-se observar que há pequena contaminação por ácido, já que a banda de éster parece encobrir a banda do contaminante. Observa-se, também, que há a banda de estiramento carbonila de amida a 1625 cm⁻¹, indicando que houve a ligação entre o glicerídeo e a hemiamida, ainda que o produto final tenha contaminação.

Atribuições: IV (KBr, y cm⁻¹): 3328 (fraca, yN-H, amínico); 2929, 2851 (fortes, yC-H alifático); 1721 (fraca, yC=O éster); 1626 (forte, yC=O amida); 1575 (fraca, yC=C aromático).

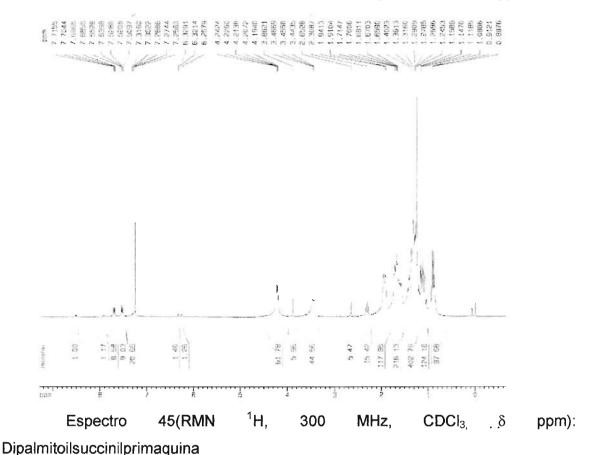


Espectro 44 (IV, KBr, v cm⁻¹): Dipalmitoilsuccinilprimaquina.

Figura 43: Dipalmitoilsuccinilprimaquina.

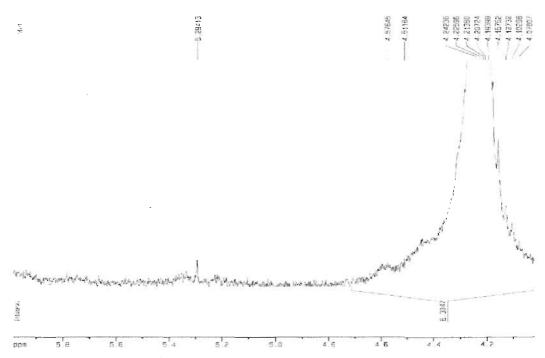
A análise de RMN ¹H (espectros 45, 46) mostra o multipleto em 5,23 ppm, indicando que houve a ligação do composto, embora a amostra estivesse muito diluída e o espectro mal definido.

Também são observados os sinais relativos à porção quinolínica da primaquina em 6,0-8,0 ppm e as cadeias alifáticas do glicerídeo em 1,3 ppm.



*Atribuiç*ões: **RMN** 1 H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,52 (dd, CH, H2); 7,92 - 7,89 (dd, CH, H4); 7,31-7,30 (dd, CH, H3); 6,32 (d, CH, H8); 6,27 (d, CH, H10); 5,20, (m,CH,H27); 4,24 (dd, CH2, H32); 4,14 -4,12 (dd, CH2, H28); 3,88(s, CH3, H20);3,45 (q, CH, H12); 3,26 (m, CH2, H15); 2,30 (t, CH2, H22);2,16 (t, CH2 H23) 1,95 (t, 2 CH2, H53 e H36); 1,68 (d, CH3, H21); 1,57 (m, 2.CH2, H54 eH37) 1,20 (d, CH2, H13, H14); 1,24 (m, CH2, 48 do ácido graxo);0,83 -0,88 (t, CH3, 6 H, H50)

e H65).



Espectro 46 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Região ampliada de 5,0–6,0 ppm mostrando o sinal em 5,23 ppm.

6.3.1 Síntese dos derivados diglicerídicos de primaquina utilizando o grupo ftalil como espaçante

As sínteses dos derivados diglicerídicos de primaquina utilizando o grupo ftalil como espaçante apresentaram algumas dificuldades. Inicialmente, foram utilizados como reagentes de partida dipalmitoilglicerol e diestearilglicerol, juntamente com a hemiamida de primaquina, ftalilprimaquina, utilizando como agentes condensantes DCC e DMAP.

Esta primeira metodologia foi realizada de duas maneiras diferentes. Na metodologia aplicada nos experimentos 26 e 27, solubilizou-se a ftalilprimaquina e manteve-se sob agitação com o DCC, para posteriormente adicionar os diglicerídeos com o DMAP.

A análise cromatográfica realizada para acompanhar a reação, assim como a realizada após 48 horas de reação, indicou que não houve a formação do produto desejado.

A provável explicação para a não formação do produto está no fato de que o grupo ftalil da ftalilprimaquina apresenta suas carbonilas muito próximas e em uma estrutura rígida, o que favorece a ciclização da carbonila do grupo ácido com o nitrogênio da amida. A ativação da carbonila pelo DCC aumenta esta ciclização. A Figura 43 mostra a ciclização proposta para o grupo ftalil.

Figura 44: Reação de ciclização provável da ftalilprimaquina.

Para tentar evitar ou até mesmo diminuir a formação do derivado cíclico, a técnica anteriormente descrita foi modificada. Ao invés de adicionar a ftalilprimaquina com o DCC e posteriormente adicionar o diglicerídeo, desenvolveu-se a reação com adição concomitante dos reagentes, como relatado nos experimentos 28 e 29. Com isto, esperava-se que a carbonila da ftalilprimaquina seria ativada, reagindo imediatamente com o diglicerídeo, o que a análise cromatográfica indicou não ter ocorrido.

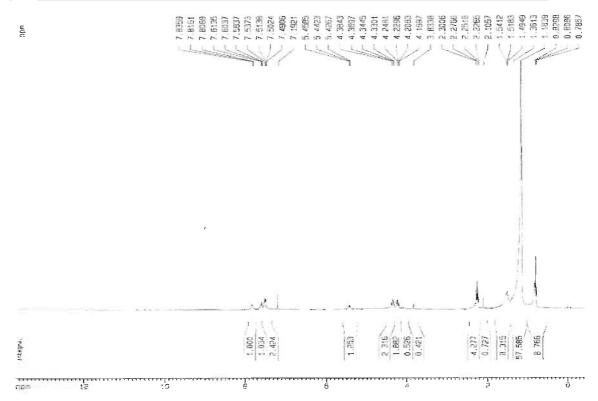
Diante das dificuldades expostas, propôs-se uma nova rota sintética, em que o grupo ftalil fosse primeiramente ligado ao diglicerídeo, formando o hemiéster do diglicerídeo, para então reagir com a primaquina.

6.3.1.2 Tentativa de síntese do ftalildipalmitoilglicerol e ftalildiestearilglicerol

O hemiéster do diglicerídeo foi obtido através da reação do anidrido ftálico com o diglicerídeo do ácido palmítico, utilizando-se ácido acético como catalisador, conforme descrito no experimento 30.

A análise por RMN H¹ mostrou sinais na região de 8,0 a 6,0 ppm, referentes aos hidrogênios do grupo ftalil. Sinal muito importante pode ser observado em 5,4 ppm. Este multipleto, originalmente em 3,5 ppm, é referente ao hidrogênio localizado na posição 2 do glicerol em derivados diglicerídicos. Esta passagem de 3,5 para 5,4 ppm indica que ocorreu a substituição da hidroxila alcóolica por éster na posição 2, uma vez que há desproteção dos hidrogênios pelo caráter do grupo carbonílico. Ainda podem-se observar os sinais referentes às cadeias alquílicas do diglicerídeo na região de 1,36 ppm. O espectro 47 mostra os sinais descritos.

Figura 45: Ftalildipalmitoilglicerol.



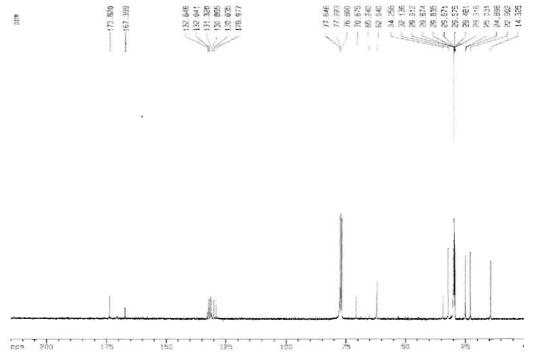
Espectro 47 (RMN¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Ftalildipalmitoilglicerol.

Atribuições: RMN¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,78-0,82(t,CH₃,6H); 1,18-1,36 (m, CH2, 40H);1,54-1,49 (m, CH2, 4H); 2,20-2,30(t,CH2,4H); 4,24-4,18(dd,OCH2,2H); 4,38-4,33(dd,OCH,2H); 5,45-5,44 (m, CH, 1H, CH₁₂); 7,49-7,53 (t, CH $_{aromático}$, H₅); 7,58 –7,61 (t, CH $_{aromático}$, H₄); 7,80-7,81 (d, CH $_{aromático}$, H₆); 7,81-7,83 (d, CH $_{aromático}$, H₃).

A análise por RMN C¹³ mostra sinal em 173 ppm, indicando a presença das carbonilas dos ésteres do diglicerídeo. O carbono referente à carbonila do éster do grupo ftalil aparece em 167 ppm. O sinal do carbono do ácido carboxílico pode ser observado em 171 ppm. Observam-se, na região de 128 a 132 ppm, seis sinais referentes aos carbonos do anel aromático do grupo ftalil.

Na região de 60 a 70 ppm podem se observar dois sinais, um referente aos carbonos 1 e 3 e outro referente ao carbono 2 do diglicerídeo substituído.

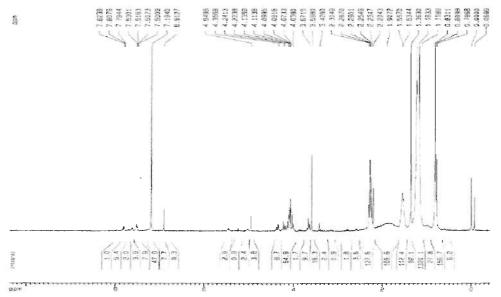
O espectro 48, a seguir, mostra os sinais descritos.



Espectro 48(RMN¹³C , 75 MHz, CDCl₃, δ ppm): Ftalildipalmitoilglicerol.

Atribuições: RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 173,82 (C₂₀; C₁₅); 171(C₉); 167(C7) 132, 64(C₁), 132,04(C₆); 131,32 (C₅); 130,86(C₂); 130,35(C₃); 128,97(C₄); 70,67 (C₁₂); 62,04(C₁₃,C₁₈); 34,25 (C₂₂,C₃₇); 32,13(C₃₄, C₄₉); 29,91-29,31(C₂₄₋₃₃,C₃₉₋₄₈); 25,03-24,89(C₂₂-C₃₇); 22,90(C₃₅,C₅₀); 14,49(C₃₆,C₅₁).

A síntese do ftalildiestearilglicerol (experimento 31) procedeu da mesma maneira. O espectro apresenta sinais que indicam a presença do composto. De maneira semelhante, comprovou-se a ligação do diglicerídeo através do multipleto em 5,4 ppm. O espectro de RMN ¹³C (espectro 50) apresentou também as carbonilas de éster em 173 e 167 ppm e a carbonila de ácido em 171 ppm. A seguir, encontram-se os espectros de e RMN ¹H (espectro 49) e ¹³C (espectro 50) do ftalildiestearilglicerol.



Espectro 49 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃ δ ppm): Ftalildiestearilglicerol.

Atribuições: RMN 1 H(300 MHz, CDCl $_{3}$, δ ppm: 0,78-0,82(t,CH $_{3}$,6H); 1,18-1,36 (m, CH2, 48H);1,54-1,49 (m, CH2, 4H); 2,20-2,30(t,CH2,4H); 4,24-4,18(dd,OCH2,2H); 4,38-4,33(dd,OCH,2H); 5,45-5,44 (m, CH, 1H, CH $_{12}$); 7,49-7,53 (t, CH $_{aromático}$, H $_{5}$); 7,58 –7,61 (t, CH $_{aromático}$, H $_{4}$); 7,80-7,81 (d, CH $_{aromático}$, H $_{6}$); 7,81-7,83 (d, CH $_{aromático}$, H $_{3}$).

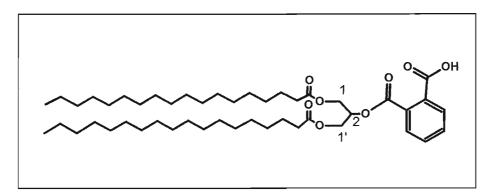
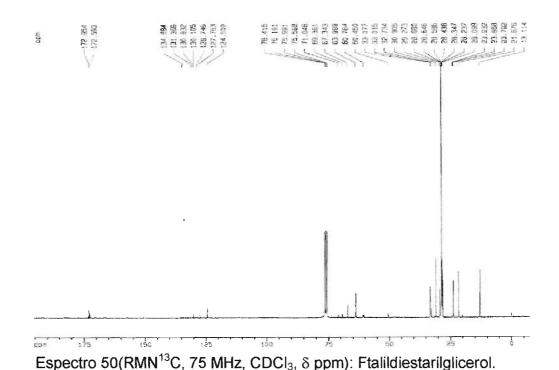


Figura 46: Ftalildiestearilglicerol.



Atribuições: RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm): 173,82 (C₂₀; C₁₅); 171(C₉); 167(C7) 132, 64(C₁), 132,04(C₆); 131,32 (C₅); 130,86(C₂); 130,35(C₃); 128,97(C₄); 70,67 (C₁₂); 62,04(C₁₃,C₁₈); 34,25 (C₂₂,C₃₉); 32,13(C₃₆, C₅₃); 29,91-29,31(C₂₄₋₃₅,C₄₁₋₅₂); 25,03-24,89(C₂₂-C₃₉); 22,90(C₃₇,C₅₄); 14,49(C₃₈,C₅₅).

6.3.1.3 Tentativa de síntese da dipalmitoilftaliprimaquina

No experimento 32 foi tentada a condensação entre o ftalildipalmitoilglicerol e a primaquina.

A primeira dificuldade encontrada foi a escolha do sistema solvente. Como citado anteriormente, esta reação de condensação do diglicerídeo ocorria utilizando THF como solvente. No entanto, como o difosfato de primaquina não é solúvel em THF, decidiu-se realizar a reação em duas etapas, utilizando a mistura de etanol e THF.

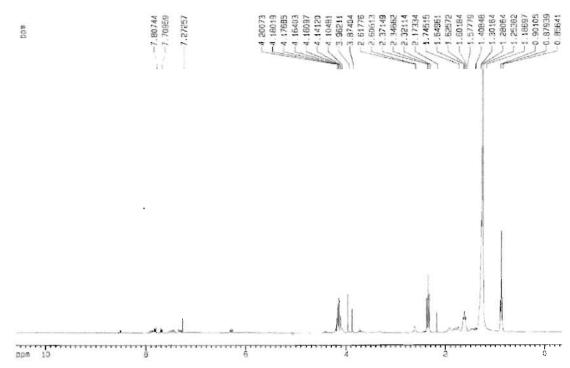
Na primeira etapa, o difosfato de primaquina foi submetido à agitação com trietilamina e etanol como solvente, a fim de liberar a base livre de primaquina. Na etapa seguinte, os agentes condensantes e o diglicerídeo foram adicionados à reação em solução com THF. Esta mistura apresentou aspecto de emulsão. Este sistema solvente utilizado não permitiu a precipitação do DCU formado durante a síntese. Embora não podendo retirar o DCU através de filtração, pode-se eliminálo através da coluna cromatográfica.

A análise por ¹H RMN mostrou na região de 8,5 ppm a 6,0 ppm os sinais referentes à primaquina, juntamente com os sinais do grupo ftalil ligado ao diglicerídeo. Pode-se notar na região 7,55 a 7,44 ppm dois triplos dubletos, que representam dois hidrogênios (26 e 27) do anel aromático do grupo ftalil. Antes da condensação do ftalildiglicerídeo, estes hidrogênios eram representados por dois dubletos. O aparecimento destes triplos dubletos indica que após a condensação passou a ocorrer o acoplamento *meta* entre os hidrogênios do grupo ftalil.

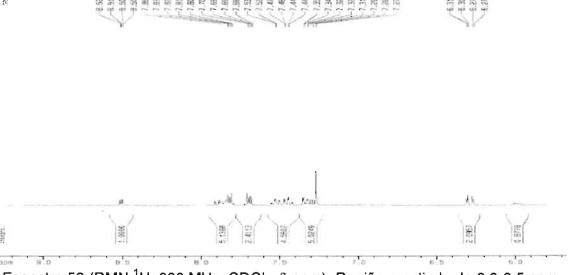
Aínda, na região de 6,0-8,0 ppm puderam-se notar dois quadrupletos acoplando entre si. Estes quadrupletos indicam a contaminação pelo ácido ftálico formado na síntese do ftalil diglicerídeo.

Pode-se observar na região de 5,0-6,0 ppm o multipleto referente ao hidrogênio da posição 2 do glicerol, aqui representado por H₃₁. Houve pequeno deslocamento desse mulipleto de 5,4 para 5,5 ppm, indicando a ligação do diglicerídeo.

Deve-se mencionar que não é possível observar alguns sinais, como, por exemplo, os sinais dos hidrogênios H₂₁, H₁₃, H₁₄ e H₁₅. Estes encontram-se encobertos pela cadeia alquílica do diglicerídeos. O espectro 51 de RMN ¹H do derivado diglicerídico de primaquina e a respectiva ampliação da região 6,0-8,5 ppm (espectro 52) são mostrados a seguir.



Espectro 51(RMN¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Dipalmitoilftalilprimaquina.



Espectro 52 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ ppm): Região ampliada de 6,0-8,5 ppm.

Atribuições: RMN¹H(300 MHz, CDCl_{3,...} δ ppm): 0,78-0,82(t,CH₃,6H); 1,18-1,36 (m, CH2, 40H, H₅₇₋₆₆ e H₄₂₋₅₁);1,60-1,64 (m, CH2, 4H,H₅₆ e H₄₁); 2,32-2,37(t,CH2,4H, H₅₅ e H₄₀); 3,58-3,64(q, CH, H₁₂); 3,87 (s, CH3, H₂₀)4,08-4,14 (dd,OCH2,2H, H₃₂); 4,16-4,18(dd,OCH,2H, H₃₆); 5,52 (m, CH, 1H, CH₃₁); 6,27 (d, CH_{quinolfnico}, H₁₀);6,31 (d, CH_{quinolfnico}, H₈); 7,32-7,29 (dd, CH_{quinolfnico}, H₃);7,33 (d, CH aromático, H₂₄); 7,35 (d, CH aromático, H₂₇); 7,44-7,47 (td, CH aromático, H₂₅); 7,50-7,55 (td, CH aromático, H₂₆); 7,84 (s, NH₁₁); 7,87 (s, NH₁₁); 7,91-7,88 (dd, CH_{quinolfnico}, H₄);8,50-8,52 (dd, CH quinolfnico, H₂)

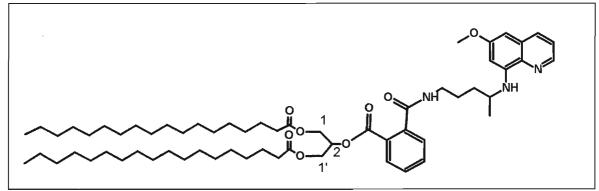


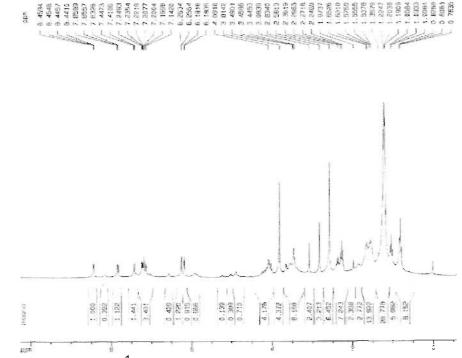
Figura 47: Dipalmitoillftalilprimaquina.

6.4. Síntese dos derivados diglicerídicos do ácido decanóico

O didecanoilsuccinilprimaquina foi obtido através do experimento 34. Para a obtenção deste derivado partiu-se do diglicerídeo do ácido decanóico, o qual foi condensado com a succinilprimaquina.

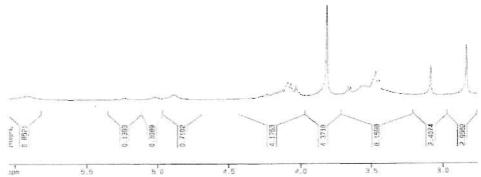
A análise por RMN ¹H (espectro 53) mostra que houve a formação do produto pretendido, pois apresenta o multipleto em 5,03 ppm, referente ao hidrogênio localizado na posição 2 do glicerol. O espectro 54 destaca o multipleto em 5,3 ppm.

O espectro 53 ainda apresenta os sinais referentes à primaquina na região de 6,0-8,0 ppm e a porção do glicerídeo em 1,0-2,0 ppm.



Espectro 53 (RMN¹H,300MHz, CDCl₃, δ ppm): Didecanoilsuccinilprimaquina.



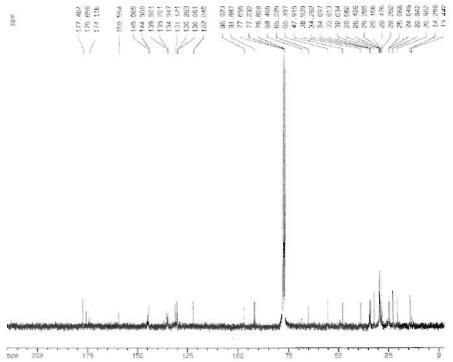


Espectro 54 (RMN ¹H, 300MHz, CDCl₃, δppm): região ampliada do didecanoilsuccinilprimaquina 3,0-6,0 ppm

Atribuições: RMN¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,85-0,89(t,CH₃,6H); 1,25-1,40 (m, CH2, 24H);1,62-1,75 (m, CH2, 4H); 2,31(t,CH2,4H); 3,82 (s, OCH3, 3H); 4,06-4,22 (m,OCH2,4H); 5,03 (m, CH, 1H); 6,22-6,21 (d, CH, 1H); 6,29-6,28 (d, CH, 1H); 6,70-6,75 (d, CH, 1H); 6,78-6,83 (d, CH, 1H); 7,23-7,27 (dd, CH, 1H); 7,85-7,88 (dd, CH, 1H); 8,46-8,47 (dd, CH, 1H).

A análise por ¹³C (espctro 55) mostra que existe a contaminação com succinilprimaquina. O sinal encontrado em 177 ppm, referente a carbono carboxílico, confirma a contaminação.

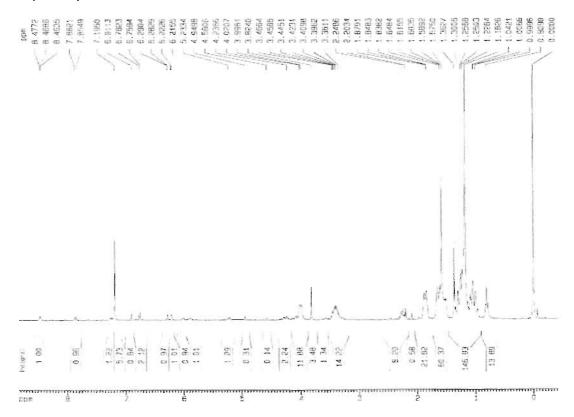
Esta contaminação provavelmente ocorreu devido à fase móvel empregada na coluna cromatográfica. Como este diglicerídeo é menos lipofílico em relação aos de cadeia mais longa, isto fez com que o Rf do diglicerídeo e da succinilprimaquina se aproximassem, dificultando a separação.



Espectro 55 (RMN 13 C, 75 MHz, CDCl $_3$, δ ppm): Didecanoilglicerol contaminado.

A condensação da maleilprimaquina com o didecanoilglicerol também se mostrou eficaz, apresentando o multipleto em 5,2 ppm, o que identifica a condensação do derivado diglicerídico.

O espectro 56 mostra a condensação do derivado didecanoilglicerol com a maleilprimaquina.



Espectro 56 (RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δppm): Didecanoilmaleiprimaquina.

Atribuições: **RMN**¹H(300 MHz, CDCl₃, δ ppm): 0,85-0,89(t,CH₃,6H); 1,25-1,40 (m, CH2, 24H);1,62-1,75 (m, CH2, 4H); 2,31(t,CH2,4H); 3,82 (s, OCH3, 3H); 4,06-4,22 (m,OCH2,4H); 5,23 (m, CH, 1H); 6,22-6,21 (d, CH, 1H); 6,29-6,28 (d, CH, 1H); 6,70-6,75 (d, CH, 1H); 6,78-6,83 (d, CH, 1H); 7,23-7,27 (dd, CH, 1H); 7,85 -7,88 (dd, CH, 1H); 8,46-8,47 (dd, CH, 1H).

7. CONCLUSÕES

- Foram sintetizados derivados diglicerídicos dos ácidos palmítico, esteárico e decanóico, como transportadores de primaquina, na obtenção de pró-fármacos de ação prolongada e menor toxicidade. O método utilizado foi desenvolvido por ocasião da realização do presente trabalho;
- Através das tentativas para otimizar a síntese dos diglicerídeos pode se concluir que a reação não apresentava melhor desempenho devido à ativação insuficiente do ácido graxo pelo DBU. O aumento na proporção de DBU em relação ao ácido graxo e o aquecimento nos primeiros 30 minutos levou ao aumento do rendimento;
- Na síntese dos diglicerídeos, o tempo ideal de reação é de 4 horas, embora o rendimento tenha sido da ordem de apenas 40%;
- Com a otimização de síntese dos diglicerídeos foi possível realizar purificação menos trabalhosa e custosa, uma vez que a coluna cromatográfica foi dispensada, poupando gastos com solvente e sílica;
- Para a obtenção do diglicerídio de decanoíla, foi sintetizado o ácido decanóico. O método empregado, com formação do sal potássico in situ, mostrou-se útil, propiciando aumento do rendimento desse ácido, o que conduziu ao desenvolvimento, com êxito, da síntese do respectivo diglicerídeo;
- A síntese das hemiamidas de primaquina foi realizada com eficácia, no caso da ftalilprimaquina, inclusive, que apresentou algumas dificuldades sintéticas, posteriormente superadas;

- A condensação entre os diglicerídeos -- dialmitoilglicerol e diestearilglicerol -- e
 as hemiamidas de primaquina succinil e maleil --, utilizando os agentes
 condensantes DCC e DMAP, mostrou-se satisfatória;
- A purificação dos derivados diglicerídicos por coluna cromatográfica não foi totalmente eficaz e ainda pode ser aprimorada;
- A síntese do derivado triglicerídico de primaquina utilizando grupo ftalil como espaçante mostrou-se ineficaz, quando se utilizou ftalilprimaquina como reagente de partida;
- A síntese do ftalildipalmitoilglicerol e do ftalildiestearilglicerol para a síntese posterior do pró-fármaco mostrou-se eficaz, utilizando-se refluxo e ácido acético como catalisador. No entanto, há necessidade de se aprimorar a purificação;
- Utilizando-se o ftalildiglicerídeo, comprovou-se que é possível evitar a ciclização do grupo ftalil e conseqüentemente condensar o diglicerídeo com a primaquina.
- Todos os derivados triglicerídicos sintetizados apresentaram degradação após 30 dias.

8. PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO

- Avaliar as causas da degradação dos compostos;
- Sintetizar derivados diglicerídicos do ácido undecilênico
- Sintetizar os padrões dos prováveis produtos de liberação para realizar os ensaios de estabilidade e liberação enzimática;
- Realizar ensaios de estabilidade química e liberação enzimática conforme descrito em metodologia a seguir:

Ensaios cinéticos (Scriba, 1993)

Os ensaios de liberação do fármaco serão realizados por 3 métodos de hidrólise: química, em plasma humano e de ratos e aquela mediada por lipase pancreática porcina.

Hidrólise química

A hidrólise química será estudada à temperatura de 37±0,2 °C, em tampões 0,05 *M* de glicina/HCl, citrato de sódio/HCl, fosfato, borato e glicina/HCl, ajustados para força iônica igual a 0,5, pela adição de porções equivalentes de KCl.

Hidrólise em plasma humano e de ratos

Será realizado em plasma heparinizado de humanos e ratos.

Hidrólise com lipase pancreática porcina

As amostras dos derivados "triglicerídicos" a serem analisadas devem ser dispersas em mistura de 1:4 de etanol e os derivados em teste com solução aquosa a 25 mM de taurodesoxicolato de sódio, mediante sonicação. Esta dispersão deverá ser incubada com lipase pancreática porcina (375 UmL⁻¹), em

0,1 *M* de ácido 1,4-piperazinodietanossulfônico, pH 6,5, ou tampão Tris pH 7,4 e 8,5, à temperatura de 37 °C. As soluções incubadas deverão ser resfriadas em 0,5 μL de ácido perclórico 0,5 *M* gelado, diluídas em 850 μL de solução de água e acetonitrila (80:20,v/v) e posteriormente centrifugadas a 2 500g, por 10 minutos. O líquido sobrenadante deve ser analisado em HPLC.

Avaliar a atividade biológica dos compostos sintetizados:

Ensaio biológico

O ensaio dos compostos obtidos em malária experimental por *P. berghei* será efetuado no Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da USP, com a colaboração do Prof. Dr. Heitor Franco Andrade Júnior.

O ensaio consiste na utilização de grupos de quatro camundongos inoculados com 1x10⁷/mL em cada camundongo mais o composto em teste, em várias diluições conforme o derivado. Após o primeiro dia de inóculo, são feitas lâminas de esfregaço de sangue colhido da cauda do camundongo. As lâminas são fixadas com metanol e coradas com corante Giemsa, para posterior leitura em microscópio óptico. Acompanha-se a parasitemia a cada dois dias, verificando—se o índice de mortalidade e a invasão das células pelo parasita.

Por último, os resultados de parasitemia são calculados em porcentagem e análisados em gráfico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTO, O., SCHEREIBER, J., MASON, R.P. Direct ESR detection of a free radical intermediated during the peroxidase-catalized oxidation of the antimalarial drug primaquine. *Biochem. Pharmacol., Oxford,* v.37, n.14, p.2791-2797, 1988.
- BALANT, L.P., DOELKER, E. Metabolic considerations in prodrug design.
 In: WOLFF, M. E. Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery.
 v. 1: Principles and practice. New York: Wiley-Interscience., p. 949-982. 1995.
- BARRY, P.J., CRAIG., B.M. Glyceride synthesis. *Can. J. Chem.* Montreal, v.33, p.716-721, 1954.
- BENTLEY, P.H., McCRAE, W. An efficient sinthesis of simmetrical diglycerides. *J.Org. Chem.*Washington, v.35, p. 2082, 1970.
- BODOR, N. Novel approaches to the design of safer drugs: Soft drugs and site-especific chemical delivery systems. *Adv. Drug Res.*, v.13, p.255-331, 1984.
- BOLCHOLZ, L. J.C., GELASCO, A. K., JOLLOW, D.J., MCMILLAN, D.C. Primaquine induced anemia: formation of free radicals in rat erythrocytes exposed to 6-methoxy-8-hidroxylaminoquinoline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Bethesda, v.303, n.3, p.1121-1129, 2002.
- BOWMAN, S., HORROCKS,P. Assessing the impact of *Plasmodium falciparum* genome sequencing. *Microb. Inf.*, v.2, p.1479-1487, 2000.

- BRUCE-CHWATT, L.J. Chemotherapy of malaria, 2nd ed. revised, Geneva: World Health Organization, 1986.
- BUNDGAARD, H., Ed. Prodrug design. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, Barcelona, v .16,n. 5, p. 443-458. 1991.
- CASTEEL, D. A. Antimalarial agents. In. WOLF, M.E., Burger's medicinal chemistry and drug discovery. 5. Ed. Wiley-Interscience, v.5, cap. 59, p.3-91, 1997
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION- Image library –malaria [last modified 08/03/2001] Disponível na internet em http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Malaria il
- CHARMAN, W.N., PORTER, C.J.H. Lipophilic prodrugs designed for intestinal lymphatic transport. *Adv.drug.Deliver.Rev.*, v.19, p.149-169, 1996
- CHUNG, M. C., FERREIRA, E. I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. Quím. Nova, São Paulo, v.22, n. 1, p. 75-84, 1999.
- COSTA, P., PILLI, R., PINHEIRO, S., VASCONCELLOS, M. Substâncias carboniladas e derivados. Sociedade Brasileira de Química-Bookman, cap 2, p.265-272, 2003
- COWMAN, A.F., FOOTE, S. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int. J. Parasitol.* Oxford, v. 20, n. 4, p.503-513, 1990.

- CRAIG, A., SCHERF, A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erytrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol.Biochem. Parasit.*, v .115, p. 129-143, 2001.
- CRUZ, M. L., FERREIRA, E. I., KOROLKOVAS, A. Latentiation of chemotherapeutic agents. Part 2: Synthesis of oxidized cellulose imine derivatives and antimalarials. *Starch/Stärke*, Wheinheinv. 49, p. 66-70, 1997.
- DEVERRE, J. R., LOISEAU, P., COUVREUR, P. LETOURNEUX, Y., GAYRAL, P., BENOIT, J. P. *In vitro* evaluation of filaricidal activity of GABA and 1,3-dipalmitoyl-2-(4-aminobutyryl)glycerol HC1; a digliceryde prodrug. *J. Pharm. Pharmacol.* London, v. 41, p. 191-193, 1989.
- DI SANTI, S. M.,BOULOS, M. Protozoários-Malária. In: CIMERMAN,B., CIMERMAN, S. Parasitologia Humana e Seus Fundamentos. São Paulo: Atheneu, p. 139-155, 2000
- DUA, V.K., SINHA, S.N., BISWAS, S., VALECHA, N., PURI, S.K., SHARMA, V.P. Isolation and antimalarial activity of peroxydisulfate oxidation products of primaquine. *Biorg. Med. Chem. Letters*, Oxford v.12, p. 3587-3589, 2002
- FERREIRA, E.I. *Malária*: aspectos gerais e quimioterapia, São Paulo: Atheneu-EDUSP, 1982.
- FERREIRA, E.I. Trends in the research for the new antimalarial agents. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v. 29, n. 1, p.1-15, 1993.
- FERREIRA, E.I. Antimaláricos. *In*: SILVA, P., Ed. *Farmacologia*, 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1163-1172, 2002.

- FERREIRA, E. I., CRUZ, M. L., KOROLKOVAS, A. Latentiation of chemotherapeutic agents. Part 1: Synthesis of oxidized starch imine derivatives and antimalarials. *Starch/Stärke*, Weinheim, v. 44, p. 21-24, 1992.
- FOSTER, S.D. Pricing, distribution, and use of antimalarial drugs. *Bull. WHO,* Geneva, v. 69, n. 3, p. 349-363, 1991.
- FRIIS, G.J., BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U., Eds. *A textbook of drug design and development*, 2nd. ed. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p. 351-385.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE- FUNASA. Situação e controle da malária no Brasil. Disponíbvel na internet em www.funasa.gov.br Acessado em outubro de 2002.
- FUREBY, A. M., TIAN, L., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON B. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. *Enz. Microb. Tec.*, v. 20, p. 198-206, 1997
- FURNISS, S.B., HANNAFORD, A.J., SMITH, P.W.G., TATCHEL, A.R. Vogel'S textbook of pratical organic chemistry. 5 ed. New York, Longman Scientific & Technical, cap 5, 1988. p. 691.
- GARZON ABURPEH, A., POUPAERT, J. H., CLAESEN, M., DUMONT, P., ATASSI, G. 1,3-Dipalmitoylglycerol esters of chlorambucil as a lymphotropic orally administrable antineoplastic agent. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 26, p. 1200-1203, 1983.
- GILLES, H.M. The treatment and prophylaxis of malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 81, n. 5, p. 607-617, 1987.

- GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 36, n. 5, p. 857-872, 1995.
- HARTMAN, L. Synthesis of glcerides fatty acids. *Chem. Rev.*, Washington v. 56, p.845-855, 1958.
- HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM- Malaria parasite metabolic pathways. Disponível na internet em <u>sites.huji.ac.il/malaria/ maps/PfEMP1.html</u>
 Última atualização em 25/09/2002 acessado em 05/10/2002.
- JACOB, J. N., HESSE, G. W., SHASHOUA, V. E. Gamma-aminobutyric acid esters. 3. Synthesis, brain uptake, and pharmacological properties of C-18 glyceryl lipid esters of GABA with varying degrees of unsaturation. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 30, p. 1573-1576, 1987.
- JONES, G. Lipoidal pro-drug analogues of various anti-inflammatory agents. *Chem. Ind.*, London, p. 452-4566, 1980.
- KARBWANG, J., WHITE, N. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. *J. Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v. 19, n. 4, p. 264-279, 1990.
- KEYSTONE, J.S. Prevention of malaria. *Drugs,* Auckland, v. 39, n. 3, p. 337-354, 1990.
- KOROLKOVAS, A. Essentials of Medicinal Chemistry, 2nd ed., New York: Wiley-Interscience, 1988.
- KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara 2002/2003*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

- LAMBERT, D. M. Rationale and applications of lipids as prodrug carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.,* Brussels, v.11, Suppl. 2, S15-S27, 2000.
- MALÁRIA FOUNDATION INTERNATIONAL Learn about malaria. [last reviewed: 25/05/2000] Disponível na internet: www.malaria.org . Acessado em 12/07/2001.
- GALL, HESTER, J.B., RUDZIK, JR. A. D., LAHTI, R. A.- Synthesis and pharmacology of novel anxiolytic agents derived from 2-[(dialkylamino)methyl-4H-triazol-4-yl]benzophenones and related heterocyclic benzophenones. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 19, p. 1057-1064, 1979.
- McNEISH, I.A., SEARLE, P.F., YOUNG, L.S., KERR, D.J. Gene directed enzyme prodrug therapy for câncer. *Adv. Drug Delivery*, v.26, p.173-184, 1997.
- MENEZES,C.M.S., KIRCHGARTTER, K., DISANTI, S.M.F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F.G., PAULA, G.A., FERREIRA, E.I. Antimalarial effect *in vitro* and lack of modulating effect of desipramine and imipramine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.91, n.6, p. 697-700, 1997.
- MENEZES, C. M. S., KIRCHGATTER,K., DI SANTI, S. M. F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F. G., PAULA, G. A., FERREIRA, E.I. *In vitro* evaluation of erytromycin as a modulating agent in Brazilian freshly chloroquine resistant *falciparum* isolates. *Rev. Inst. Med.Trop.*,São Paulo, v. 41, n 4, p. 211-253, 1999.

- MENEZES, C. M. S., KIRCHGARTTER, K., DISANTI, S. M. F., PAULA, G. FERREIRA, E.I. *In vitro* evaluation of verapamil and other modulating agents in Brazilian chloroquine-resistant *P. falciparum isolates. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberlândia, n.43, v. 4, p.221-226, 2002a.
- MENEZES, C. M. S., KIRCHGATTER,K., DI SANTI, S. M. F., SAVALLI, C., MONTEIRO, F. G., PAULA, G. A., FERREIRA, E.I. In vitro chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian Plasmodium falciparum: intrinsic antimalarial activity of phenothiazine drugs. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1033-1039, 2002b.
- MESHNICK, S.R. Artemisinin: mechanism of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p.1655-1660, 2002.
- WILLIAMS, D.A., LEMKE, T.L. Foye's principals of medicinal chemistry. 5. ed. : Lippincott Williams & Wilkins, New York, cap.35, p.867-890, 2002.
- MIHALY, G.W., WARD, S.A., EDWARDS, G., L'EORME, M., BRECKENRIDGE, A.M. Pharmacokinetics of primaquine in man: identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxon, v. 17,p. 441-446, 1984.
- MILLER, L.H., BARUCH, D., MARSH, K., DOUMBO, O.K. The Patogenic basis of malaria. *Nature*, London v. 415, p. 673-679, 2002.
- MOURA, C. I., WUNDERLICH, G., UHRIG, L.M., COUTO, A. S., PERES, V.J., KATZIN, A. M., KIMURA, E.A. Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob*. *Agents. Chemother.*, Washington, v. 45, n.9, p.2553-2558, 2001

- NOGUEIRA, P.A., WUNDERLICH, G., SILVA, L.H.P. Variant antigens of Plasmodium falciparum encoded by the var multigenic family are multifunctional macromolecules. Res. Microbiol., Paris v.152, p.141-147, 2001.
- OHARA, M. T., SAKUDA, T. M., CRUZ, M. L., FERREIRA, E. I., KOROLKOVAS, A. Antimalarial activity of imine oxidized starch and cellulose derivatives. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, n. 9, 522-527, 1995.
- OLLIARO, P. Mode of action and mechanism of resistance for antimalarial drugs.

 Pharm. Ther., Geneva, v 89, p. 207-219, 2001.
- OLLIARO, P., CATTANI, J., WIRTH, D. Malaria, the submerged disease. *JAMA J. Am. Med. Ass.*, Geneva, v. 275, p. 230-233, 1996.
- ONO, N., YAMADA, T., SAITO, T., TANAKA, K., KAJI, A. A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bull. Chem. Soc. Japan*, Tokyo, v. 51, p. 2401-2404, 1978.
- OSDENE, T.S., RUSSEL, P.B., RANE, L. 2,4,7-triamino-6-ortho-substituted arylpteridines. A new series of potent antimalarial agents. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 10, n. 5, p. 431, 1967.
- PANISKO, D.M., KEYSTONE, J. S. Treatment of malaria 1990. *Drugs,* Auckland, v. 39, p. 160-189, 1990.
- PARIS, G.Y., GARMAISE, D. L., CIMON, D.G., SWEET, L., CARTER, G. W., YOUNG, P. Glycerides as prodrugs. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of 1,3-bis(alkanoyl)-2-(O-acetylsalicyloil)glycerides (aspirin triglycerides). *J. Med. Chem.*, Washington, v. 22, p. 683-687, 1979.

- PARIS, G.Y., GARMAISE, D. L., CIMON, D.G., SWEET, L., CARTER, G. W., YOUNG, P. Glycerides as prodrugs. 2. 1,3-dialkanoyl-2-(2-methyl-4-oxo-1,3-benzodioxan-2-yl)glycerides (cyclic aspirin triglycerides) as antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 23, p. 79-82, 1980.
- PAYNE, D. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 3, p. 241-246, 1987.
- PETERS, W. Mefloquine/sulfadoxine/pyrimethamine for malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 89, n. 6, p. 699, 1995.
- Plano Nacional de Controle a Malaria (PNCM)-2002 . Disponível na internet em www.saude.gov.br acessado em 02/022004.
- PROKAI, L., PROKAI-TATRAI.K., BODOR, N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med.Res.Rev.*, **Hoboken**, v. 20, n.5, p. 367-416, 2000.
- RIDLEY, R. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, London, v.415, p.686-693, 2002.
- ROBERT, A., BENOIT-VICAL, F., DECHY-CABARET, O., MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action artemisinin. *Pure Appl. Chem.,* Res. Triangle PK., v. 73, n. 7, p. 1173-1188, 2001.
- ROLL BACK MALARIA A Global Partnership. Disponível na internet em: www.rbm.who.int. Acessado em 18/11/2003.

- ROSENTHAL, P.J., PETERSEN, C. GEERTSMA, F. R., KOHL, S. Availability of intravenous quinidine for *falciparum* malaria. *N. Eng. J. Med.*, San Francisco, v. 335, p. 138, 1996.
- SACHS, J., MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, London v. 415, p. 680-685, 2002.
- SANAI, A.A., FERREIRA,E.I. Triglicerideos de primaquina potencialmente *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, São Paulo, v 36, supl. 1, p.72, 2000.
- SCRIBA, G.K.E. Phenytoin-Lipid conjugates as potential prodrugs of phenytoin. *Arch. Pharm.*, n. 326, p. 477-481, 1993
- SCRIBA, G.K.E. Phenytoin-Lipid conjugates: Chemical, plasma esterase-mediate, and pancreatic lipase-mediated hydrolysis *In vitro. Pharm. Res.*, Münster, v. 10, n.8, p. 1181-1186, 1993.
- SCRIBA, G.K.E., LAMBERT, D.M., POUPAERT, J.H. Availability of phenytoin following oral administration of phenytoin-lipid conjugates to rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 47, p. 945-948, 1995.
- SCRIBA, G.K.E., LAMBERT, D.M., POUPAERT, J.H. Anticonvulsivant activity of phenytoin-lipid conjugates, a new class of phenytoin prodrugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.47, p. 197-203, 1995.
- SONG, Y., ONISH, H., NAGAI, T. Synthesis and drug-release characteristics of the conjgates of mitomycin C with N-succinyl-chitosan and carboxymethyl-chitin. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokio, v. 40, n.10, p. 2822-2825, 1992.

- SRIVASTAVA, R., PANDEY, V.C., BHADURI, A.P. Evaluation of resistant-reversal, CDRI compound 87/209 and this possible mode of action in rodent experimental malaria. *Trop. Med. Parasitol.*, Lucknow, v. 46, n. 2, p. 83-87, 1995.
- TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancerchemotherapy-macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, New York v.18, p.207-231, 1995
- TAKATA, J., KARUBE, Y., NAGATA, Y. Prodrugs of vitamin-E 1. preparation and enzymatic-hydroliyis of aminoalkanecarboxilic acid-esters od D-alphatocoferol. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 84, p. 207, 1995.
- TRIPATHI, R., DUTTA, G.P., VISHWAKARMA, R.A. Gametocytocidal activity of alpha/beta arteether by the oral route of administration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 54, n. 6, p. 652-654, 1996.
- TRIPATHI, R., PURI, S.K., DUTTA, G.P. Sodium beta-artelinate-a new potential gametocytocide. *Exp. Parasitol.*, Lucknow, v. 82, n. 3, p. 251-254, 1996.
- VAGAPANDU, S., SACHDEVA, S., JAIN, M., SINGH, S., SINGH., P.P., KAUL, C. L., JAIN, R., 8-aminoquinolines and their pro prodrug conjugates as potent blood-schizonticidal antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Oxford, v. 11., p. 4557-4568, 2003
- VÁSQUEZ-VIVAR, J., AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. *J. Biol. Chem.*, Bethesda v.267, n. 10, p. 6848-6854, 1992.

- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors II. Bioprecursors prodrugs. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry*, London: Academic Press, 1996. p. 697-716.
- WERMUTH, C. G., GAIGNAULT, J.-C., MARCHANDEAU, C. Designing prodrugs and bioprecursors I: Carrier prodrugs. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 671-196.
- WHITE, N.J. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J. Antim. Chemother.*, London, v. 30, n. 5, p. 571-585, 1992.
- WILK, S., MIZOGUSHI, H., ORLOWSKI, M. Gamma-glutamil dopa and gamma-glutamil dopamina as renal specific prodrug. *Fed. Proc.*, v. 37, p. 697-716,, *p.* 692, 1978.
- WINDOLZ, T.B., JOHNSTON, D.B.R. trichloroehtoxycarbonyl: A generally applicable protecting group. *Tet. Letters, Oxford,* n. 27, p. 2555- 2557,1967
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria situation in 1990. *Bull. WHO*, Geneva, v. 70, p. 801-807, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Roll Back Malária Malária a global crisis. [Last review: 03-06-2000] Disponível na internet http://www.who.int. Acessado em 15/07/2001.
- WOSTER, P. M., New therapies for malária. *Annu. Rep. Med. Chem., San Diego,* v.38, p. 203-211, 2003.